

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS

Suelen Santos da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA
CONTENDO EXTRATO DE *Physalis peruviana***

Santa Maria, RS
2018

Suelen Santos da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO
EXTRATO DE *Physalis peruviana***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Dr^a Cristiane Franco Codevilla
Co-orientador: Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes

Santa Maria, RS
2018

Silva, Suelen Santos da
Desenvolvimento de formulação nanoestruturada contendo
extrato de *Physalis peruviana* / Suelen Santos da Silva.-
2018.
81 p.; 30 cm

Orientadora: Cristiane Franco Codevilla
Coorientador: Cristiano Ragagnin de Menezes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. *Physalis peruviana* 2. Ultrassom 3. Nanoemulsão 4.
Citotoxicidade 5. Metodologia de superfície de resposta
I. Franco Codevilla, Cristiane II. Ragagnin de Menezes,
Cristiano III. Título.

Suelen Santos da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO
EXTRATO DE *Physalis peruviana***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 15 de março de 2018:

Cristiane Franco Codevilla, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)

Luciane Varini Laporta, Dra. (Unifra)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à luz da minha vida:
Meu filho João Pedro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela inspiração e força em todos os momentos de minha vida.

Ao meu pequeno João Pedro pelo amor, paciência infinita com a mamãe, pelos abraços apertados e pelas palavras certas nos momentos mais necessários.

À minha mãe Viviane, pelo amor, amizade, por cuidar do meu pequeno para que eu pudesse me aventurar na vida acadêmica, por sempre incentivar os estudos e a crescer profissionalmente.

Às minhas irmãs Taciane e Lariane pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos. Ao meu irmão Márcio, que mesmo distante, torce por mim.

Ao meu irmão Alisson (*in memoriam*) e ao meu pai Alcir (*in memoriam*) que sempre me incentivaram e me apoiaram.

Ao meu marido Cristiano, companheiro de longa jornada, que me ajudou, me apoiou em todas minhas escolhas e pela infinita paciência para comigo nos dias mais maçantes e difíceis.

Ao meu padrasto Edson pelo apoio, amizade e carinho.

Ao meu tio Xandi pelo amor paternal, incentivo, torcida e amizade.

À minha orientadora Cris, por todos os momentos de estímulo, apoio, disposição, amizade, conselhos, sabedoria e principalmente paciência. Agradeço muito a você por acreditar em mim, na minha capacidade, por ouvir minhas sugestões e ideias mirabolantes.

Ao meu co-orientador professor Dr. Cristiano Menezes, por permitir que eu fizesse parte do seu laboratório, pela amizade, conselhos e contribuições para que esse trabalho pudesse ser feito.

Ao professor Dr. Juliano por aceitar fazer parte da banca examinadora, pelas contribuições e ideias construtivas.

À professora Dra. Luciane por aceitar o convite de banca examinadora e pelas contribuições.

Às minhas colegas do lab Graci, Gabi, Greice, Mariana e Simara pelo carinho e amizade. À Thai e Maria Fernanda pelo companheirismo, amizade, torcida e pela parceria na roda do mate.

À minha querida colega Maiara, que começou comigo a aventura da nano no lab e me auxiliou em todos os momentos de dificuldade. Obrigada amiga, pelo carinho, atenção, pela ajuda, conselhos e principalmente por sua amizade sincera.

Aos IC's, em especial a Bruna e Cassandra, pela pró-atividade e pela dedicação.

Às minhas amigas Graciela e Angélica pelo companheirismo, amizade e carinho desde a graduação.

Às minhas amigas de longa data Daiana e Giovana pelos mates, risadas, amizade, apoio e por emprestar seus ombros, que muito usei para derrubar lágrimas (risos).

Aos demais familiares e amigos que sempre estiveram me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Ao prof. Dr. César Bizzi por ceder o laboratório de ultrassom e os alunos do Cepetro que me auxiliaram enquanto estive desenvolvendo as formulações.

À professora Dra. Cristiane de Bona da Silva pelo apoio, e as alunas do laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, pelo auxílio nas análises físico-químicas das formulações.

À Dra. Daniele Libreloto, pelo auxílio análises da citotoxicidade nas células.

Ao prof. Dr. Félix Soares, em especial a Marina e Larissa, pelo auxílio no experimento de citotoxicidade em *C. elegans*.

À CAPES, órgão financiador de bolsas de estudo.

À Universidade Federal de Santa Maria pelas oportunidades oferecidas.

Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.

(Albert Einstein)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA CONTENDO EXTRATO DE *Physalis peruviana*

AUTORA: Suelen Santos da Silva

ORIENTADORA: Cristiane Franco Codevilla

A utilização de extratos de plantas é uma tendência crescente na indústria de alimentos e sua aplicação depende das propriedades funcionais, disponibilidade, custo-eficácia e seus efeitos sobre os atributos sensoriais do produto final. Os compostos bioativos presentes nas plantas podem ter ação antioxidante, antimicrobiana, entre outras, porém esses compostos possuem baixa solubilidade em água e baixa estabilidade, o que dificulta o seu uso e diminui sua vida útil. A associação da nanotecnologia com produtos naturais tem levado à pesquisa e desenvolvimento de sistemas nanoestruturados capazes de controlar a estabilidade, melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos. A fruta *Physalis peruviana* é rica nesses compostos, por esse motivo, o presente trabalho visa o preparo de extratos e a associação destes em sistemas nanoestruturados, como nanoemulsão, empregando método de preparo de alta energia, o ultrassom (US). Será aplicada a metodologia de superfície de resposta (RSM) para obtenção da melhor condição, variando parâmetros como amplitude, tempo de sonicação e massa de triglicerídios de cadeia média (MCT- do inglês) empregados na formulação. Também a verificação da estabilidade dos sistemas nanoestruturados, atividade antioxidante e avaliação da toxicidade *in vivo* e *in vitro*. A condição ideal para nanoemulsificação foi 10 minutos de sonicação, em banho de US com frequência de 37 kHz, com amplitude de 40% e 0,120 g de MCT. A nanoemulsão apresentou pH de 3,84, diâmetro médio de gotícula de 268 ± 7 nm, índice de polidispersão de 0,113 e potencial zeta negativo de 13,94 mV. A formulação se manteve estável pelo período de 60 dias sob refrigeração ao contrário do extrato livre que a partir do 30º dia perdeu 56% de compostos fenólicos. Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que tanto o extrato livre quanto associado à nanoemulsão não apresentaram toxicidade. As características da nanoemulsão com extrato de *Physalis peruviana* desenvolvida, bem como a não toxicidade sugerem segurança no consumo e, assim uma possível futura aplicação em produto alimentício.

Palavras-chave: *Physalis*. Nanoemulsão. Fenólicos. Ultrassom. Citotoxicidade. Metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANOESTRUTURED FORMULATION CONTAINING EXTRACT OF *Physalis peruviana*

AUTHOR: SUELEN SANTOS DA SILVA
ADVISOR: CRISTIANE FRANCO CODEVILLA

The use of plant extracts is a growing trend in the food industry and its application depends on the functional properties, availability, cost-effectiveness and their effects on the sensorial attributes of the final product. The bioactive compounds present in the plants may have antioxidant, antimicrobial action, among others, however these compounds have low solubility in water and low stability, which hinders their use and decreases their useful life. The association of nanotechnology with natural products has led to the research and development of nanostructured systems capable of controlling stability, improving solubility, bioavailability and controlling the release of bioactive compounds. The fruit *Physalis peruviana* is rich in these compounds, therefore, the present work aims the preparation of extracts and the association of these in nanostructured systems, such as nanoemulsion, using high energy preparation method, ultrasound (US). Application of response surface (RSM) methodology to obtain the best condition, varying parameters such as amplitude, sonication time and mass of medium chain triglycerides (MCT). Also the verification of the stability of nanostructured systems, antioxidant and cytotoxic activity. The ideal condition for nanoemulsification was 10 minutes of sonication, in a US bath with a frequency of 37 kHz, with amplitude of 40% and 0.120 g of MCT. The nanoemulsion had a pH of 3.84, a mean droplet diameter of 268 ± 7 nm, a polydispersity index of 0.113 and a negative zeta potential of 13.94 mV. The formulation remained stable over the 60 day period under refrigeration as opposed to the free extract which, after 30 days, lost 56% of phenolic compounds. In vitro and in vivo tests showed that both the free and nanoemulsion associated extracts showed no toxicity. The characteristics of nanoemulsion with developed *Physalis peruviana* extract as well as non-toxicity suggest safety in the consumption and thus a possible future application in food product.

Keywords: Physalis. Nanoemulsion. Phenolics. Ultrasound. Citotoxicity. Response Surface Methodology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Physalis peruviana in natura	19
Figura 2 -	Escala de granulometria das emulsões	22
Figura 3 -	Representação dos glóbulos de emulsões do tipo A/O e O/A	23
Figura 4 -	Delineamento composto central	26
Manuscrito 1		
Figura 1 -	Contour plot graphs of the values of conditions proposed by RSM ..	41
Figura 2 -	Evaluation of stability of nanoemulsion	42
Manuscrito 2		
Figura 1 -	Gráficos de viabilidade celular	55
Figura 2 -	Ciclo de defecação dos vermes	57
Figura 3 -	Sobrevivência dos vermes	58
Figura 4 -	Batimentos faríngeos	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água em óleo
CCD	Central Composite Design
DCC	Delineamento composto central
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPI	Emulsion Phase Inversion
GAE	Galic Acid Equivalent
MCT	Medium Chain Triglycerides
MD	Medium Droplet size
O/A	Óleo em água
PDI	Polidispersion Index
PIT	Phase Inversion Temperature
RSM	Response Surface Methodology
SE	Spontaneous Emulsion
US	Ultrassom
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. <i>Physalis peruviana</i>	19
3.1.1. Compostos bioativos	20
3.2. Nanoemulsão	21
3.3. Ultrassom	24
3.4. Metodologia de superfície de resposta	25
3.5. Estabilidade das nanoemulsões	26
4. Toxicidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	27
MANUSCRITO 1	30
Abstract	31
1. Introduction	32
2. Material and methods	34
2.1. Materials	34
2.2. Goldenberry extract	34
2.3. Determination of total phenolics content	34
2.4. Total carotenoid content	35
2.5. Antioxidant capacity of goldenberry extract	35
2.6. Preparation of nanoemulsions	36
2.7. Experimental design	36
2.8. Physicochemical analysis of nanoemulsion	36
2.10. Statistical analysis	38
3. Results and discussion	38
4. Conclusion	43
References	44
MANUSCRITO 2	47
Resumo	48
1. Introdução	49
2. Material e métodos	50

2.1. Materiais	50
2.2. Preparação do extrato	50
2.3. Preparação da nanoemulsão	50
2.3.1. Caracterização físico-química	51
2.4. Avaliação da toxicidade	51
2.4.1. Toxicidade <i>in vitro</i>	51
2.4.2. Toxicidade <i>in vivo</i>	52
2.4.2.1. Manutenção dos animais	52
2.4.2.2. Tratamento	52
2.4.2.3. Ensaio de sobrevivência	52
3. Resultados e discussão	53
3.1. Caracterização físico-química das nanoemulsões	53
3.2.1. Avaliação <i>in vitro</i>	54
4. Conclusão	59
Discussão geral	63
Conclusão geral	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	77
APÊNDICE A.....	78
APÊNDICE B.....	79
APÊNDICE C	79
APÊNDICE D	80
APÊNDICE E.....	80

1. INTRODUÇÃO

As frutas são fontes significativas de compostos antioxidantes, nesse contexto o Brasil se destaca com elevada produção de diferentes variedades de frutas nativas ou exóticas devido a sua extensão territorial e pelo clima tropical. Um exemplo de fruta exótica, que possui propriedades terapêuticas e compostos bioativos como carotenoides, flavonoides e fitoesteróis é a *Physalis peruviana* L. (GRANADA et al, 2004). O gênero *Physalis* da família Solanaceae tem aproximadamente 120 espécies distribuídas nas zonas temperadas do planeta, como no sul da América do Norte e na América do Sul (NURIT SILVA; AGRA, 2005). A *physalis* possui pH ácido devido aos ácidos fenólicos, como flavonoides, além de ser uma importante fonte de vitaminas C e A. Esses compostos tem a desvantagem de serem insolúveis em água e possuírem baixa estabilidade a variações de temperatura e exposição a oxigênio e luz.

A nanotecnologia na indústria de alimentos abrange desde a produção ao processamento, armazenamento e desenvolvimento de materiais inovadores, como embalagens leves, mais fortes, funcionais, contendo nanocompósitos para proteção microbiana. Também proporciona tempo de vida útil maior dos produtos alimentares, contribuindo para reduzir o desperdício de alimentos. Essa associação da nanotecnologia com produtos naturais tem levado à pesquisa e desenvolvimento de sistemas nanoestruturados capazes de controlar a estabilidade, melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos (EZHILARASI ET AL., 2013; CHAUDHRY; CASTLE, 2011). A nanoemulsão é considerada emulsão verdadeira, com diâmetro de gotícula entre 50 e 1000 nm e possuem estabilidade quanto à sedimentação. Para a formação de nanoemulsões é necessário energia, mecânica ou de potencial químico dos componentes da formulação.

Nesse trabalho foi proposto o uso de ondas mecânicas geradas por banho e sonda de ultrassom, como fonte de energia, para obtenção das nanoemulsões contendo extrato hidroalcoólico de *Physalis peruviana* L. (*P. peruviana*), e a determinação da capacidade antioxidante e a toxicidade *in vivo* e *in vitro* do extrato e da formulação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho consistiu no desenvolvimento de nanoemulsão com extrato de *Physalis peruviana* utilizando ultrassom, com emprego de metodologia de superfície de resposta na otimização da formulação, e sua avaliação quanto a estabilidade e citotoxicidade.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanoemulsão contendo extrato hidroalcoólico de *Physalis peruviana* utilizando ultrassom através da metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar as características físico-químicas da formulação quanto ao: diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e conteúdo de fenólicos totais;
- Avaliar a estabilidade da formulação pelo período de 60 dias, com dois tipos de armazenamento: temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (7 °C);
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato associado e não associado à nanoemulsão em linhagens tumorais de câncer de mama e de linhagens não tumorais, os fibroblastos;
- Avaliar a toxicidade do extrato associado e não associado à nanoemulsão, *in vivo*, utilizando modelo *Caenorhabditis elegans*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Physalis peruviana*

A origem da *physalis* remonta aos tempos da civilização Inca, uma vez que a planta é oriunda dos Andes, tendo depois surgido em vários outros locais da América latina. Desde essa época não se registam alterações estruturais da planta (PUENTE et al., 2011). O nome *Physalis* tem origem no grego “*Physa*” que significa bolha ou bexiga, que refere-se ao cálice que envolve os frutos (LICODIEDOFF, 2013). O género *Physalis* L., da família Solanaceae, tem aproximadamente 120 espécies distribuídas nas zonas temperadas do planeta, como no sul da América Norte e na América do Sul (NURIT SILVA; AGRA, 2005).

A *Physalis peruviana* (Figura 1) é a espécie de *physalis* mais conhecida, cujo fruto é pequeno e redondo, apresentando polpa que varia da cor amarela até um escuro alaranjado, com forma e estrutura semelhante ao tomate (ALVARADO et al., 2004). O fruto contém uma baga carnosa que tem entre 150 a 300 sementes, pesando de 4 a 10 g e é envolto por um involúcro parecido com um balão, conhecido por cálice (AVILA et al., 2006).

Figura 1 - *Physalis peruviana* in natura. Fonte: o autor.



A *physalis* pertence ao grupo de frutos tropicais, tendo um alto destaque (LIMA et al., 2009), como uma fruta requintada, com elevado potencial económico e por suas propriedades medicinais decorrentes de sua composição, rica em compostos bioativos (RODRIGUES et al., 2013). Na medicina popular, essa fruta é usada no

tratamento do reumatismo, doenças de pele, rins, fígado, bexiga, malária e hepatite, além de purificar o sangue e fortalecer os nervos ópticos e reduzir a incidência de cataratas (RUFATO et al., 2008).

O seu consumo ainda é restrito, devido ao alto valor agregado, em decorrência da produção limitada, do manejo da colheita, da alta demanda de mão de obra, dos cuidados no transporte e do armazenamento (VELASQUEZ et al., 2007). Com um manejo adequado e planejado, o cultivo pode permanecer em produção por até 2 anos, de acordo com a região e o clima predominante. Porém, a partir do segundo ano, existe uma redução da produtividade como também da qualidade dos frutos (MUNIZ et al., 2011).

3.1.1. Compostos bioativos

Physalis peruviana é uma das espécies mais encontradas no Brasil, onde o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor da fruta fresca no país (LIMA et al., 2013). Essa fruta apresenta compostos bioativos que contribuem para a captura de radicais livres, atuando como antioxidantes (FONTANA et al., 2000; ROCKENBACH et al., 2008). Os frutos apresentam alto teor de vitamina A e C, ferro e fósforo, flavonoides, alcaloides e fitoesteroides (TOMASSINI et al., 2000).

Entre os compostos bioativos presentes na *Physalis peruviana*, destacam-se ácido ascórbico, vitaminas C e E, β -caroteno (RAMADAN; MORSEL, 2003; BRIONES-LABARCA et al., 2013; HASSANIEN, 2011), que juntamente com os compostos fenólicos, conferem a *physalis* propriedades farmacológicas, como ação antioxidante, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória e imunossupressora (KUSPKA; JÉLEN, 2016).

Os carotenóides são responsáveis pela cor da laranja no fruto de *P. peruviana* (RAMADAN et al., 2003). O β -caroteno é muito importante na prevenção de certas doenças humanas como o câncer. Ele foi identificado por De Rosso e Mercadante (2007) como o carotenóide predominante da *P. peruviana*, representando 77% dos carotenóides totais do fruto. A razão pela qual os carotenóides impedem o câncer está relacionada à atividade antioxidante, que inibe os radicais livres gerados nos tecidos (CASTRO et al., 2008).

Polifenóis, carotenoides e outros compostos bioativos já citados de *P. peruviana*, apresentam baixa solubilidade em água, baixa estabilidade frente a altas temperaturas, luz e oxigênio e também baixa disponibilidade. Como uma alternativa

para amenizar esses fatores a nanotecnologia seria uma opção. Existem diferentes sistemas nanoestruturados que podem ser empregados em alimentos para melhorar a absorção dos compostos bioativos e protegê-los da degradação, como nanoemulsões, nanocápsulas, lipossomas, entre outros (CODEVILLA et al., 2015; SCHMALTZ et al., 2005).





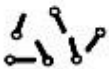
3.2. Nanoemulsão

A nanotecnologia tem emergido como uma das mais promissoras linhas de pesquisa científicas nas últimas décadas (EZHILARASI et al., 2013), sendo definida como a ciência e engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais, cujos componentes estejam estruturados de forma que pelo menos uma dimensão esteja em escala nanométrica (SILVA, 2004). Sistemas nanoestruturados apresentam diâmetro de partícula inferior a 1 μm e conferem vantagens, como direcionamento da substância ativa no local específico da ação, aumentando o efeito terapêutico e/ou diminuindo os efeitos adversos, além da melhora da biodisponibilidade (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A nanotecnologia na indústria de alimentos abrange desde a produção ao processamento, armazenamento e desenvolvimento de materiais inovadores, como embalagens leves, mais fortes, funcionais, contendo nanocompósitos para proteção microbiana (EZHILARASI et al., 2013). Também proporciona tempo de vida útil maior dos produtos alimentares, contribuindo para reduzir o desperdício de alimentos (CHAUDHRY; CASTLE, 2011).

Dentre os principais nanocarreadores estudados estão as nanoemulsões (GUTERRES et al., 2007). As nanoemulsões são um sistema constituído por gotículas de óleo estabilizadas por tensoativos (ANTON et al., 2008). São consideradas emulsões verdadeiras, com tamanho de gotícula que varia entre 50 e 1000 nm de diâmetro (GUTIÉRREZ et al., 2008). Tem aparência translúcida quando o tamanho do glóbulo é menor que 200 nm, e aparência leitosa quando este se encontra entre 200 e 500 nm (CAPEK, 2004) (Figura 2).

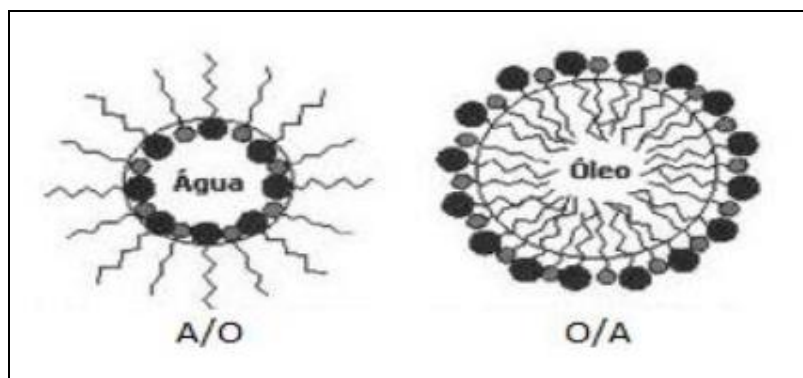
Figura 2- Escala de granulometria das emulsões. Fonte: ANSEL et al., 1999.

	Aparência	Denominação	Aspecto
2 - 20 μ m		Macro emulsão	Branca leitosa
0,1 – 0,3 μ m		Nanoemulsão	Branca azulada
< 0,1 μ m		Microemulsão	Translúcida
0,01 μ m		Soluções micelares	Transparentes
0,001 μ m		Soluções moleculares	Transparentes

Nanoemulsões exigem quantidades não excessivas de tensoativos, na faixa de 5 a 10%. São sistemas metaestáveis, ou seja, são estáveis por um longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da estabilização estérica quando se emprega tensoativos não-iônicos e/ ou polímeros na preparação (FERNANDEZ et al., 2004). As nanoemulsões podem ser do tipo água-em-óleo (A/O) ou óleo-em-água (O/A). O que definirá o tipo será a afinidade dos tensoativos pelas fases, aquosa e oleosa (DAUDT et al., 2013) (Figura 3). Quando a nanoemulsão for do tipo A/O, significa que a fase externa é a oleosa; quando for do tipo O/A, a fase externa é a aquosa (PAYS et al., 2002).

Uma das aplicações de nanoemulsões nas indústrias alimentícia e farmacêutica é o encapsulamento de compostos lipofílicos, como vitaminas, flavorizantes, corantes, conservantes, nutracêuticos e fármacos (ACOSTA, 2009; McCLEMENTS et al., 2007).

Figura 3- Representação dos glóbulos de emulsões do tipo A/O e O/A. Fonte: OLIVEIRA, 2003.



A encapsulação de um composto lipofílico pode ser realizada por uma série de razões: para melhorar a sua facilidade de manipulação e utilização; para facilitar a sua incorporação dentro de um produto, para aumentar a sua biodisponibilidade, para controlar a taxa ou o local de sua liberação, ou para protegê-lo da degradação química (CHOI et al., 2010). Os componentes lipofílicos são geralmente misturados com a fase oleosa antes da formação da nanoemulsão, de modo que estão presos dentro das gotículas uma vez que a nanoemulsão foi produzida. No entanto, é possível adicioná-los após a formação da nanoemulsão, por exemplo, incorporando-os em um sistema de entrega coloidal que é misturado com a nanoemulsão (CHOI et al., 2009; McCLEMENTS, 2010).

A associação de compostos bioativos contidos em extratos de plantas com sistemas nanoestruturados reduz problemas como instabilidade a temperaturas altas, gosto residual devido a adição de extrato livre em alimentos, degradação por oxidação e exposição a luz (BONIFÁCIO et al., 2014). A nanoemulsificação de extratos de plantas também melhora a solubilidade, a biodisponibilidade e há melhor controle de liberação dos compostos bioativos (ABBAS et al., 2015).

Nanoemulsão contendo extrato etanólico da polpa dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* obtida por método de baixa energia, apresentou tamanho de glóbulo inferior a 200 nm, porém o valor de índice de polidispersão (PDI) foi maior que 0.3, o que não é desejável para um sistema homogêneo e estável, e extrato com boa atividade antioxidante (MEZADRI, 2010). Zorzi e colaboradores (2016) desenvolveram nanoemulsões associadas ao extrato de macela (*Achyrocline*

satureioides) com tamanho de gota de 295 nm e PDI menor que 0.3. O extrato de macela livre apresentou bom poder antioxidante e quando encapsulado teve seu efeito antioxidante equivalente a nanoemulsão com quercetina.

Não foram encontrados, até então, estudos envolvendo nanoencapsulação do extrato ou óleo essencial de *physalis*. Dag e colaboradores (2017) microencapsularam o suco de *Physalis peruviana* para preservar os compostos bioativos contidos no suco, utilizando alta energia (UltraTurrax); como material de revestimento matodextrina, goma arábica, alginato e pectina. As micropartículas apresentaram boa distribuição granulométrica e foram liofilizadas para aumentar a estabilidade do sistema.

3.3. Ultrassom

As nanoemulsões não podem ser formadas espontaneamente, sendo necessária energia, geralmente a partir de dispositivos mecânicos ou a partir do potencial químico dos componentes (ASSIS et al., 2012). As nanoemulsões podem ser preparadas através de métodos de alta e de baixa energia. No primeiro caso estão a homogeneização à alta pressão, sonicação e microfluidização, os quais requerem equipamentos específicos. No segundo caso, métodos que utilizam a energia química armazenada nos componentes como, por exemplo, a emulsificação espontânea e o método da temperatura de inversão de fases (SOLANS et al., 2005; ANTON et al., 2008; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2014).

A sonicação é um método de alta energia, que pode ser usado para desenvolver nanoemulsão. Esse método é documentado como uma técnica rápida e eficiente para uma nanoemulsão estável, com pequeno diâmetro de gota e baixo índice de polidispersão (LIN; CHEN, 2008). O tamanho do diâmetro das gotículas pode ser controlado através de parâmetros do processo, tais como a concentração do óleo e tensoativo, a viscosidade da fase contínua e o tempo de emulsificação (NAKABAYASHI et al., 2011). A intensidade de sonicação é um parâmetro que tem grande influência no processo de emulsificação, visto que com o aumento, o tamanho das gotículas diminui. Há também o efeito térmico, resultante da energia dissipada na forma de calor que provoca o aumento da temperatura da dispersão a ser nanoemulsionada, limitando o emprego dessa técnica a materiais que sejam termolábeis (ALMEIDA et al., 2008).

Existem dois tipos de sonificadores, o banho de ultrassom, que tem o transdutor diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, normalmente água e a sonda, também chamada de probe, que encontra-se fixada na extremidade do amplificador do transdutor, em contato direto com o sistema reacional (LUZ, 1998).

Nanoemulsões do tipo O/A contendo óleo de citronela foram preparadas por emulsificação ultrasônica, usando uma sonda de 22 kHz de frequência com 50% de amplitude e tempo de irradiação de 5 minutos. O tamanho de gota verificado foi de 60 nm e 0,3 de PDI (AGRAWAL et al., 2017). Kentish e colaboradores (2008) encontraram tamanhos de gota menores que 135 nm para nanoemulsões contendo óleo de linhaça, preparadas com sonda de ultrassom com 24 kHz de frequência.

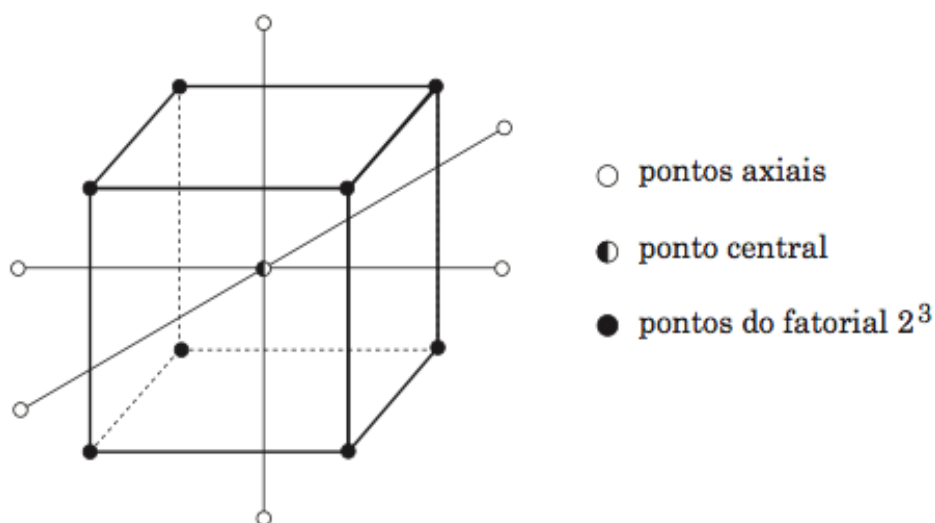
3.4. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (do inglês, *response surface methodology*, RSM) consiste em uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para desenvolvimento, melhora e otimização de processos. Ela também tem aplicações importantes em planejamentos, desenvolvimento e formulação de novos produtos, e melhoria dos projetos e produtos existentes. A mais extensiva aplicação do RSM é na área industrial, particularmente em situações em que entram várias variáveis que potencialmente influenciam em alguma medida de desempenho ou na qualidade característica de um produto ou processo. E, essa medida de desempenho ou qualidade característica é chamada de resposta (MYERS; MONTGOMERY, 1995).

A RSM é representada graficamente e pode ser utilizada de três formas: para descrever como as variáveis em teste afetam as respostas; para determinar as inter-relações entre as variáveis em teste; e para descrever efeitos combinados de todas as variáveis em teste sobre a resposta (CAMARGO et al., 2009). O Delineamento Composto Central (DCC), introduzido em 1951, por Box e Wilson, é um dos delineamentos mais populares para o ajuste de modelos de superfície de resposta (LIMA, BUENO FILHO, 2010). Ele consiste em uma parte do "cubo" composto pelos pontos de um experimento fatorial de 2^k ou 2^{k-1} , pontos axiais, além de pontos centrais (Figura 4). O número total de ensaios é definido através da expressão $N = k^2 + 2k + cp$, onde k é o número de fatores, $2k$ são os pontos axiais e cp é o número de replicatas do ponto central (CAMARGO et al., 2009). Esta técnica tem sido utilizada

em diferentes formulações de alimentos para otimização do processamento, como por exemplo: obtenção de nanoemulsões preparadas a partir de óleo de canola e óleo de noz (HOMAYOONFAL et al., 2014; MEHMOOD, 2015; MUSA et al., 2013; ZHU et al., 2010).

Figura 4- Delineamento composto central para $k = 3$ fatores, 6 pontos axiais α e um ponto central. Fonte: Lima, Bueno Filho, 2010.



3.5. Estabilidade das nanoemulsões

Diversos fatores estão envolvidos no processo de instabilização, como os físicos (temperatura, agitação, congelamento e descongelamento) ou químicos (pH, presença de eletrólitos, peroxidação lipídica), além da contaminação por microorganismos e da própria composição do sistema (DRISCOLL, 2006; FLOYD, 1999). Além do aumento do tamanho das gotículas e alterações no potencial zeta das gotículas, a redução do pH também está amplamente relacionada aos fenômenos, principalmente à degradação de triglicerídeos e fosfolipídeos (RABINOVICH-GUILATT, et al., 2005; SAKAEDA; HIRANO, 1998).

A determinação de pH, do diâmetro médio das partículas, do índice de polidispersão e do potencial zeta são parâmetros utilizados para verificar a estabilidade de sistemas nanoestruturados (MEZADRI, 2010). O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à

proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição quali-quantitativa das formulações (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O valor de pH é um parâmetro de monitoramento da estabilidade em emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com extratos vegetais, diminuição do valor de pH indica uma degradação dos ácidos graxos dos extratos (MARTINI, 2005).

A determinação do diâmetro médio de gotícula das nanoemulsões é uma análise fundamental, pois o tamanho está diretamente ligado à estabilidade do sistema (BRUXEL et al., 2012). O diâmetro é influenciado pela composição quali e quantitativa das formulações e pelo método de preparo utilizado. Um aumento de 10% na concentração de óleo pode aumentar o diâmetro significativamente (BENITA; LEVY, 1993).

As técnicas utilizadas para a determinação do diâmetro médio podem ser: espalhamento de luz dinâmico ou estático, espectroscopia de correlação de fótons ou, ainda, técnicas microscópicas como a microscopia eletrônica de transmissão e varredura, de força atômica ou criofratura (DRISCOLL, 2006; HAN et al., 2001).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Sulaiman e colaboradores (2016) encontraram diâmetro médio de 97,38 nm, PDI de 0,25 e potencial zeta de -25,1 mV para nanoemulsões contendo extrato de *Clinacanthus nutans* L. As formulações foram avaliadas pelo período de 90 dias e não foi observada separação de fases, indicando uma boa estabilidade desse sistema.

4. Toxicidade *in vitro* e *in vivo*

Para determinação do potencial antioxidante de uma amostra, os ensaios mais utilizados são os químicos *in vitro*. Porém, os resultados dos ensaios químicos não representam a atividade biológica dos compostos presentes nas amostras, porque os ensaios químicos são realizados em pH e temperatura não fisiológicos, e não

consideram sua biodisponibilidade, absorção e metabolismo (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). Devido a estas limitações, o ensaio de capacidade antioxidante em células passou a ser uma melhor opção para avaliar a ação antioxidante desses compostos em 35 modelos celulares (WOLFE; LIU, 2007; ZHANG et al., 2013).

A vantagem de utilizar cultura de células para avaliar a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é poder testar diferentes tipos de fatores de estresse e diferentes modelos celulares (NIKI, 2010).

Entretanto, a caracterização *in vivo* imediata de nanomateriais após sua síntese, abre oportunidades para otimização rápida do projeto, elimina a necessidade de ensaios *in vitro* em culturas celulares demoradas, e supera dificuldades envolvidas no uso de modelos de mamíferos (ARTAL-SANZ et al., 2006). *Caenorhabditis elegans* pode ser considerado um modelo animal adequado para pesquisas e ensaios biológicos iniciais de nanomateriais (GONZALES-MORAGAS et al., 2015).

Os materiais e métodos, resultados e discussões serão apresentados em dois manuscritos intitulados “Optimization and stability of goldenberry (*Physalis peruviana*) fruit nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology” e “Caracterização físico-química e avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* de nanoemulsão contendo extrato de *Physalis peruviana*”, na sequência, discussão e conclusão geral.

MANUSCRITO 1

Optimization and stability of goldenberry (*Physalis peruviana*) fruit nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Food Chemistry*.

Abstract

In the present study, the antioxidant activity, total phenolics content and total carotenoids of goldenberry extract were determined. The process of obtaining the nanoemulsion containing extract of goldenberry was optimized using the response surface methodology (RSM). For this, parameters such as amount of medium chain triglycerides (MCT), time of sonication and the amplitude of ultrasonic bath were evaluated. Physicochemical analyzes were performed to evaluate these parameters. Antioxidant activity, total carotenoid and phenolic content was $8.71 \pm 0.32 \mu\text{mol}$ of Trolox g^{-1} , $28.16 \pm 0.35 \mu\text{g}$ β -carotene g^{-1} and $153.75 \pm 1.12 \text{ mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$, respectively. Optimal formulation was obtained using 0.120 g of MCT, ultrasonic operating time of 10 min, with 40% of amplitude and 37 kHz frequency. The physicochemical characterization showed droplet size lower than 270 nm, low polydispersity index (0.113), negative zeta potential (13.94 mV) and acid pH values (3.84). The nanoemulsion containing extract of goldenberry showed good stability and protection of phenolic compounds after 60 days of storage at refrigeration temperature.

Keywords:

Ultrasound

Nanoemulsion

Phenolics

Physalis peruviana

Antioxidant activity

1. Introduction

The genus *Physalis* L. of the Solanaceae family has approximately 120 species distributed in the temperate zones of the planet, as in southern North America and South America. The goldenberry (*Physalis peruviana*) is one of the most found species in Brazil, where the state of Rio Grande do Sul is the largest producer of fresh fruit in the country (Rufato et al., 2008). Among the main characteristics, the pulp color varies from yellow to dark orange (similar to a tomato), small size (diameter between 12.5 and 25 mm) and round shape, being able to weigh from 4 to 9 g (Avila et al., 2006; CCI, 2000; Silva & Agra, 2005). Bioactive compounds can be found within the diversity of the genre, as simple flavonoids or glycosides (kaempferol, quercetin, rutin), ascorbic acid, carotenoids, alkaloids and terpenes (such as Withaesteroids). These compounds have low stability to high temperatures, exposure to ultraviolet light and oxygen, as well as low solubility in water (Licodiedoff et al., 2013; Codevilla et al., 2015).

Nanoencapsulation has the potential to improve bioavailability, controlled release, and is able to target bioactive compounds more accurately than microencapsulation (Pinheiro et al., 2013). In addition, nanoencapsulation systems offer numerous benefits, including ease of handling, increased stability, protection against oxidation, retention of volatile ingredients, masking taste, controlled release triggered by moisture or pH, consecutive delivery of various active ingredients, change flavor characteristics and long-term organoleptic perception (Bazana et al., 2015).

Nanoemulsions can be made using low energy and high energy methods. Low-energy methods can be divided into thermal and isothermal methods. Thermal methods depend on the formation of emulsions due to changes in the properties of the surfactant with temperature, whereas the isothermal methods depend on the formation of emulsions due to changes in the composition of the local system at a fixed temperature. Spontaneous emulsion (SE) and emulsion phase inversion (EPI) methods are examples of isothermal methods, while the phase inversion temperature (PIT) method is an example of a thermal method (Komaiko & McClements, 2014). High energy methods include microfluidization, ultrasonic homogenization and high pressure homogenization. The purpose of these devices is to provide intense mechanical energy that helps break up macroscopic phases or turn larger droplets

into smaller droplets (Gaikwad & Pandit, 2008). Ultrasonic homogenization involves two mechanisms: a) acoustic field creates interfacial waves that makes oil phase to disperse in the continuous phase as droplets; b) ultrasound provokes acoustic cavitation which provides formation and collapse of microbubbles respectively due to pressure fluctuations of a single sound wave. Then, the highly turbulence generated causes micro implosions, disrupting large droplets into sub-micron size (Çinar, 2017). Because of the small droplet size, the stability of such systems is greater, making these emulsions become attractive to cosmetic products and food industries. Specifically, nanoemulsions offer the potential to provide high concentrations of oil-soluble nutraceuticals or bioactive food supplements in a variety of water-based foods (Rebolleda et al., 2015).

Ultrasonic homogenization has been gaining ground in the preparation of nanoemulsions due to the low cost of production, ease of manipulation of the system, greater energy efficiency and lower instrumental requirements. The size of the droplet diameter can be controlled by process parameters, such as oil and surfactant concentration, continuous phase viscosity and emulsification time. The sonication intensity is a parameter that has great influence in the emulsification process. With increasing sonication intensity the droplet size decreases (Nakabayashi et al., 2011; Leong et al., 2009). Since the transducers are located at the bottom of the ultrasonic bath, one of the main parameters that influence the best use of cavitation bubble efficiency is the position of the vessel in the ultrasound bath (Kulkarni & Rathod, 2014).

The response surface methodology is a statistical and mathematical technique used for the improvement and optimization of the process (Yuan et al., 2008). It can be applied when a response or set of responses are affected by multiple variables. By using this, it is possible to simultaneously optimize independent variable levels for product formulation and process optimization (Bezerra et al. 2008; Mehmood, 2015). This technique was used in different food formulations for process optimization and ingredient level optimization, e.g. nanoemulsions using ultrasound (Chang & McClements, 2014; Mehmood, 2017).

The aims of the present study using RSM were to develop nanoemulsions containing extract of goldenberry and to evaluate simultaneously main effects and interaction effects between the factors including MCT quantity, US amplitude and sonication time, determining the optimal combination of these variables. The

nanoemulsions were evaluated for their stability at room temperature and refrigeration for 60 days.

2. Material and methods

2.1. Materials

Goldenberry was purchased from Italbraz (Vacaria, Brazil) located at 28:0:44 S and 50:56:02 W. Ethanol, methanol and acetone were obtained from Dinâmica (São Paulo, Brazil). Sodium carbonate and petroleum ether were purchased from Vetec (Duque de Caxias, Brazil), gallic acid and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Folin-Ciocalteu reagent was purchased from Cromoline (São Paulo, Brazil). Tween 80 was obtained from Synth (São Paulo, Brasil). Span 80 was obtained from Fluka (São Paulo, Brasil) and Medium Chain Triglycerides (MCT) was obtained from Delaware (Porto Alegre, Brazil).

2.2. Goldenberry extract

The extracts were obtained following the method used by Codevilla et al. (2018). Fresh fruit samples (15 g) were ground and 25 mL of extraction solvent ethanol 60% (v/v) was added with magnetic stirring protected from light for two hours. The extracts were filtered through a 0.45 μm polyamide filter (Sartorius Stedim Biotec) and stored until analysis.

2.3. Determination of total phenolics content

The determination of total phenolic compounds was performed by spectrophotometric Folin-Ciocalteu method (Chandra & Mejia, 2004). Sample of 1 mL of goldenberry extracts were mixed with 0.5 mL of 2 mol L⁻¹ Folin Ciocalteu reagent. After 5 minutes was added 2 mL of 20% calcium carbonate. The mixture was kept at room temperature for 10 minutes and the absorbance was measured at 730 nm.

For the nanoemulsions an aliquot was diluted to concentration of 7 mg mL⁻¹ with ultrapure water and it was sonicated for 10 minutes. Then, the sample was centrifuged (Hitachi, Chiyoda, Japan) at 20.000 rpm for 10 min and the supernatant is collected for analysis of total phenolics. Gallic acid was used as reference solution

for calibration curve from 0.001 to 0.04 mg mL⁻¹. The results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per 100 gram of fresh fruit (mg GAE 100 g⁻¹).

2.4. Total carotenoid content

The determination of total carotenoid content was performed according to the method described by Rodriguez-Amaya (2001), with adaptations. 5g of sample, 2 g of celite and 20 mL of ice-cold acetone was mixed, with stirring, for 10 minutes. After the material was filtered through Büchner funnel with filter paper, the sample was washed with acetone until the extract became colorless. The filtrate was transferred to a separatory funnel, where 30 mL of petroleum ether and 30 mL of distilled water were added to the sample for the separation of the carotenoids and acetone. The bottom phase was discarded, distilled water was added again and the procedure was repeated 4 times for complete removal of the acetone. The top extract was transferred to a 50 mL volumetric flask and the volume was filled with petroleum ether. The samples were read at 450 nm (Agilent 8453 UV/Vis, Santa Clara, United States) using petroleum ether as blank. The total carotenoid content was calculated using the following Equation (1)

$$C = ((A \times V \times 10^4) / A^{1\%}_{1\text{cm}} \times g) \times 2.5$$

Equation (1). Where C is total carotenoid content, A is the absorbance of sample, V is final volume of the extract, $A^{1\%}_{1\text{cm}} = 2592$ is absorption coefficient of petroleum ether, g is the mass fresh fruit and 2.5 is the dilution factor. The total carotenoid was expressed as $\mu\text{g } \beta\text{-carotene g}^{-1}$ fresh fruit.

2.5. Antioxidant capacity of goldenberry extract

The 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method (Brand & Williams, 1995) was used with some modifications. A calibration curve was prepared with a standard solution of Trolox at 0.25 to 1.75 mM. Stock solution was prepared by dissolving 0.024 g of DPPH in 100 mL of ethanol. The sample was diluted with ethanol. After this the solution was agitated by using a vortex for 1 min. Four dilutions of the extract of 12, 36, 48 and 60 mg of fruit diluted in ethanol was mixed with 3.9 mL of DPPH solution and kept in the dark for 24 h. The absorbance was measured at 517 nm against a blank of ethanol by using UV/VIS Spectrophotometer. As a positive control,

3.9 mL of DPPH solution was added to 100 mL ethanol and the absorbance was measured immediately. Antioxidant capacity was expressed in $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$ fresh fruit.

2.6. Preparation of nanoemulsions

A previous mapping was done using a ruler, pen and aluminum foil. Three depths (bottom, middle and surface of the bath) were evaluated. The formulations were prepared according to the method described by Bouchemal et al. (2004) with some modifications. The organic phase consisting of Span 80 (0.077 g), MCT (the masses of the reagent varied according to RSM), goldenberry extract (20 mg mL^{-1}) and acetone (27 mL) was added into the aqueous phase, consisting of Tween 80 (0.077 g) and ultrapure water (54 mL) under 37 kHz frequency sonication in the ultrasonic bath with a volume of 9.0 L (Elma Ultrasonic, Singen, Germany) at room temperature. After the time defined by RSM, the organic solvent was evaporated under reduced pressure in a rotatory evaporator (Rotavapor R-210, Buchi, Flawil, Switzerland) and the final volume of the formulation was fixed at 10 mL (20 mg mL^{-1} of goldenberry extract).

2.7. Experimental design

Response surface methodology was used to evaluate the individual as well as the combined effects (MCT weight, sonication time and amplitude) on the droplet size and polydispersity index nanoemulsion using the Central Composite Design (CCD). The experimental design along with coded and un-coded values is given in Table 1. Each independent variable contains three levels, -1, 0 and +1. Twenty combinations, including six replicates at central point was chosen randomly according to CCD, which are listed in Table 1.

2.8. Physicochemical analysis of nanoemulsion

The mean droplet diameter and polydispersity index of the particles was determined by the photon correlation spectrometer (ZetaSizer Nanoseries, Malvern, United Kingdom) after dilution of an aliquot of nanoemulsion in purified water (1:500). The zeta potential was measured by electrophoretic mobility, using the same equipment, and the samples were diluted in a 10 mM NaCl solution (1:500). Analyses were performed to verify the presence of microparticles in the sample using laser diffractometry (Master Sizer 3000 E, Malvern, United Kingdom). The pH values of

nanoemulsions were determined by immersing directly the electrode in the samples using a calibrated potentiometer (MS Tecnoyon, Piracicaba, Brazil).

Table 1- Central composite design employed for nanoemulsions preparation.

Run	PtType	Time (min)	MCT (g)	Amplitude (%)
1	0	7	0.160	70
2	-1	7	0.092	70
3	0	7	0.160	70
4	-1	7	0.160	103.6
5	1	4	0.120	50
6	1	10	0.120	50
7	-1	12.03	0.160	70
8	-1	7	0.160	36.36
9	0	7	0.160	70
10	1	4	0.200	90
11	1	10	0.200	90
12	1	10	0.200	50
13	-1	1.57	0.160	70
14	-1	7	0.227	70
15	1	4	0.200	50
16	1	4	0.120	90
17	0	7	0.160	70
18	0	7	0.160	70
19	0	7	0.160	70
20	1	10	0.120	90

2.9. Evaluation of stability of nanoemulsions

Stability studies on optimized nanoemulsion were performed by keeping the sample at refrigerated temperature (7 °C) and room temperature (25 °C) for the period of 60 days. The stability of the nanoemulsions containing extract of goldenberry was determined in term of droplet size, zeta potential, polydispersity index, total phenolic compounds and pH during storage.

2.10. Statistical analysis

The data were evaluated by means of variance analysis (ANOVA), and the means were compared by the Tukey test, considering the level of significance of 5% ($p < 0.05$) using Statistica 7 software.

3. Results and discussion

The quantity and profile of the phenolics vary according to the type, variety and degree of maturation of the fruit, as well as the climatic and edaphic conditions of the crop. The content of total phenolic compounds for the ethanolic extract of goldenberry stored at room temperature was 153.75 ± 1.12 mg GAE 100 g^{-1} , for the extract stored under refrigeration at 7 °C, the content was 151.78 ± 1.07 mg GAE 100 g^{-1} . Carrasco & Zelada (2008) found 154 ± 3 mg GAE 100 g^{-1} for methanolic extracts of goldenberry from Huancayo, Peru.

Carotenoids are a group of pigments that have yellow to red coloration, and can be found in goldenberry. The result obtained in this study for the concentration of carotenoids was 28.16 ± 0.35 $\mu\text{g } \beta\text{-carotene } \text{g}^{-1}$. This calculated value is substantially greater than the values found by Rutz et al. (2012) and Oliveira (2016), 10.83 ± 0.67 and 5.95 ± 1.23 $\mu\text{g } \beta\text{-carotene } \text{g}^{-1}$, respectively. Some variables explain this difference, such as the fact that they are fruits from different regions of the country, different maturation stage, also the harvest season can be different, as well as post-harvest storage, processing and preparation of the sample (Silva et al., 2010).

Some of the medicinal properties of the fruit of goldenberry are associated with the antioxidant capacity of polyphenols present in the fruit. The DPPH radical absorbs at 515 nm and this absorption is inhibited in the presence of antioxidants compounds (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995). This reduction in absorbance is related to the antiradical efficiency of the sample, extract or standard. The

calculated antioxidant activity of goldenberry was $8.71 \pm 0.32 \mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$ fresh fruit. This value is close to the values found by Oliveira (2016) and Rutz et al. (2012) 7.24 ± 0.40 and $9.71 \pm 0.15 \mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$, respectively, for the same fruit species. The results of this method may change during fruit storage due to degradation of vitamin C and phenolic compounds, reducing the ability to eliminate free radicals. Factors such as pH, temperature, presence of oxygen and enzymes help in the degradation of ascorbic acid (Puente et al., 2011). According to Frankel (1993), plant antioxidant capacity values are largely influenced by genetic factors, environmental conditions, as well as the degree of maturation, plant variety by the solvent and the extraction technique employed.

Considering the values found for antioxidant activity and total content of carotenoids, there is a high antioxidant power of the goldenberry extract, adding to the total phenolic content, observing a significant amount of bioactive compounds.

Response Surface Methodology is useful in three different methods such as statistical experimental design, in particular two level factorial or fractional factorial design; regression modeling techniques, and optimization methods (Morshedi, Akbarian, 2014). From the experimental design, the influence of the formulation variables on responses can be determined and the effects of factor interaction can be investigated. Using RSM is possible the reduction in the number of experimental needed to evaluate multiple variables, and it is less laborious and time consuming compared to studying one-variable at a time. Moreover, this experimental methodology generates a mathematical model which is presented in graphical form (Zainol et al., 2012).

In this way, a central composite design was applied to optimize the main variables that could influence the droplet size, polydispersity index, granulometry (D [4;3]) and Span of nanoemulsion: MCT weight, sonication time and amplitude. Fig. 1A shows the surface plot for values of granulometry as a function of amplitude and sonication time. The results show that particle size is influenced by the sonication time and better results were found when the sonication time was larger. According to Ngan et al. (2014) it can be due to the longer duration for the action of ultrasonic radiation forces to disperse the emulsion droplets into smaller sizes. Amplitude choice in a sonication process is critical, because it is proportional to the intensity of sonication and its increase is related to an increase in the sonochemical effects. A minimum amplitude is required to achieve the cavitation threshold, whereas high

amounts can lead to rapid deterioration of the ultrasonic transducer resulting in liquid agitation instead of cavitation and in poor transmission of the ultrasound through the liquid media (Kaltsa et al., 2014). The increase in amplitude led to an increase in the droplet size. Then, the results showed that after 8 min with 40% of amplitude, the droplet size was smaller than 0.6 nm.

Figure 1B and 1C show, respectively, the variation of the drop size in relation to the amplitude and amount of MCT. Fig. 1D show the variation of particle size and PDI with MCT. Increases in MCT concentration resulted in increased droplet size. When was used an amount of 0.120 g of MCT and sonication time of 10 minutes, it was possible to have a particle size in the range of 0.4-0.6 μm and PDI less than 0.110. The amount of MCT in the formulation is extremely important as this is one of the determining factors in the particular size and consequently the stability of the system.

The results shown in Fig. 1 indicate the best condition of 0.120 g of MCT, 40% amplitude and sonication time of 10 min. After the optimization procedure, five formulations were prepared and it was possible to observe that the nanoemulsions presented a milky-white appearance and Tyndall effect, which is the result of the Brownian movement of colloidal systems.

Equation 2 shows the relation of the MCT, amplitude (A), time (T) and D [4;3] variables:

$$D [4;3] = 4,41 - 0,230 T - 21,4 \text{ MCT} - 0,0443 A - 0,00050 T^*T + 8,6 \text{ MCT}^*\text{MCT} + 0,000025 A^*A + 0,904 T^*\text{MCT} + 0,00145 T^*A + 0,219 T^*A$$

Equation 3 shows the relation of the variables MD, amplitude, time and MCT (Fig. 1B and 1C):

$$\text{MD (nm)} = 191 + 3,79 T + 131 \text{ MCT} - 0,47 A + 0,274 T^*T + 545 \text{ MCT}^*\text{MCT} - 0,00533 A^*A - 75,8 T^*\text{MCT} + 0,0387 T^*A + 3,19 \text{ MCT}^*A$$

Equation 4 shows the relation of PDI, amplitude, time and MCT (Fig. 1D):

$$\text{PDI} = 0,000 - 0,0035 T + 0,72 \text{ MCT} + 0,00168 A + 0,000073 T^*T - 1,13 \text{ MCT}^*\text{MCT} - 0,000012 A^*A + 0,0219 T^*\text{MCT} - 0,000040 T^*A - 0,00109 \text{ MCT}^*A$$

For the reproducibility test, 3 nanoemulsions were elaborated on 3 different days using the best condition defined by RSM. The samples had the same pH range

without significant difference and drop size remained in the range of 250 ± 12 nm without significant difference.

Droplet size measurements are a good indicator of the formulation stability. A fast droplet size increase indicates low system stability (Bernardi et al., 2011). Although the statistical analysis showed a significant difference between samples ($p < 0.05$) of nanoemulsion under refrigeration (NRE) and at room temperature (NRT), the formulations kept its nanometric characteristics 60 days after preparation (Fig. 2A) with mean droplet size (MD) of approximately 250 nm and polydispersion index of 0.15, indicating the high homogeneity of the system.

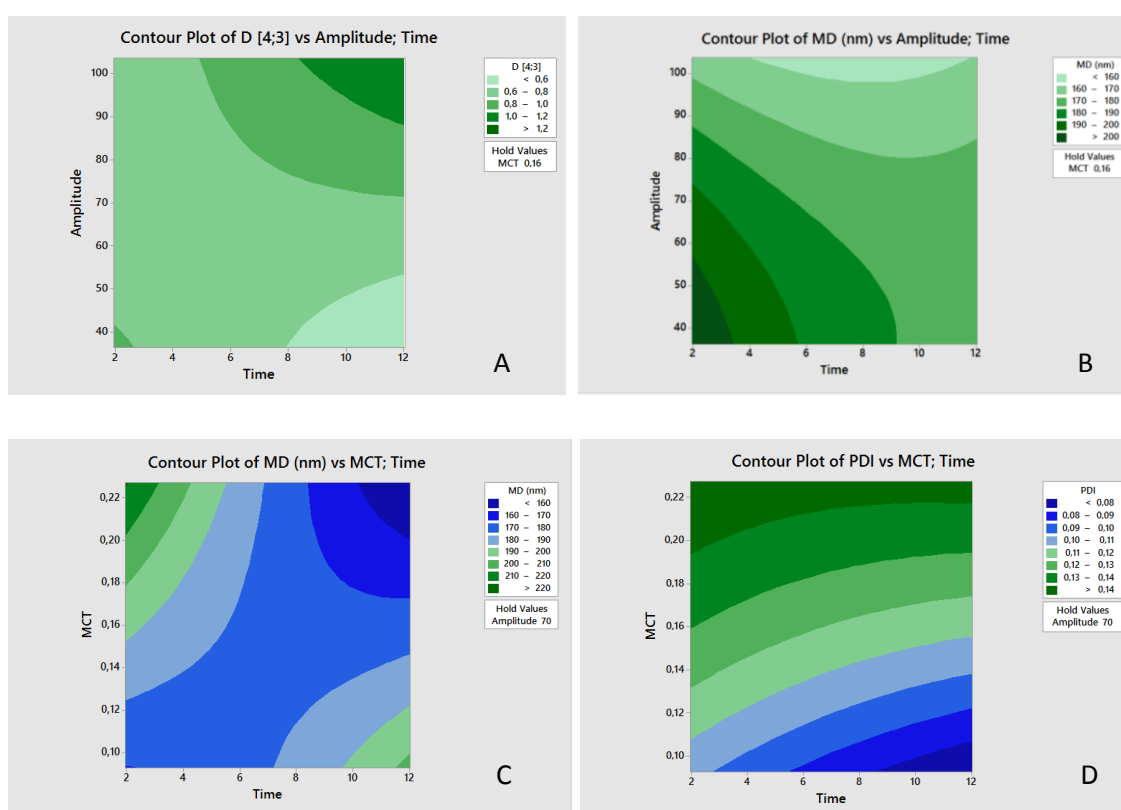


Fig. 1. Contour plot graphs of the values of the conditions proposed by RSM.

The zeta potential plays an important role in stabilizing of emulsions because it reflects the surface potential of the droplets. The zeta potential slightly decreased at the end of the 60 days for both samples. However this does not represent lack of stability, once do not happened droplet aggregation, and the mean droplet size remained low. Changes in the pH value indicate the occurrence of chemical reactions that suggest degradation of the formulation. The pH value of NRE had no significant difference ($p > 0.05$) whereas the pH of NRT had a small increase ($p < 0.05$) indicating

some degradation of the constituents of the formulation (Fig 2B). The pH of the extracts, in refrigeration (ERE) and at room temperature (ERT) remained unchanged, in the range of 4.20 and 4.60 over the 60 days (data not shown).

The total phenolic content for the nanoemulsion at room temperature (NRT) do not decreased in the first 30 days. After 60 days, the NRT had a decrease of 13% in total phenolic content in relation to day 0. Nanoemulsion under refrigeration (NRE) decreased by about 15% from day 0 to day 30, remaining the result without significant difference for 60 days (Fig. 2D). Goldenberry extracts showed a 56% reduction in total phenol content in the 30 days of storage for ERE and 47% for ERT in relation to day 0. At the end of the 60 days, the total phenolic content of ERE had no significant difference in relation to the 30 days and for ERT had a reduction of 63% in relation to day 0. These results demonstrate that the association of the extract of goldenberry in nanoemulsified systems can protect the phenolic compounds when compared to the free extract.

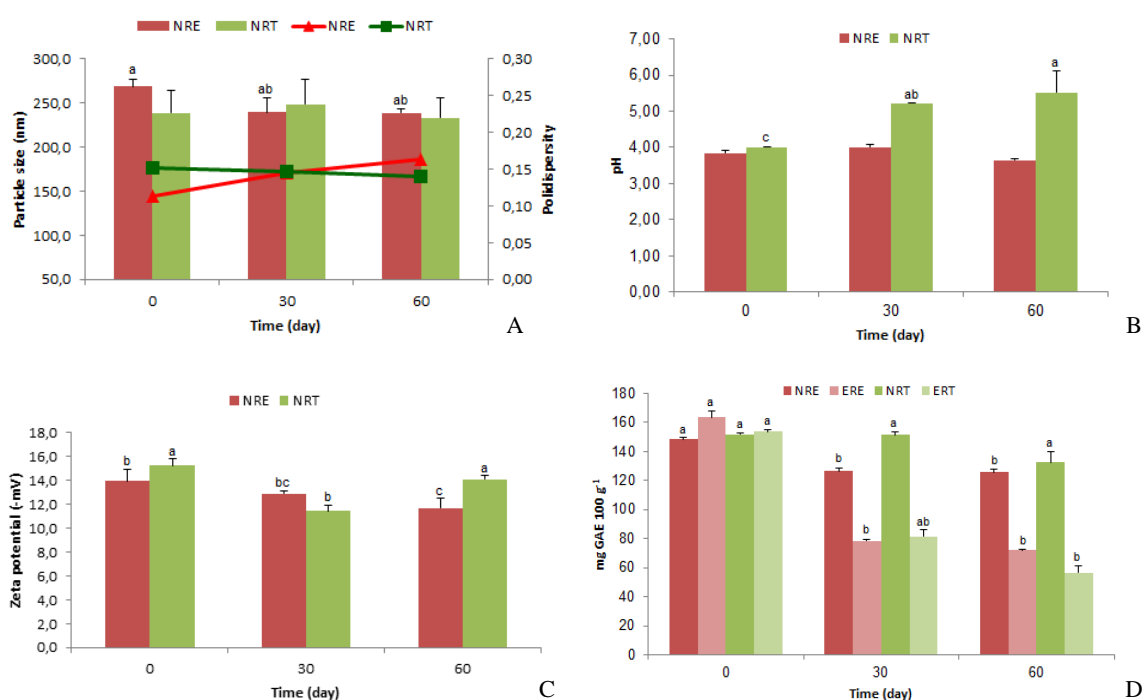


Fig. 2. Evaluation of stability of nanoemulsion in refrigeration (NRE), nanoemulsion in room temperature (NRT), extract in refrigeration (ERE) and extract in room temperature (ERT). (A) Particle size, (B) Zeta potential, (C) pH, (D) Total phenolics content. Statistically significant values $p < 0.05$.

Due to the ultrasound being a free radical generator, there was concern regarding loss of phenolic compounds from the extract in the nanoemulsification process. In this study, no losses were observed in the total phenolic content after the nanoemulsification process, corroborating with Ordóñez-Santos et al. (2017), which verified an increase in the total phenolic content in goldenberry juice after the sonication of the fruit for 20 minutes. They suggested that the degradation of ascorbic acid and the increase of total phenols may have acted as antioxidant against the free radicals generated during the ultrasound processes.

4. Conclusion

The current study showed that using response surface methodology was possible to describe and predict the best condition to obtain optimize nanoemulsion containing extract of goldenberry with low particle size, polydispersion index and granulometry index. The fruit presented phenolics and carotenoids, thus presenting good antioxidant activity. The extracts in their free form had significant losses in the total phenolic content throughout the stability evaluation, whereas in the nanoemulsion form the phenolic compounds remained without much difference between day 0 and the end of the 60 days. The stability evaluation period of the formulations showed an effective protection of these compounds and that the cooling is the best storage option for the nanoemulsions.

References

- Avila, J. A.; Moreno, P.; Fischer, G.; Miranda, D. (2006). Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18 °C. *Acta Agronomica*, 55(4), 29-38.
- Bazana, M. T.; Codevilla, C. F.; Silva, C. B.; Menezes, C. R. (2015) Nanoencapsulação de licopeno em alimentos. *Ciência e Natura*. 37, 38-48.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
- Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. (2004). Nanoemulsion formulations using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*. 280(1), 241-251.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28(1), 25-30.
- Carrasco, R. R. & Zelada, C. R. E. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev Soc Quím Perú*. 74 (2), 108-124.
- Chandra, S.; Mejia, E.G. (2004). Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (11), 3583-3589.
- Chang, Y., & McClements, D. J. (2014). Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: Influence of the oil phase, surfactant, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(10), 2306–2312.
- Codevilla, C. F.; Bazana, M. T.; Silva, C. B.; Barin, J. S.; Menezes, C. R. (2015). Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. *Ciência Rural*. 37, 142-151.
- Codevilla, C. F.; Tischer, B.; Gindri, A. L.; Nogueira-Librelotto, D. R.; Barin, J. S.; Silva, C. B.; Rolim, C. M. B.; Zepka, L. Q.; Menezes, C. R. (2018). Cytotoxicity and antioxidante of goldenberry extracts obtained with high intensity ultrasound. *Ciência Rural*. in press

- CCI (2000). -Corporación Colombiana Internacional. Inteligencia de mercados. Perfil de producto. Uchuva. Revista Inteligencia de Mercados, 33(13), 1-12.
- Frankel, E.N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidant and oxidative stability in food lipids. Trends in Food Science & Technology. 4, 220-225.
- Gaikwad, S. G., & Pandit, A. B. (2008). Ultrasound emulsification: Effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size. Ultrasonics Sonochemistry, 15(4), 554–563.
- Godoi, S. N.; Quatrin, M. P.; Sagrillo, M. R.; Nascimento, K.; Wagner, R.; Klein, B.; Santos, R. C. V. S.; Ourique, A. F. (2017). Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing Eucalyptus globulus Oil. BioMed Research International.
- Komaiko, J. & McClements, D. J. (2014). Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. Journal of Colloid and Interface Science. 425, 59-66.
- Kulkarni, V. M. & Rathod, V. K. (2014). Mapping of an ultrasonic bath for ultrasound assisted extraction of mangiferin from Mangifera indica leaves, 21, 606-611.
- Leong, T., Wooster, T., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. Ultrasonics Sonochemistry, 16(6), 721–727.
- Licodiedoff, S.; Koslowski, L. A. D.; Ribani, R. H. (2013). Flavonols and antioxidant activity of Physalis peruviana L. fruit at two maturity stages. Acta Scientiarum. 35(2), 393-399.
- Mehmood, T. (2015). Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. Food Chemistry. 183, 1-7.
- Mehmod, T.; Ahmad, A.; Ahmed, A.; Ahmed, Z. (2017). Optimization of olive oil based O/W nanoemulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach. Food Chemistry. 229, 790-796.
- Nakabayashi, K.; Amemiya, F.; Fuchigami, T.; Machida, K.; Takeda, S.; Tamamitsub, K.; Atobe, M. (2011). High clear and transparent nanoemulsion preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification, Chem. Commun. 47, 5765-5767.

- Oliveira, S. F. (2016). Estudo das propriedades físico-químicas e avaliação de compostos bioativos em *Physalis peruviana*. Masters dissertation. Instituto Politécnico de Viseu. 1-120.
- Ordóñez-Santos, L. E.; Martínez-Gíron, J.; Arias-Jaramillo, M. E. (2017). Effect of ultrasound treatment on visual color, vitamin C, total phenols, and carotenoids content in Cape gooseberry juice. *Food Chemistry*. 233, 96-100.
- Pinheiro, A. C.; Cerqueira, M. A.; Vicente, A. A. (2013). Nanotecnologia como ferramenta para produzir novos alimentos funcionais: vantagens e precauções. *Tecno hospital- Revista de engenharia e gestão da saúde*. 59(5), 22-25.
- Puente, L. A.; Pinto-Muñoz, C. A.; Castro, E. S.; Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*. 44(7), 1733-1740.
- Rebolleda, S.; Sanz, M. T.; Benito, J. M.; Beltrán, S.; Escudero, I.; San-José, M. L. G. (2015). Formulation and characterization of wheat bran oil-in-water nanoemulsions. *Food Chemistry*. 167, 16-23
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in food. Washington: International Life Sciences Institute. 1-64.
- Rufato, L.; Rufato, A.R.; Schlemper, C.; Lima, C.S.M; Kretzschmar, A.A. (2008). Aspectos técnicos da cultura da *Physalis*. Lages: CAV/ UDESC; Pelotas: UFPel. 1-100.
- Rutz, J. K.; Voss, G. B.; Jacques, A. C.; Pertuzatti, P. B. Barcia, M. T.; Zambiazzi, R. C. (2012). Caracterização de geleia de *Physalis peruviana* L. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 23 (3), 369-375.
- Silva, M. L. C.; Costa, R. S.; Santana, A. S. ; Koblitz, M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Ciências Agrárias*. 31(3), 669-682.
- Silva, K. N.; Agra, M. F. (2005). Estudo fármaco botânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(4), 344-351.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., & Zhao, J. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of b-carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(3), 1300–1306.

MANUSCRITO 2

Caracterização físico-química e avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* de nanoemulsão contendo extrato de *Physalis peruviana*

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Ciência Rural*

Resumo

Nanoemulsão do tipo O/A com extrato de *Physalis peruviana* foi elaborada usando método de alta energia com banho de ultrassom. Foi feita a caracterização físico-química da formulação com as determinações de pH, diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. A toxicidade da nanoemulsão foi avaliada utilizando ensaios *in vitro* com linhagens tumorais e não tumorais, e *in vivo* usando *Caenorhabditis elegans*. A nanoemulsão obteve o pH de 3,84, diâmetro médio de gotícula de 268 ± 7 nm, PDI de 0,113 e potencial zeta de $-13,94$ mV. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade empregando células não tumorais indicam que o extrato associado e não associado à nanoemulsão manteve a viabilidade celular em diferentes concentrações testadas. Nos ensaios utilizando linhagem tumoral, observa-se que a nanoemulsão contendo o extrato apresentou maior atividade antitumoral que o extrato livre, dependente da concentração. Quanto aos ensaios *in vivo*, os vermes não apresentaram alterações na sua taxa de sobrevivência.

Palavras-chave: *Physalis peruviana*, nanoemulsão, citotoxicidade, *C. elegans*

1. Introdução

Physalis peruviana pertence à família Solanaceae, com aproximadamente 120 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América. Essa fruta possui compostos bioativos com propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatória, antitumoral e ação imunossupressora (Codevilla, et al., 2018). Esses compostos possuem baixa estabilidade quando expostos a altas temperaturas, luz e oxigênio. Dessa forma, a nanoemulsificação é uma opção para proteger esses compostos da degradação e melhorar sua distribuição e sua biodisponibilidade (Ezhilarasi, et al., 2013).

A nanoemulsão do tipo óleo em água (O/A) é um sistema que incorpora dentro da formulação substâncias bioativas de um extrato natural (Mason et al., 2006). A faixa de tamanho de uma nanoemulsão fica entre 10 e 1000 nm, o que confere uma estabilidade bem maior quando comparada a emulsões com tamanho de gota maior (Solans et al., 2005).

A toxicidade das nanoemulsões depende da utilização de excipientes biodegradáveis e biocompatíveis (Bruxel et al., 2012). Pode haver alguns riscos associados à ingestão oral de nanoemulsões, como sua capacidade de alterar o destino biológico de componentes bioativos no trato gastrointestinal e a toxicidade potencial de alguns dos componentes utilizados na fabricação (McClements & Rao, 2011).

Os ensaios de viabilidade celular são utilizados atualmente, com finalidade de investigação prévia da toxicidade de um nanomaterial (Conti et al., 2012). Além dos componentes da formulação, a concentração, a população e o tipo de nanopartículas devem ser levados em conta quanto à toxicidade (Elsaesser & Howard, 2012). Propriedades como tamanho, forma e estrutura de nanopartículas foram reconhecidas por estarem relacionadas à citotoxicidade (Mendes et al., 2015).

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) é um nematoide de vida livre, inserido como modelo animal em 1965 por Sidney Brenner (Riddle et al., 1997). Atualmente, é amplamente utilizado como modelo para estudos *in vivo*, devido sua capacidade de crescimento em placas de Petri, utilizando *Escherichia coli* como única fonte de alimento, além de sua transparência e curto ciclo de vida (cerca de 3 dias à 20º) (Gonzalez-Moragas; Roig; Laromaine, 2015). Outra vantagem do uso deste modelo,

é que os vermes apresentam muitos processos fisiológicos básicos que são conservados em relação aos humanos, permitindo a correspondência e comparação de mecanismos moleculares (Kaletta e Hengartner, 2006).

Esse estudo objetivou, além da caracterização físico-química da nanoemulsão contendo extrato de *Physalis peruviana*, a verificação da sua toxicidade em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2. Material e métodos

2.1. Materiais

Physalis peruviana in natura foi adquirida de Italbraz (Vacaria, Brasil) localizada a 28:0:44 S e 50:56:02 W. Etanol e acetona foram obtidos da Dinâmica (São Paulo, Brasil). Tween 80 foi adquirido de Synth (São Paulo, Brasil). Span 80 foi adquirido de Fluka (São Paulo, Brasil) e Triglicerídeos de Cadeia Média (TCM) obtidos de Delaware (Porto Alegre, Brazil.). MTT e DMSO foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A cepa do tipo selvagem de *C. elegans* N2 (var. Bristol) foi fornecida pelo Caenorhabditis Genetics Center (Universidade de Minnesota, EUA). A cepa foi mantida a 20 °C em meio de crescimento de nematódeos (NGM) em placas semeadas com *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento (Brenner, 1974).

2.2. Preparação do extrato

O extrato hidroalcoólico da fruta foi preparado seguindo a metodologia desenvolvida por Codevilla et al. (2018). Uma massa de 15 g de fruta fresca foi pesada, macerada e misturada a 25 mL de etanol 60% (v/v) e submetida a agitação (200 rpm) pelo período de 2 horas, ao abrigo da luz. Após, o extrato foi filtrado num filtro de poliamida (Sartorius Stedim Biotec) com porosidade de 0,45 µm e estocado sob refrigeração. A concentração do extrato de physalis (EP) foi de 600 mg mL⁻¹

2.3. Preparação da nanoemulsão

As formulações contendo o extrato e sem extrato (denominada nanoemulsão branca) foram elaboradas seguindo a metodologia de Bouchemal et al. (2004) com modificações. Foram utilizados na fase orgânica 0,077 g de Span 80, 0,120 g de TCM, 20 mg mL⁻¹ de extrato de Physalis e 27 mL de acetona. Após a homogeneização dessa fase, a mesma foi vertida, sob sonicação por 10 minutos, em um banho de ultrassom com 37 kHz de frequência e 40% de amplitude (Elma

ultrasonic, Singen, Alemanha), na fase aquosa previamente homogeneizada, constituída por 0,077 g de Tween 80 e água ultrapura. O solvente orgânico foi removido por meio de um rotaevaporador (Rotavapor R-210, Buchi, Suíça) e o volume final da formulação foi fixado em 10 mL.

2.3.1. Caracterização físico-química

O diâmetro médio de gotícula e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados pela análise de espectrometria de correlação de fótons (ZetaSizer Nanoseries, Malvern, Reino Unido) com diluição de uma alíquota da formulação em água ultrapura na proporção de 1:500. O potencial zeta foi medido por meio da mobilidade eletroforética, utilizando o mesmo equipamento, com a nanoemulsão diluída em uma solução de NaCl 10 mM na proporção de 1:500. A análise de pH foi realizada utilizando um pHmetro (MS Tecnocon, Piracicaba, Brasil), previamente calibrado, com imersão direta do eletrodo na formulação.

2.4. Avaliação da toxicidade

2.4.1. Toxicidade *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro*, tanto do extrato de *Physalis peruviana* quanto das nanoemulsões, branca (NB) e contendo extrato (NP), foi feita usando linhagens celulares não tumorais, fibroblastos de origem murina (3T3) e células de câncer de mama de origem humana (MCF-7). As células 3T3 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1×10^5 células mL⁻¹. Após a incubação durante 24 h sob 5% de CO₂ a 37 °C, o meio gasto foi substituído por 100 µL de meio fresco contendo o extrato, nanoemulsão contendo extrato e branca na faixa de concentração 15,6-2000 µg mL⁻¹ ou com 100 µL de meio apenas para as células de controle não tratadas. Após 24 h, o meio foi removido e foram adicionados 100 µL de solução de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (0,5 mg mL⁻¹). As placas foram ainda incubadas durante 3 h, após o meio ter sido removido. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de DMSO ou de uma solução contendo 50% de etanol absoluto e 1% de ácido acético em água destilada. As absorbâncias das soluções foram medidas a 550 nm usando o leitor de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, CA, EUA). A citotoxicidade do extrato e das nanoemulsões foi expressa como percentagem de viabilidade em relação às células de controle não

tratadas (a densidade óptica média de células não tratadas foi fixada a 100% de viabilidade).

2.4.2. Toxicidade in vivo

2.4.2.1. Manutenção dos animais

C. elegans da cepa N2 (tipo selvagem) foi obtida através do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) e mantida em placas NGM (meio de crescimento para nematoides) semeadas com bactérias *E. coli* OP50 a 20 ° C (Brenner, 1974). Os vermes no estágio adulto jovem usados em todas as exposições, foram obtidos por um processo de sincronização, que consiste em expor os vermes grávidos a uma solução de lise (1% NaOCl, 0.25 M NaOH), para separar os ovos dos vermes. Após 14 h os ovos eclodem e liberam as larvas de L1, que eram adicionadas a superfície de placas NGM contendo *E. coli* OP50, onde permaneciam à 20 °C até alcançarem o estágio adulto jovem.

2.4.2.2. Tratamento

C. elegans no estágio adulto jovem foram expostos a 0,5; 1,0 e 2,0 mg mL⁻¹ de solução de extrato hidroalcoólico de *Physalis peruviana* (EP), nanoemulsão contendo o extrato (NP) e nanoemulsão branca (NB) ou veículo durante 2 h a 20 °C. Para a solução EP, o bioativo foi dissolvido em metanol (concentração final de 1%) e as nanoemulsões NP e NB foram diluídas em água. Os tratamentos foram realizados com cerca de 1000 vermes por grupo em tampão M9 (42 mM de Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 22 mM, 8,6 mM de NaCl e 1mM de MgSO₄). Após as 2 h, os vermes foram lavados 3 vezes e transferidos para placas NGM semeados com *E. coli* OP50. Após 24 h a 20 °C, as avaliações foram realizadas.

2.4.2.3. Ensaio de sobrevivência

O ensaio de sobrevivência foi realizado seguido protocolo previamente descrito, com algumas modificações (Velasques *et al.*, 2018). Cerca de 100 nematoides por grupo foram avaliadas quanto a viabilidade, em um microscópio Nikon E200 (Tóquio, Japão). Os animais que reagiram a um estímulo mecânico foram classificados como vivos, e os animais não-respondentes foram classificados como mortos. As análises foram realizadas em três ensaios independentes. Os resultados foram expressos como percentual de sobreviventes.

2.4.2.4. Taxa de batimento faríngeo

O número de batimentos faríngeos em um intervalo de 10 s (Huang et al., 2004) foi medido com um microscópio Nikon E200 (Tóquio, Japão). As análises foram realizadas em três ensaios independentes com dez vermes por grupo. Os resultados foram expressos como batimentos faríngeos/minuto.

2.4.2.5. Ensaio ciclo de defecação

As frequências de defecação foram realizadas através da observação da duração entre os passos BPC (a contração do músculo posterior do corpo) de três defecações consecutivas (Migliori et al., 2011) em um microscópio Nikon E200 (Tóquio, Japão). As análises foram realizadas em três ensaios independentes com dez vermes por grupo. Os resultados foram expressos como ciclo de defecação (s).

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização físico-química das nanoemulsões

As nanoemulsões apresentaram diâmetro médio de 268 ± 7 nm, PDI de 0,113 e potencial zeta de $-13,94$ mV. O índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi baixo ($<0,3$), indicando a formação de sistemas monodispersos. O valor de pH fornece informações sobre a estabilidade do sistema, pois sua redução pode indicar a presença de ácidos graxos livres na formulação, provenientes da hidrólise do sistema tensoativos (fosfolípidos), e dos triglicerídeos do núcleo oleoso (Klang; Benita, 1998). O extrato hidroalcoólico de *physalis* apresentou pH ácido de 4,40 (Codevilla et al., 2018), consequentemente, a nanoemulsão associada apresentou também pH ácido de 3,84. O baixo valor de pH da formulação deve-se ao conteúdo de ácido fenólicos contidos no extrato de *Physalis peruviana* (Rockenbach et al., 2008).

O potencial zeta negativo da nanoemulsão se deve ao fato de as moléculas de polissorbato 80 (Tween 80) se adsorverem a interface óleo-água, pois mesmo sendo um tensoativos não-iônico, a presença de impurezas, tais como os ácidos graxos, origina gotículas de óleo de carga negativa (Salvia-Trujillo et al., 2015).

3.2. Toxicidade

3.2.1. Avaliação *in vitro*

Em função de sua área superficial estar aumentada, os nanomateriais poderão causar efeito tóxico dentro do organismo, que não serão aparentes como nos materiais de tamanho macro (Sozer; Kokini, 2009). Assim, a avaliação da citotoxicidade em linhagens de células não-tumorais é uma importante ferramenta para prever riscos na absorção dos compostos bioativos e uma potencial toxicidade dos mesmos (Eisenbrand et al., 2002).

Foi observado que houve redução na viabilidade das células 3T3 (Fig. 1-A) de 8 a 11% quando expostas ao EP. No entanto, essa redução não representa citotoxicidade do extrato frente às células, pois para que seja considerado tóxico, a viabilidade tem de ser inferior a 75% (ISSO 10993-5) (Wang et al., 2015). Codevilla e colaboradores (2018) também observaram que não houve citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *Physalis peruviana*. Para NP, não houve redução na viabilidade celular, ou seja, não mostrou citotoxicidade frente às células 3T3 (Fig. 1-A). Já a NB influenciou cerca de 9% de redução no crescimento quando as células foram expostas a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ de formulação (Fig. 1-A). Entretanto, os resultados ficaram superiores a 80% de viabilidade celular, indicando que as formulações não apresentaram citotoxicidade. Autores têm destacado a baixa citotoxicidade de nanoemulsões quando associadas a óleos essenciais ou extratos vegetais (Rocha-Filho et al., 2017; Mendes et al., 2015).

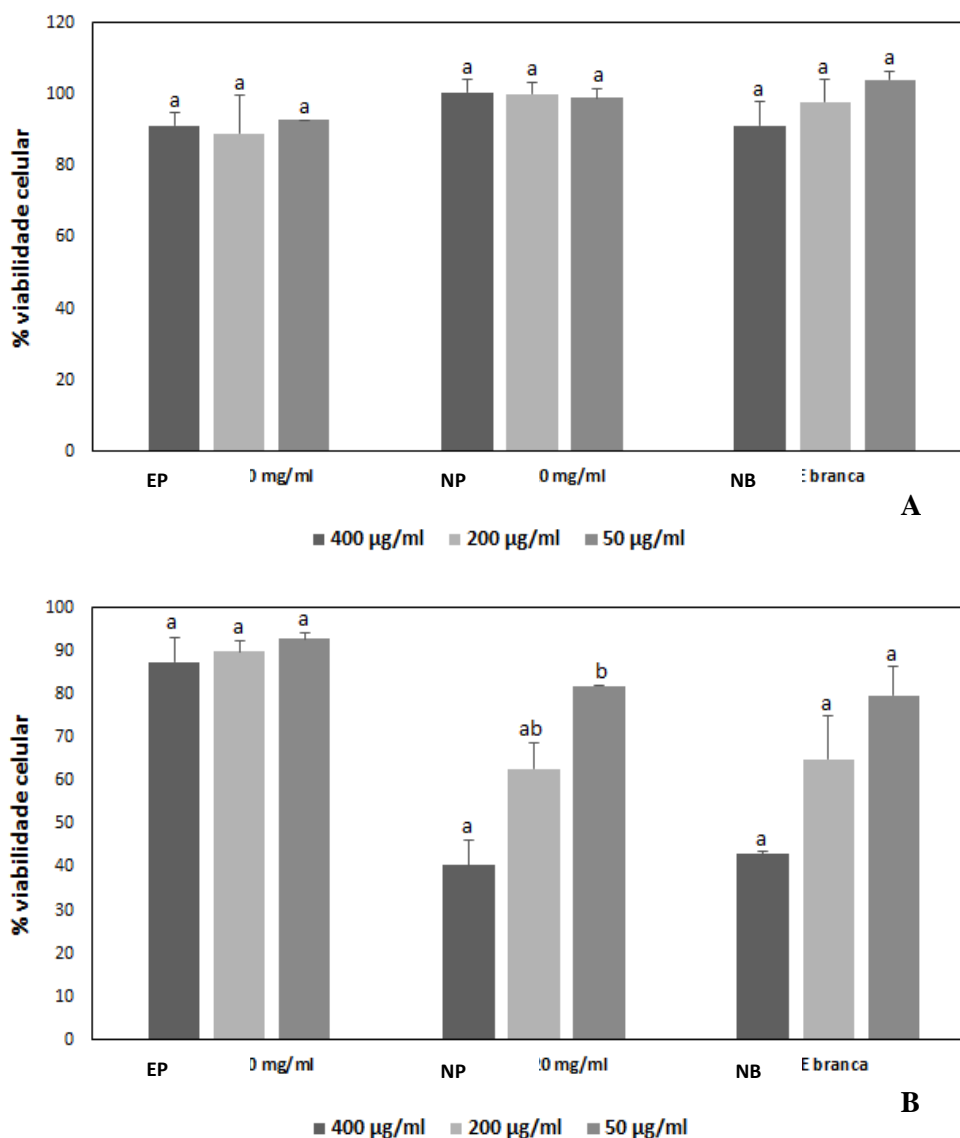


Fig. 1- Gráficos da viabilidade celular após exposição das células com amostras extrato livre (EP), nanoemulsão contendo extrato (NP) e nanoemulsão branca (NB). (A) gráfico de viabilidade das células 3T3 (não tumorais); (B) gráfico de viabilidade das células MCF-7 (tumor mamário).

Para as células MCF-7 (tumorais), o EP não se mostrou eficaz na inibição da viabilidade celular (Fig. 1-B), dado que corrobora com que Demir e colaboradores (2014) que verificaram o mesmo resultado para extrato etanólico de *Physalis* (80% v/v). Já a NP e a NB mostraram altos valores de inibição no crescimento dessas células, conforme a concentração das formulações foi aumentando. Esse fato pode estar relacionado ao que já foi descrito na literatura que os componentes da nanoemulsão tem poder antioxidante e também pelo tamanho da gotícula, que facilita a absorção pelas células tumorais (Shekhar, 2009; Portney; Ozkan, 2006;

Paschoalino et al., 2010). A presença do tensoativo não-iônico, polissorbato 80, também já foi indicada como uma substância que pode causar toxicidade em culturas celulares, apesar de serem melhor tolerados do que os tensoativos iônicos, especialmente os catiônicos. Contri et al. (2016) observou que a toxicidade de nanocápsulas foi devido à utilização do polissorbato 80 na formulação.

3.2.2. Avaliação *in vivo*

A toxicidade *in vivo* das formulações, utilizando modelo *C. elegans* foi avaliada pelos parâmetros da taxa de sobrevivência (Fig. 3), controle dos batimentos faríngeos (Fig. 4) e ciclo de defecação (Fig. 2). Nenhuma das concentrações de EP, NP e EB alterou a taxa de sobrevivência dos vermes (Fig. 3). Isso significa que a exposição às amostras não causaram estresse aos animais.

Posteriormente, foi avaliado os batimentos faríngeos, que é um ciclo de contração-relaxamento nos quais partículas e líquidos são sugados (Hall, 2008). Nesse estudo, houve uma diminuição pequena nos batimentos faríngeos dos vermes (Fig. 4), em relação ao controle, em todas as amostras avaliadas. Como expõe You et al. (2008), o verme ingere o alimento através da ação propulsiva da faringe e a velocidade de contração da faringe é modulada pela presença do alimento, pela sua qualidade, dentre outros, mostrando que a diminuição dos batimentos faríngeos representa a diminuição da ingestão de alimentos do verme. Acreditamos que a redução da taxa de batimentos faríngeos é causada pela simples presença das amostras, visto que animais do grupo controle ingeriam apenas M9.

A defecação é a etapa que ocorre a remoção de materiais não-digeridos a partir do trato digestivo, através da abertura do ânus em ciclos de aproximadamente 50 s (Gonzalez-Moragas et al., 2015). Em *C. elegans*, a defecação é independente de temperatura, mas é lenta quando os alimentos são escassos (o ciclo aumenta para 80 s) e até pode ser inibido à medida que a alimentação cessa, sendo apenas retomada quando a comida está disponível (Riddle et al., 1997). O ciclo de defecação é considerado um marcador de toxicidade devido as alterações que podem ocorrer na permeabilidade da barreira intestinal (Stefanello et al., 2015). Todas as amostras avaliadas reduziram o tempo do ciclo de defecação (Fig. 2), ou seja, o intervalo entre os ciclos de defecação, provavelmente para aumentar a excreção dos materiais não-digeridos.

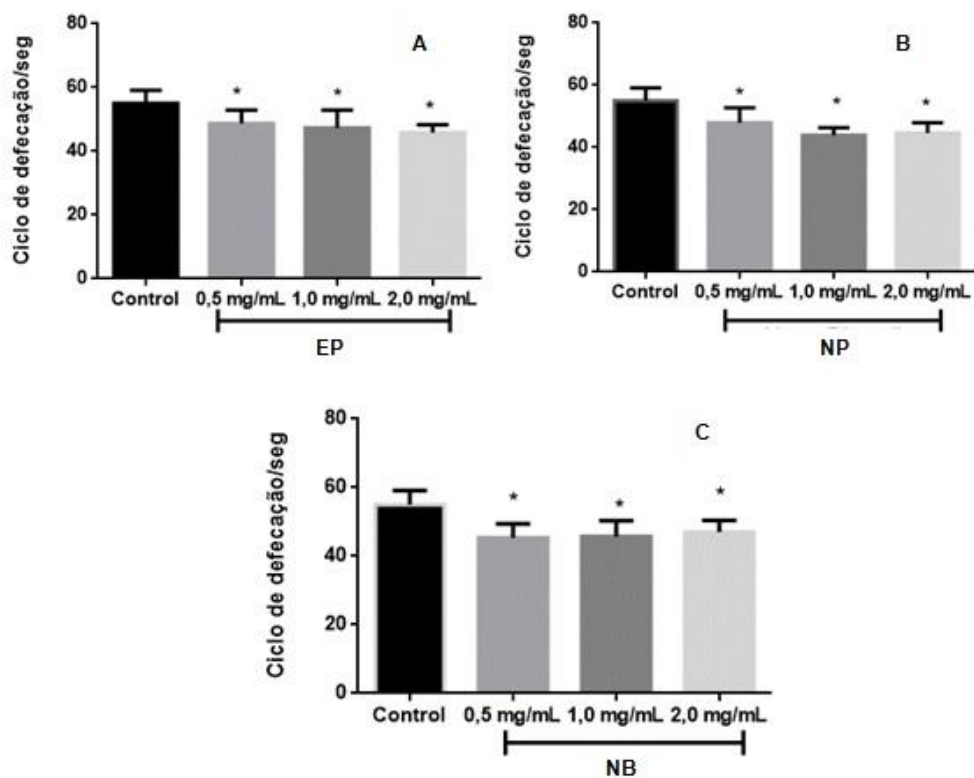


Figura 2- Ciclo de defecação s^{-1} de vermes adultos jovens da cepa N2 expostos por 2 horas a diferentes concentrações de EP (A), NP (B) e NB (C).

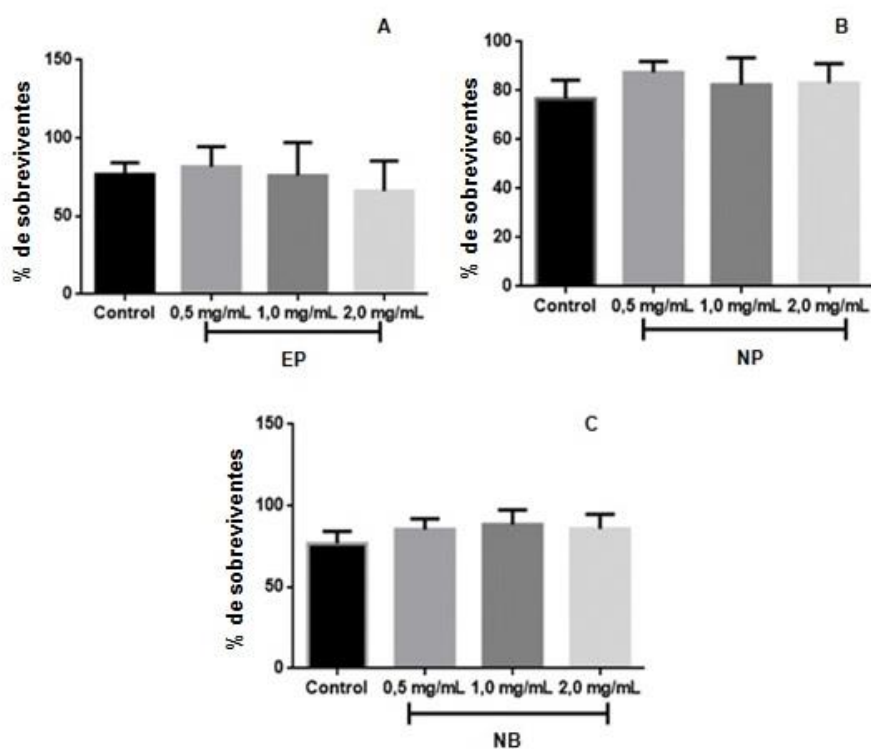


Figura 3. Sobrevivência dos vermes adultos jovens da cepa N2 expostos a EP (A), NP (B) e NB (C) a diferentes concentrações.

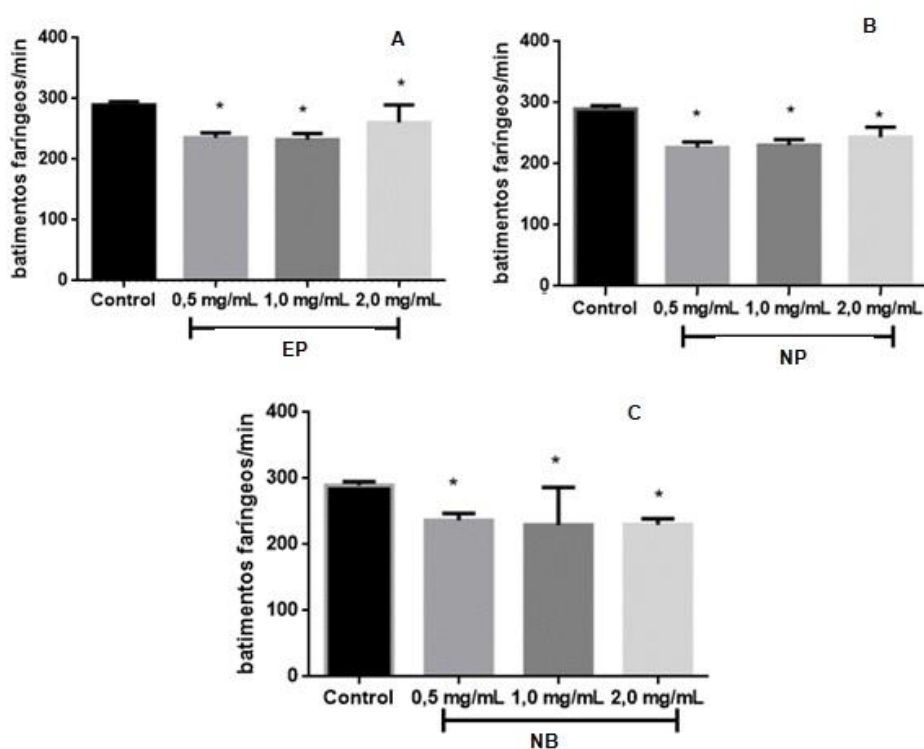


Figura 4. Batimentos faríngeos min^{-1} de vermes adultos jovens da cepa N2 expostos por 2 h à diferentes concentrações de EP (A), NP (B) e NB (C).

4. Conclusão

A nanoemulsão contendo extrato de *Physalis peruviana* apresentou boas características físico-químicas, desejáveis para um sistema estável. Os testes *in vitro* e *in vivo* foram fundamentais para avaliar uma possível toxicidade, demonstrando que o extrato e as nanoemulsões não apresentaram toxicidade em linhagem celular não-tumoral e modelo *C. elegans*, respectivamente. A sobrevivência de *C. elegans* não foi afetada, enquanto a taxa de batimentos faríngeos e de defecação foram reduzidas, confirmando que os vermes absorvem as formulações e que não existem efeitos tóxicos. No entanto, tanto a nanoemulsão contendo extrato quanto a que não continha extrato apresentaram citotoxicidade no ensaio *in vitro* para linhagem celular tumoral, demonstrando uma possível atividade antitumoral das formulações. Desse modo, uma futura aplicação para essa nanoemulsão poderá ser estudada e melhor desenvolvida.

Referências

- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77(1), 71-94.
- Bruxel, F.; Laux, M.; Wild, L. B.; Fraga, M.; Koester, L. S.; Teixeira, H. F. (2012). Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quim. Nova*. 35 (9), 1827-1840.
- Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H. (2004). Nanoemulsion formulations using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*. 280(1), 241-251.
- Codevilla, C. F.; Tischer, B.; Gindri, A. L.; Nogueira-Librelotto, D. R.; Barin, J. S.; Silva, C. B.; Rolim, C. M. B.; Zepka, L. Q.; Menezes, C. R. (2018). Cytotoxicity and antioxidante of goldenberry extracts obtained with high intensity ultrasound. *Ciência Rural*. in press
- Conti, D. S. et al. (2012). Propellant-based inhalers for the non-invasive delivery of genes via oral inhalation. *Journal of Controlled Release*. 157 (3), 406-417.
- Demir, T.; Ozen, M. O.; Hames-Kocabas, E. E. (2014). Antioxidant and Cytotoxic Activity of *Physalis peruviana*. *Medicinal Plant Research*. 4 (3), 30-34.
- Eisenbrand, G. et al. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 193-236.
- Ezhilarasi P. N.; Karthik P.; Chhanwal N.; Anandharamakrishnan C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food Bioprocess Tech*. 6 (3), 628–647.
- Hall D. H.; Altun, Z. F. (2008). *C. elegans* atlas. Cold Spring Harbor Laboratory. 90, (4), 375-376.
- Huang, C.; Xiong, C.; Kornfeld, K. (2004). Measurements of age-related changes of physiological process that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 101 (21), 8084-8089.
- Gonzalez-Moragas, L.; Roig, A.; Laromaine, A. (2015). *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. *Advances in Colloid and Interface Science*. 219, 10-26.

- Klang, S.; Benita, S. (1998). Emulsion Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration; Benita, S., ed.; Overseas Publishers Association: Amsterdam.
- Mason, T. G.; Wilking, J.N.; Meleson, K.; Chang C. B.; Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter.* 18, 635-666.
- McClements, D. J. & Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Food Science and Nutrition.* 51 (4), 285-330.
- Mendes, L.P. et al. (2015). Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. *Toxicology in vitro.* 29, 1268-1274.
- Migliori, M. L. et al. (2011). Circadian rhythms in metabolic variables in *Caenorhabditis elegans*. *Physiology & Behavior.* 103 (3-4), 315-320.
- Paschoalino, M. P.; Marcone, G. P. S.; Jardim, W. F. (2010). Os nanomateriais e a questão ambiental. *Quim. Nova.* 33 (2), 421-430.
- Portney, N. G., Ozkan, M. (2006). Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal.Bioanal. Chem.* 384, 620-630.
- Riddle, D. L. et al. (1997). Introduction to *C. elegans*. (Ed.). 2nd. Cold Spring Harbor (NY),
- Rocha-Filho, P. A. et al. (2017). In vitro and in vivo evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. *Cosmetics.* 4(32), 1-13.
- Rockenbach I.I. et al. (2008). Ácidos Fenólicos e Atividade Antioxidante em Fruto de *Physalis Peruviana L.* *Alimentos e Nutrição.* 19 (3) 271-276.
- Shekhar, C. (2009). Lean and mean: Nanoparticle-based delivery improves performance of cancer drugs. *Chem. Biol.* 16, 349-350.
- Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar N.; Garcia-celma, M. J. (2005). Nanoemulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102-110.
- Sozer, N.; Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology.* 27 (2), 82-89.

Stefanello, S. T. et al. (2015). Protective effects of novel organic selenium compounds against oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology Reports*. 2, 961-967.

Velasques, K. et al. (2018). Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against *Plasmodium falciparum* and decreases their toxicity to *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 118, 1-12.

You, Y.J.; Kim, J.; Raizen D.M.; Avery, L. (2008). Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety. *Cell Metab*. 7,(3) 249-257.

Wang, J. et al. (2015). Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. *Acta Biomaterialia*. 21, 237-249.

Discussão geral

O trabalho desenvolvido passou por vários desafios, o que valeu para surgimento de novas perspectivas e busca para novas alternativas.

O consumo de frutas e a redução no risco de doenças crônicas estão correlacionados. Estudos revelam que a combinação de vitaminas, minerais, compostos fenólicos são responsáveis por efeitos antioxidantes. As frutas tropicais são consideradas boas fontes desses compostos e seu consumo vem aumentando mundialmente (VASCO et al., 2008; PAGOT, HOFFMANN, 2003; ROCKENBACK et al., 2008). Reconhecida pela presença de vitaesteróis, compostos que possuem atividades farmacológicas antitumoral, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (MINGUZZI et al., 2002; TOMASSINI et al., 2000), a *Physalis* também possui outros compostos bioativos, como carotenóides e polifenóis. Esses compostos são responsáveis pelo alto valor nutritivo da fruta e também pela sua atividade antioxidante (CHAVES, 2006; RUTZ et al., 2012).

O método mais comumente utilizado para determinação de carotenóides é a extração com solventes. Devido à estrutura complexa e a diversidade desses compostos encontrados em amostras vegetais, não há um protocolo único para extraí-los (QUIRÓS; COSTA, 2006). A determinação de carotenóides totais mostrou que a *physalis* é uma boa fonte desses compostos quando comparada ao tomate e à cenoura, que são consideradas fontes ricas de carotenóides (SEVERO et al., 2010).

De um modo geral, o conteúdo de fenólicos totais pode ser determinado pelos métodos espectrofotométricos de Folin-Ciocalteu (ROSSI JUNIOR; SINGLETON 1965). É necessária a utilização de curva padrão, sendo o padrão mais utilizado o ácido gálico (Apêndice D). Por este motivo os resultados são, em geral, expressos em mg de equivalentes a ácido gálico em 100 g de amostra (LICODIEDOFF et al., 2013).

O método utilizado para verificar a atividade antioxidante consiste em capturar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por ação de um antioxidante, produzindo um decréscimo da absorbância a 517 nm e mudança na coloração de púrpura para amarela (OLIVEIRA et al., 2009). A molécula de DPPH é bastante conhecida por caracterizar-se como um radical orgânico livre estável e que tem como vantagens, boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade

(DENG et al., 2011; SCHERER; GODOY, 2009). O valor da absorvância pode ser interpolado em uma curva de dose-resposta de um antioxidante padrão, como ácido ascórbico ou Trolox, ácido tânico e ácido gálico e os resultados são expressos como concentração equivalente (KEDARE; SINGH, 2011; MAGALHÃES et al., 2008). Neste trabalho foi utilizado o padrão Trolox para construção da curva de calibração (Apêndice C).

O conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante (por DPPH) mostraram bons resultados quando comparados a outra espécie de physalis (*Physalis angulata*) (OLIVEIRA, et al., 2011). Os teores de compostos fenólicos e carotenóides totais tem correlação positiva com a capacidade antioxidante (PERKINSVEAZIE et al., 2008; HEREDIA; CISNEROS-ZAVALLLOS, 2009), ou seja, os altos teores corroboram com a boa atividade antioxidante que o fruto apresentou. Essas características justificam o objetivo do trabalho que foi nanoemulsificar o extrato para a proteção dos compostos bioativos.

Testes preliminares mostraram que nanoemulsões produzidas a partir de agitação magnética resultavam com tamanho de gotícula maior que 400 nm, então observou-se que com o banho de ultrassom, mais especificamente de 25 kHz de frequência, se obtinha formulações com tamanhos entre 150 e 200 nm de diâmetro médio de partícula. O mesmo foi observado por Almeida e colaboradores (2008). Dessa forma, optou-se o uso de sonicação no processo de obtenção de nanoemulsão.

A partir disso testou-se frequências de ultrassom e tempos diferentes de sonicação (Apêndice A). Mosavian e Hassani (2010) e Hielscher (2005) verificaram que a frequência e o tempo de sonicação, dentre outros parâmetros, influenciam diretamente no tamanho de gota de sistemas emulsionados.

A posição da amostra em determinada profundidade e lado na cuba do banho de ultrassom também influencia no melhor aproveitamento da eficiência das bolhas de cavitação e, conseqüentemente no tamanho de gota (AVVARU; PANDIT, 2008). Para o desenvolvimento das formulações, foi verificada uma posição ótima, nos lados esquerdo e direito na profundidade de 2 cm de submersão da amostra (Apêndice E).

As formulações elaboradas com o banho de US de frequência de 37 kHz com tempo de 3 minutos e de 10 minutos tiveram melhor granulometria e distribuição de partículas pela análise de difração a laser (Apêndice B). Também tiveram os menores tamanhos de gota e menor PDI quando comparados aos resultados de outras frequências (Apêndice A).

A metodologia de superfície de resposta (RSM- do inglês Response Surface Methodology) veio auxiliar no objetivo inicial que era desenvolver a nanoemulsão com menor tamanho de gotícula, conseqüentemente a mais estável. Na tabela 1, do artigo 1, nota-se a sugestão do software de usar a amplitude de 103,6 e 36,36%. Esses valores não estão disponíveis nos aparelhos de ultrassom, então seguiu-se usando 100% (amplitude máxima) e 40%, respectivamente.

A formulação prevista pela condição ideal sugerida pelo RSM, apresentou boas características físico-químicas e também de estabilidade quando comparadas a outras nanoemulsões de extratos vegetais (MEZADRI, 2010; ZORZI, et al., 2016). Isso mostra que a otimização dos parâmetros avaliados pelo RSM reflete diretamente nas características físico-químicas e conseqüentemente melhorando a estabilidade do sistema.

Devido aos riscos relacionados a sistemas nanométricos, teve-se preocupação quanto a toxicidade da formulação obtida. Os ensaio *in vitro* e *in vivo* mostraram que tanto o extrato quanto a nanoemulsão associada e não-associada não apresentaram citotoxicidade, e ainda, atividade antitumoral quando associada e não-associada ao extrato de *Physalis peruviana*. Esses resultados corroboram com outros trabalhos (VALÉRIO et al., 2015; MORAES et al., 2015) que também mostraram que formulações nanoestruturadas contendo polisorbato 80 (Tween 80[®]) e com composto bioativo (MOTTA, 2016) não foram citotóxicas.

Conclusão geral

Este trabalho é um dos poucos que envolve nanoestruturas e a fruta *Physalis peruviana*. Até então, não foram encontrados na literatura nanoemulsões associadas ao extrato de *Physalis peruviana*.

É fato que a ingestão de alimentos ricos em carotenoides e compostos fenólicos em geral está associada à prevenção de diversos tipos de doenças. A *Physalis peruviana* se destaca por sua composição em vitaminas, sua atividade antioxidante e pelos bons teores de compostos bioativos. Ela pode ser obtida comercialmente ou cultivada em quintais próprios para consumo direto. Seu extrato etanólico, utilizado nesse trabalho não apresentou toxicidade concordando com dados consultados na literatura.

O método RSM mostrou-se adequado para otimização no processo de obtenção da nanoemulsão com menor tamanho de gota, menor índice de polidispersão e sem a presença de micropartículas.

A nanoemulsão contendo o extrato de physalis apresentou um tamanho de gota e índice de polidispersão satisfatórios para um sistema estável. Essa estabilidade foi verificada e observada no período de 60 dias, sob refrigeração, que manteve as características físico-químicas e teve um pequeno decréscimo apenas nos primeiros 30 dias no teor de compostos fenólicos e se manteve até o final do período.

A formulação apresentou atividade antitumoral no ensaio *in vitro* frente a células de tumor mamário e não exibiu citotoxicidade em células não-tumorais. No modelo *in vivo*, tanto as formulações associadas e o extrato livre não apresentaram toxicidade. Dessa forma, conclui-se esse trabalho com a perspectiva de uso futuro dessa formulação em algum produto alimentício para seu enriquecimento no teor de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S. et al. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.23, p. 81-92, 2015.

ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 3-15, 2009.

AGRAWAL, N.; MADDIKERI, G. L.; PANDIT, A. B. Sustained release formulations of citronella oil nanoemulsion using cavitation techniques. **Ultrason. Sonochem.** v.36, p. 367-374, 2017.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, E. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 780-788, 2008.

ALVARADO, P.A.; BERDUGO, C.A.; FISCHER, G. Efecto de um tratamento a 1,5 °C y dos humedades relativas sobre las características físico-químicas de fruto de uchuva *Physalis peruviana* L. durante el posterior transporte y almacenamiento. **Agronomía Colombiana**, v. 22, p. 147-159, 2004.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients. **Springer**, p. 1-89, 2014.

ANSEL, M. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. J. Farmacotécnica: Formas farmacêuticas & Sistemas de liberação de fármacos. 6ª ed. p. 281-316, 1999.

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

ARTAL-SANZ, M.; DE JONG L.; TAVERNARAKIS, N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. **Biotechnol J**, v. 1, n. 12, p. 1405-1418, 2006.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. (2012). Características de nanopartículas e potenciais aplicações. s em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

AVILA, J. A.; MORENO, P.; FISCHER, G.; MIRANDA, D. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18 °C. **Acta Agronomica (Colombia)**, v. 55, p. 29-38, 2006.

AVVARU, B.; PANDIT, A. B. Experimental investigation of cavitational bubble dynamics under multifrequency system, **Ultrason. Sonochem**, v. 15, p. 578-589, 2008.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **J Pharm Sci**, v. 82, n. 11, p. 1069-1079, 1993.

BONIFÁCIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.

BRIONES-LABARCA, V.; GIOVAGNOLI-VICUÑA, C., FIGUEROA-ALVAREZ, P.; QUISPE-FUENTES, I. E PÉREZ-WON, M. Extraction of β -carotene, vitamin C and antioxidant compounds from *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) assisted by high hydrostatic pressure. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 109-118, 2013.

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

CAPEK, I. Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in colloid Interfacial Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CASTRO, A., RODRIGUEZ, L. & VARGAS, E. Dry gooseberry (*Physalis peruviana* L) with pretreatment of osmotic dehydration. **Vitae - Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 15, n. 2, p. 226-231, 2008.

CHAUDRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 595-603, 2011.

CHAVES, A. C. Propagação e avaliação fenológica de *Physalis* sp. Na região de Pelotas, RS. 65 f. **Tese (doutorado) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”**, Universidade Federal de Pelotas, 2006.

CHOI, S. J. et al. Stability of citral in oil-in-water emulsions prepared with medium-chain triacylglycerols and triacetin. **Journal Agric. Food Chem**, v. 54, p. 11349-11353, 2009.

- CHOI, S. J. et al. Inhibition of citral degradation in model beverage emulsions using micelles and reverse micelles. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p.111-116, 2010.
- CODEVILLA, C. F. et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. *Ciência e Natura*, v. 37, p. 142-151, 2015.
- COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System**, v. 19, p. 99-134, 2002.
- DAG, D.; KILERCIOGLU, M.; OZTOP, M. H. Physical and chemical characteristics of encapsulated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice powder. **Food Science and Technology**, v. 83, p. 86-94, 2017.
- DAUDT, R. M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Cienc. Cult**, v. 65 n. 3, p. 28-31, 2013.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal Agric. Food Chem**, v. 55, n. 13, p.5062-5072, 2007.
- DRISCOLL, D. F. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. **Pharm Res**, v. 23, n. 9, p. 1959-1969, 2006.
- EZHILARASI, P. N. et al. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 2013.
- FERNANDEZ, P.; ANDRE, V.; RIEGER, J.; KUHMLE, A. Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.
- FLOYD, A. G. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 4, n. 2, p. 134-143, 1999.
- FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; VERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS, M. Carotenóides: Cores atraentes e ação biológica. **Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 40 -45, 2000.
- GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **B. CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 405-422, 2004.

GONZALEZ-MORAGAS, L.; ROIG, A.; LAROMAIN, A. (2015). *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 10-26, 2015

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.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, M.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245-251, 2008.

HAN, J.; DAVIS, S. S.; Washington C. Physical properties and stability of two emulsion formulations of propofol. **Int J Pharm**, v. 215, n.1-2, p.207-220, 2001.

HASSANIEN, M. F. R. *Physalis peruviana*: A rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. **Food Reviews International**, v. 27, n. 3, p. 259-273, 2011.

HEREDIA, J.B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. **Postharvest Biology and Technology, Amsterdam**, v.51, p.242-249, 2009.

HIELSCHER, T. Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions. Paris, France. **TIMA Editions**, p. 138-143, 2005.

HOMAYOONFAL, M.; KHODAIYAN, F.; MOUSAVI, S. M. Walnut oil nanoemulsion: Optimization of the emulsion capacity, cloudiness, density, and surface tension. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 5, p.725–733, 2014.

KEDARE, S.; SINGH, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 170-175, 2008.

KUSPKA, M.; JÉLEN, H.H. In-tube extraction for the determination of the main volatile compounds in *Physalis peruviana* L. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 2, p. 532-541, 2016.

LICODIEDOFF, S.; KOSLOWSKI, L. A. D.; RIBANI, R. H. Flavonols and antioxidant activity of *Physalis peruviana* L. fruit at two maturity stages. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 393-399, 2013.

LIMA, C. S. M.; SEVERO, J.; MANICA-BERTO, R.; SILVA, J. A., RUFATO, L.; RUFATO, A. R. Características físico-químicas de *physalis* em diferentes colorações do cálice e sistemas de condução. **Revista brasileira fruticultura, joboticabal**, v. 31, p. 1060-1068, 2009.

LIMA, C. S. M. et al. Qualidade pós-colheita de *Physalis* sob temperatura ambiente e refrigeração. **Revista Ceres**, v. 60, n. 3, p. 311-317, 2013.

LIN, C.; CHEN, I. Comparison of fuel properties and emission characteristics of two and three-phase emulsions prepared by ultrasonically vibrating and mechanically homogenizing emulsification methods. **Fuel**, v. 87, p. 2154-2161, 2008.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidante capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LUZ, L. P. Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS, p. 21-39, 1998.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. **Dissertação de Mestrado**, UFRGS, p. 1-106, 2005.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal Food Science**, v. 72, n. 8, p. 109-124, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, p. 2297-2316, 2010.

MEZADRI, H. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana*(Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos. 94 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.

MEHMOOD, T. Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 183, p. 1–7, 2015.

MINGUZZI, S. et al. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Química Nova**, v. 59, n. 6, p. 635-641, 2002.

MORAES, B. K. S. et al. Clozapine-Loaded Polysorbate-Coated Polymeric Nanocapsules: Physico-Chemical Characterization and Toxicity Evaluation in *Caenorhabditis elegans* Model. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, p. 1-8, 2015.

MOSAVIAN, M. T. H.; HASSANI, A. Making Oil-in-Water Emulsions by Ultrasound and Stability Evaluation Using Taguchi Method, **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2010.

MOTTA, M. H. Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas baseadas na associação de piperina a carreadores nanoestruturados. **Dissertação de Mestrado**. UFSM, 2016.

MUNIZ, J. et al. Sistemas de condução para o cultivo de *Physalis* no planalto catarinense. **Rev. Bras. Frutic**, v. 33, n. 3, p. 830-838, 2007.

MUSA, S. H.; BASRI, M.; MASOUMI, H. R. F.; KARJIBAN, R. A.; MALEK, E. A.; BASRI, H.; SHAMSUDDIN, A. F. Formulation optimization of palm kernel oil esters nanoemulsion-loaded with chloramphenicol suitable for meningitis treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 113–119, 2013.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2nd ed. New York: **John Wiley Professional**, 1995.

NAKABAYASHI, K.; AMEMIYA, F.; FUCHIGAMI, T.; MACHIDA, K.; TAKEDA, S.; TAMAMITSUB, K.; Atobe, M. High clear and transparent nanoemulsion preparation

under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification. **Chem. Commun**, v. 47, p. 5765-5767, 2011.

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

NURIT SILVA, K.; AGRA, M. F. Estudo fármaco botânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognos**, v. 15 ,n. 4, p. 344-351, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, J. A. R. et al. Caracterização física, físico-química e potencial tecnológico de frutos de camapu (*Physalis angulata* L.). **R. Bras. de Tec. Agroindustrial**. v. 5, n. 2, p. 573-583, 2011.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: **Seminário brasileiro sobre pequenas frutas**, 1., Vacaria, p. 9-14, 2003.

PAYS, K. et al. Understanding the stability and lifetime of emulsions. **J. Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 1-3, p. 175-186, 2002.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J.K.; HOWARD, L. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 280-285, 2008.

PUENTE, L. A.; PINTO-MUÑOZ, C. A., CASTRO; E. S., CORTÉS, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. **Food Research international**, v. 44, p. 1733-1740 2011.

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 97-111, 2006.

RABINOVICH-GUILATT, L. et al. Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 61 n. 1-2, p. 69-76, 2005.

- RAMADAN, M. F.; MÖRSEL, J. T. Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 969-974, 2003.
- RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. S.; SOARES, J. D. R.; SILVA, R. A. L.; PASQUAL, M. Caracterização fenólica e produtividade de *Physalis peruviana* cultivada em casa de vegetação. **Bioscience jornal**, v. 29, p. 1771-1777, 2013.
- ROCKENBACH, I. I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alim. Nutr**, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008.
- ROSSI JUNIOR, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- RUFATO, L.; ROSSI, A.; SCHLEMPER, C.; LIMA, C. S. M; KRETZSCHMAR, A. A. Aspectos técnicos da cultura da *Physalis*. Lages: **CAV/UEDESC**. v.1, p. 1-101, 2008.
- SAKAEDA, T.; HIRANO, K.; J. OW lipid emulsions for parenteral drug delivery. III. Lipophilicity necessary for incorporation in oil particles even after intravenous injection. **Drug Targeting**, v. 6, n. 2, p. 119-127, 1998.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.
- SCHMALTZ, C., SANTOS, J. V., GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: A imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, p. 13-14, 2005.
- SCHUTZ, H. Multiple regression approach to optimization. **Food Technology**, v. 37, n. 11, p. 46–48, 1983.
- SEVERO, J. et al. Atividade antioxidante e fitoquímicos em frutos de *Physalis peruviana* L.) durante o amadurecimento e o armazenamento. **R. Bras. Agrociência**, v. 16, n. 14, p. 77-82, 2010.

SILVA, G. A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, v. 61, p. 216-220, 2004.

TOMASSINI, T.C.B. et al. Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23, n. 1, 47-57, 2000.

SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., AZEMAR, N. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102-110, 2005.

SULAIMAN, I. S. C. et al. Design and development of a nanoemulsion system containing extract of *Clinacanthus nutans* (L.) leaves for transdermal delivery system by D-optimal mixture design and evaluation of its physicochemical properties. **RSC Adv**, v. 6, p. 67378-67388, 2016.

VALÉRIO, A. et al., Synthesis of PEG-PCL-based polyurethane nanoparticles by miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p-35-41, 2015.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 816-823, 2008.

VELASQUEZ, H.J.C.; GIRALDO, O.H.B.; ARANGO, S.S.P. Estudio preliminar de La resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 60, n. 1, p. 3785-3796, 2007.

WOLFE, K. L., LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem**, v. 55, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

ZHANG, D. et al. Development of a cellbased antioxidant activity assay using dietary fatty acid as oxidative stressor. **Food Chemistry**, v. 141, p. 347-356, 2013.

ZHU, C., HAN, W., CHEN, Z., & HAN, Z. Statistical optimization of microwaveassisted astaxanthin extraction from *Phaffia rhodozymb*. **3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics**, v. 5, p. 2104–2109, 2010. IEEE.

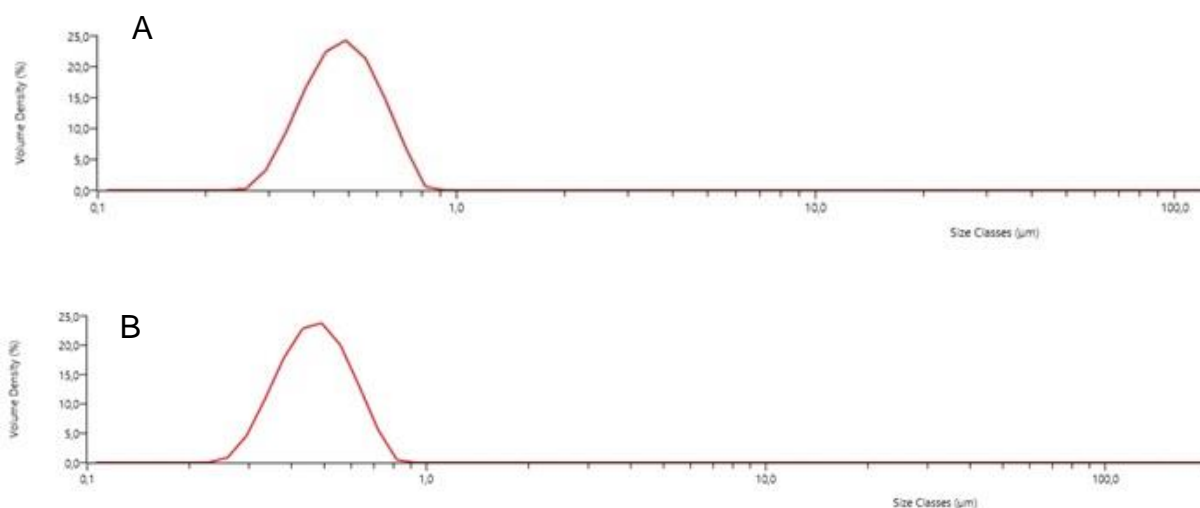
ZORZI, G. K. et al. Antioxidant effect of nanoemulsions containing extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. – Asteraceae. **PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 844-850, 2016.

APÊNDICES

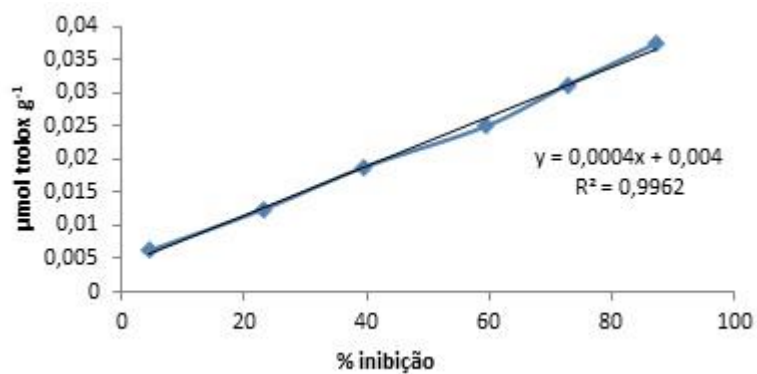
APÊNDICE A – Artigo 1 – Tabela 1. Testes de escolha da melhor frequência e tipo de aparelho de ultrassom, com respectivos resultados para análise de difração a laser: tamanho de gota e distribuição granulométrica; correlação de fótons: diâmetro médio do glóbulo e índice de polidispersão (PDI).

US/Frequência (kHz)	Tempo (min)	Difração a laser		Correlação de fótons	
		D [4:3] (μm)	Span	Diâm. Méd. (nm)	PDI
Banho / 25	3	0.494	0.610	186 \pm 1	0.093
Banho / 25	10	0.491	0.610	297 \pm 5	0.221
Banho / 35	3	0.495	0.607	250 \pm 6	0.262
Banho / 35	10	0.510	0.623	253 \pm 2	0.292
Banho / 37	3	0.490	0.607	169 \pm 2	0.141
Banho / 37	10	0.478	0.624	162 \pm 0	0.166
Banho / 45	3	0.862	0.977	308 \pm 6	0.292
Banho / 45	10	0.488	0.609	173 \pm 1	0.115
Banho / 80	3	0.505	0.612	198 \pm 4	0.128
Banho / 80	10	0.602	0.646	193 \pm 4	0.128
Banho / 130	3	0.529	0.645	225 \pm 3	0.184
Banho / 130	10	0.758	0.791	216 \pm 1	0.157
Sonda / 20	3	1.820	4.586	178 \pm 0	0.125
Sonda / 20	10	3.540	5.629	163 \pm 0	0.173

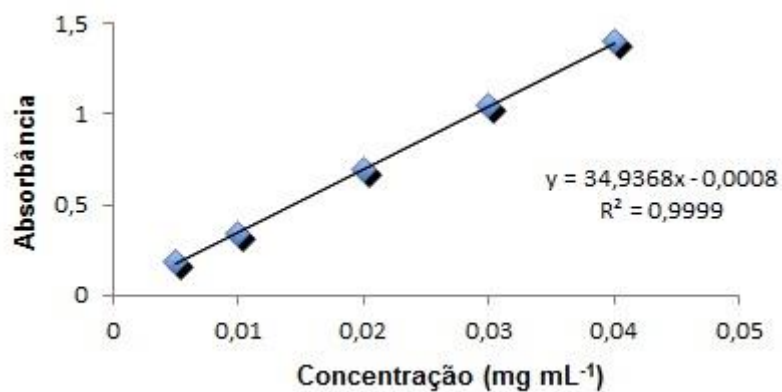
APÊNDICE B – Artigo 1 – Figura 1. Distribuição do tamanho de gota da nanoemulsão contendo extrato de *Physalis peruviana*. Banho de US com frequência de 37 kHz, A= 3 minutos e B= 10 minutos de sonicação.



APÊNDICE C - Artigo 1- Figura 2. Curva de calibração do padrão Trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH.



APÊNDICE D - Artigo 1- Figura 3. Curva de calibração do padrão de ácido gálico para determinação do conteúdo de fenólicos totais.



APÊNDICE E - Artigo 1- Figura 4. Mapeamento do banho de US 37 kHz.



