



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Obtenção, caracterização química, propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de polpas, sementes e folhas de passifloras silvestres para formulação de nanoemulsões

IZABEL LUCENA GADIOLI

Brasília

2017



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Izabel Lucena Gadioli

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana.

Área de concentração: Alimentos, dietética e bioquímica aplicada à Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Livia de Lacerda de Oliveira Pineli

Brasília  
2017

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da tese de doutorado da aluna **Izabel Lucena Gadioli**, intitulada “**Obtenção, caracterização química, propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de polpas, sementes e folhas de passifloras silvestres para formulação de nanoemulsões**”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Profª Drª Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli  
Presidente - Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Profª Drª Patrícia Beltrão Lessa Constant  
Membro – Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Sergipe (UFS)

Profª Drª Eliana dos Santos Leandro  
Membro – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Profª Drª Wilma Maria Coelho Araújo  
Membro – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso  
Suplente – Departamento de Farmácia – Universidade de Brasília (UnB)

Brasília

2017

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ser sempre tão maravilhoso na minha vida, pelo amor infinito, por permitir que eu tivesse fé em mim mesma e por me guiar sempre no Seu caminho da melhor maneira possível.

À minha família pelo apoio incondicional, pelo amor, pela preocupação e pela disponibilidade. Aos meus pais pelo zelo, pela fé e por ajudarem a me manter firme. Ao meu pai, Jovan, pelo seu equilíbrio e sabedoria na vida. À minha mãe, Ingrid, pelo carinho e pela ajuda sempre que necessário. Às minhas irmãs, Izadora e Izaura, pela presença, amizade e companheirismo. Ao meu sobrinho, Miguel, por aliviar todo e qualquer momento de tensão com sua presença sempre tão maravilhosa. Aos meus avós, Jovita, Ângelo, Gilson e Riso, por tanto amor, por vibrarem junto comigo as minhas vitórias e por acreditarem tanto nas minhas escolhas. Aos meus tios e primos, Didi, Gabriel, tia Zane, tio Danilo, João Pedro, Daniel, tio Isaac, Renata, Lucas, Davi. Muito especialmente, agradeço à querida Ina e ao Luiz, por abrirem as portas da sua casa quase diariamente para que eu pudesse ter dias mais tranquilos na minha rotina e por não medirem esforços para que as coisas sempre dessem certo. À Poli e ao Gustavo, pela torcida e motivação sempre tão evidentes. Sem vocês, tudo seria muito mais difícil.

Ao Vitor, meu amor, simplesmente por tudo! Pelo amor, pela compreensão, por toda parceria, companheirismo e amizade. Por não medir esforços para me ajudar a qualquer momento em que eu precisei.

À professora Dr<sup>a</sup> Livia, pela orientação, que já se estende desde a graduação, mesmo que informalmente, muitas vezes. Agradeço também pelo constante aprendizado e pela liberdade que me deu para que eu pudesse me desenvolver como doutoranda e desenvolver a minha pesquisa expandindo sempre os meus horizontes.

À Dr<sup>a</sup> Ana Maria Costa, coordenadora da rede Passitec, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa e pelo fornecimento do local de colheita das amostras.

Aos meus anjos do doutorado, que permitiram que todas as coisas se encaixassem da melhor maneira possível: Desterro, Marcela e Débora. À Desterro, pela amizade, conduta profissional, por me oferecer o seu ombro amigo sempre que precisei, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa, por coletar as passifloras comigo no campo experimental até mesmo em dias de chuva. Você merece um livro de agradecimentos!

À Marcela pela amizade tão verdadeira, pelo exemplo de aluna e pesquisadora e por ser tão imprescindível. Sem essa sua qualidade, muita coisa não teria dado certo. À

Débora por me ajudar a desenvolver toda a parte das nanoemulsões. Pela paciência em me ensinar, pelas idas comigo ao laboratório aos domingos para realização das minhas análises, por toda a disponibilidade.

Ao pibic Rafael, por ser praticamente o meu braço direito no desenvolvimento dessa pesquisa. À pibic Isabela pela amizade e pela ajuda com os ensaios de atividade antimicrobiana. À amiga e pibic Leca, pela pró-atividade, pela ajuda na coleta das passifloras, pela amizade e por contribuir para que o ambiente no laboratório fosse sempre mais leve.

Às amigas da Pós Lorena, Mariana e Isabella pelas ajudas práticas e conversas tão produtivas durante esses anos.

Ao Breno por me apresentar a nanoencapsulação e por toda a disponibilidade em ensinar.

À professora Dr<sup>a</sup> Maria Beatriz Glória e à Gisela pela colaboração nas análises de aminas bioativas e aminoácidos.

Ao professor Dr João Paulo Longo pela colaboração na formulação das nanoemulsões.

Ao professor Dr Paulo Eduardo Narciso pela colaboração na execução da atividade antioxidante por EPR.

Ao Dr Edy Brito e ao Dr Paulo Ricceli pela colaboração na análise de perfil de fenólicos em espectrômetro de massas.

Ao Samuel, pela ajuda com os ensaios de atividade antimicrobiana.

Ao Marcos Sodré pela disponibilidade, por nunca hesitar em me ajudar nos ensaios do laboratório sempre que foi preciso e pela colaboração que já se estende desde a graduação.

À Thaís pela amizade, apoio e pela revisão do artigo em inglês.

A todos os meus queridos amigos, pelos momentos de descontração, pelas conversas profundas, pela amizade incondicional e pela torcida para que tudo desse certo nessa caminhada que escolhi seguir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Embrapa Cerrados e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB (DPP-UnB) pela concessão da bolsa de estudos e fomento à pesquisa.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para que esse projeto de pesquisa e de vida se concretizasse. Minha gratidão eterna!

*“(...) É saber se sentir infinito  
Num universo tão vasto e bonito  
É saber sonhar  
E, então, fazer valer a pena cada  
verso  
Daquele poema sobre acreditar.  
Não é sobre chegar no topo do  
mundo  
E saber que venceu  
É sobre escalar e sentir  
Que o caminho te fortaleceu  
É sobre ser abrigo  
E também ter morada em outros  
corações  
E assim ter amigos contigo  
Em todas as situações (...)”*

Trem Bala – Ana Vilela

## RESUMO

**Introdução:** as passifloras são plantas estratégicas no contexto dos alimentos funcionais e fitoterapia. O objetivo do presente estudo foi caracterizar extratos de folhas, polpas e sementes de *Passiflora alata* e *P. setacea*, nativas do Cerrado, quanto à sua composição química e propriedades biológicas, para formulação de nanoemulsões. **Métodos:** frutos maduros e folhas de passifloras silvestres, nativas do Cerrado, foram colhidos. As folhas foram secas a 50°C por cinco dias e depois pulverizadas. A partir dos frutos, obtiveram-se as polpas e as sementes, com o auxílio de uma despoldadeira. O preparo dos extratos de folhas foi realizado por infusão. Os extratos de polpas e sementes foram preparados com etanol e acetona 70%, a 80°C, por 30 minutos. Os extratos foram submetidos à liofilização. As nanoemulsões foram formuladas pelo processo de inversão de fase por temperatura (PIT). No experimento 1, os extratos de polpas, folhas e sementes de passifloras silvestres foram caracterizados quanto à sua composição em compostos fenólicos, aminas bioativas e aminoácidos, bem como avaliadas as atividades antioxidante e antimicrobiana. Os extratos com melhores resultados seguiram para o experimento 2, que visou a formular nanoemulsões de extratos de polpas e sementes de passifloras. Para isso, foram realizados testes de caracterização, estabilidade, além de avaliação das atividades antioxidante e antimicrobianas. **Resultados:** As sementes de *P. setacea* apresentaram maiores quantidade de compostos fenólicos (4.754,6 mg AGE/100 g MF), taninos (645,3 mg PB2E/100 g FW) e atividade antioxidante. Foi realizada a tentativa de identificação de 15 compostos fenólicos, compreendidos em 10 flavonoides e cinco ácidos fenólicos. A dosagem e identificação dos aminoácidos resultou num total de 16, dos quais 9 eram essenciais. A poliamina espermina só foi quantificada na polpa de *P. alata*, que também apresentou a maior quantidade de espermidina (1,6 mg/100 g FW). A concentração inibitória mínima das polpas e sementes variou de 0,5 a 8,0 mg/mL. Foi observada atividade bactericida nas sementes, contra *E. coli* (4,0-8,0 mg/mL). As nanoemulsões apresentaram diâmetro hidrodinâmico pequeno, menor que 30 nm, e índice de polidispersão baixo, menor que 0,2. O potencial zeta foi levemente negativo e variou de -0,6 a -0,8 mV para as polpas e -1,5 a -1,9 mV para as sementes. As nanoemulsões se mantiveram estáveis na maior parte do tempo do teste de estabilidade. A avaliação da atividade antioxidante das nanoemulsões demonstrou que os extratos potencializam sua atividade quando na escala manométrica, exceto o extrato de semente de *P. setacea*, que manteve a mesma atividade antioxidante. Os resultados de MIC das nanoemulsões não foram satisfatórios. **Conclusão:** as passifloras apresentaram boa qualidade em compostos fenólicos, aminas bioativas e aminoácidos, principalmente as sementes de *P. setacea*, com elevadas atividades antioxidante e atividade antimicrobiana. A nanoemulsificação dos extratos das passifloras foi um processo viável e contribuiu para manter a estabilidade dos compostos bioativos e melhorar a atividade antioxidante dos extratos.

**Palavras-chave:** Passifloras, Cerrado, biodiversidade, compostos bioativos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, nanoemulsão.

## ABSTRACT

**Introduction:** the present study aimed to characterize chemical composition and biological properties of extracts of leaves, pulps and seeds of *Passiflora alata* and *P. setacea* from the Brazilian savanna for nanoemulsions formulation. **Methods:** ripe fruits and leaves of wild passifloras from the Brazilian savanna were harvested. The leaves were dried at 50°C for five days. From the fruits, pulps and seeds were obtained with a depulper. Leaves extracts were prepared by infusion. The pulp and seed extracts were prepared with 70% ethanol and acetone at 80°C for 30 minutes. The extracts were lyophilized. Nanoemulsions were formulated by the phase inversion by temperature (PIT) process. In the experiment 1, extracts of pulps, leaves and seeds of wild passifloras were characterized for their composition in phenolic compounds, bioactive amines and amino acids, as well as the antioxidant and antimicrobial activities. The extracts with better results followed for experiment 2, which formulated nanoemulsions of pulps and seeds extracts of passifloras. For this, tests of characterization, stability, and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities were performed. **Results:** *P. setacea* seeds showed higher total phenolic compounds (4,754.6 mg GAE/100 g FW), tannins (645.3 mg PB2E/100 g FW) and antioxidant activity. Fifteen phenolic compounds were tentatively identified, comprising 10 flavonoids and 5 phenolic acids. Amino acids identification and quantification resulted in a total of 16, of which 9 were essential. The polyamine spermine was only quantified in *P. alata* pulp, which also had the highest amount of spermidine (1.6 mg / 100 g FW). The minimum inhibitory concentration (MIC) of pulps and seeds ranged from 0.5 to 8.0 mg/mL. Only bactericidal effects were observed for the seeds against *E. coli* (4.0-8.0 mg/mL). The nanoemulsions presented small hydrodynamic diameter, >30 nm, and low polydispersity index, >0.2. The zeta potential was slightly negative and ranged from -0.6 to -0.8 mV for pulps and -1.5 to -1.9 mV for seeds. Nanoemulsions remained stable most of the time in the stability test. The evaluation of the antioxidant activity of the nanoemulsions demonstrated that the extracts potentiate their activity when in the manometric scale, except for *P. setacea* seeds, which maintained the same antioxidant activity. The MIC results of the nanoemulsions were not satisfactory. **Conclusion:** the results showed that wild passifloras from Brazilian savanna presented good quality in phenolic compounds, bioactive amines and amino acids, especially the seeds of *P. setacea*, with high antioxidant activity and antimicrobial activity. Nanoemulsification of passifloras extracts was a viable process and contributed to maintain the the bioactive compounds stability and to improve the antioxidant activity of the extracts.

**Keywords:** Passifloras, Brazilian savanna, biodiversity, bioactive compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, nanoemulsion.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Distribuição dos ecossistemas brasileiros, incluindo o bioma Cerrado
- Figura 2.** Passifloras silvestres nativas do Cerrado. (a) *Passiflora setacea*. (b) *Passiflora alata*
- Figura 3.** Classes de fitoquímicos, com subdivisão da classe dos fenólicos
- Figura 4.** Estrutura química de algumas aminas bioativas
- Figura 5.** Sinal de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) do radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Figura 6.** Ilustração esquemática de uma nanoemulsão formulada com óleo, água e surfactante. A nanogotícula é estruturada com um núcleo hidrofóbico, para onde estão voltadas as caldas do surfactante, e uma superfície hidrofílica, formada pela cabeça do surfactante, que tem afinidade com a fase dispersante (água)
- Figura 7.** Métodos de baixa energia para obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A)
- Figura 8.** Processos de obtenção das matérias primas e dos extratos das polpas, folhas e sementes das passifloras silvestres

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Potencial hidrogeniônico (pH), durante 90 dias, de nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4°C
- Figura 2.** Fenólicos totais, durante 90 dias, de nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4°C
- Figura 3.** Capacidade do sequestro de radicais DPPH• por extratos livres e nanoemulsificados de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*. (a): Percentual de inibição do DPPH após 60 minutos de reação com extratos hidroalcoólicos livres e nanoemulsificados de polpas de *P. alata*. (b): Percentual de inibição do DPPH após 60 minutos de reação com extratos hidroalcoólicos livres e nanoemulsificados de sementes de *P. alata*. (c): Percentual de inibição do DPPH após 60 minutos de reação com extratos hidroalcoólicos livres e nanoemulsificados de polpas de *P. setacea*. (d):

Percentual de inibição do DPPH após 60 minutos de reação com extratos hidroalcoólicos livres e nanoemulsificados de sementes de *P. setacea*

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Gradiente de concentração das soluções de fases móveis empregadas na separação das amins bioativas e aminoácidos livres nos extratos de passifloras
- Tabela 2.** Descrição dos materiais da fase dispersa, utilizados para a formulação das nanoemulsões

### CAPÍTULO 2

- Table 1.** Concentration gradient of the mobile phase solutions employed in the separation of the bioactive amines and free amino acids in the passiflora extracts
- Table 2.** Moisture, total phenolic compounds, tannins and antioxidant activity by DPPH and FRAP, in fresh weight (FW), of wild passiflora pulps, seeds and leaves from Brazilian savanna
- Table 3.** Attempt of phenolic compounds identification of wild *Passiflora alata* and *P. setacea* from Brazilian savanna, by UPLC–QToF-MS/MS in negative ion mode
- Table 4.** Amino acids and bioactive amines, in fresh weight (FW), of wild passiflora pulps, seeds and leaves from Brazilian savanna
- Table 5.** Minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC) values for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* for free wild passiflora extracts from Brazilian savanna

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1** Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4 e a 25°C durante 90 dias
- Tabela 2** Estabilidade à força centrífuga, durante 90 dias de armazenamento, de nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4°C
- Tabela 3.** Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*, no teste de estabilidade acelerada - estresse térmico - nas temperaturas de 4 e 37°C, totalizando 5 ciclos
- Tabela 4** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de nanoemulsões e extratos livres de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma

ABTS: 2,2'- azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]

AGE ou GAE: ácido gálico equivalente

BHI: *brain heart infusion*

CUPRAC: capacidade de redução de cobre

DCNT: doenças crônicas não transmissíveis

DLS: *Dynamic Light Scattering*

DMAC: 4-dimetilaminocinamaldeído

DPPH: 2,2- diphenil-1-picril-hidrazila

EPR: ressonância magnética eletrônica

ERO: espécie reativa de oxigênio

FRAP: poder antioxidante de redução do Fe<sup>3+</sup>

g: grama

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L: litro

MBC ou CBM: concentração bactericida mínima

mg: miligrama

MH: Müeller Hinton

MIC ou CIM: concentração inibitória mínima

mL: mililitro

NEPA: nanoemulsão de polpa de *P. alata*

NEPS: nanoemulsão de semente de *P. setacea*

NESA: nanoemulsão de semente de *P. alata*

NESS: nanoemulsão de semente de *P. setacea*

nm: nanômetros

OD ou DO: densidade óptica

ORAC: capacidade de absorbância do radical oxigênio

PB2E: procianidina B2 equivalente

rpm: rotação por minuto

TE: trolox equivalente

TPC: *total phenolic compounds*

TRAP: potencial reativo antioxidante total

TSA: ágar Triptona de Soja

UFC ou CFU: unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>ESTRUTURA DA TESE</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
2.1. BIODIVERSIDADE	18
2.2. PASSIFLORAS	19
2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS	22
2.4. AMINAS BIOATIVAS E AMINOÁCIDOS	25
2.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
2.7. NANOTECNOLOGIA	33
<b>2.7.1. Nanotecnologia de alimentos</b>	<b>34</b>
<b>2.7.2. Nanoemulsões</b>	<b>35</b>
<b>2.7.3. Métodos para obtenção de nanoemulsões</b>	<b>37</b>
<b>2.7.4. Métodos de caracterização de nanoemulsões</b>	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1. OBJETIVO GERAL	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1. EXPERIMENTO 1: OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS, POLPAS E SEMENTES DE <i>Passiflora alata</i> E <i>P. setacea</i>	42
<b>4.1.1. Obtenção da matéria prima e preparo dos extratos</b>	<b>42</b>
<b>4.1.2. Fenólicos totais</b>	<b>43</b>
<b>4.1.3. Taninos</b>	<b>44</b>
<b>4.1.4. Atividade antioxidante</b>	<b>44</b>
4.1.4.1. Ensaio DPPH (2,2- diphenil-1-picril-hidrazila)	44
4.1.4.2. Ensaio da capacidade de redução do Fe <sup>3+</sup> (FRAP)	45
<b>4.1.5. Perfil de fenólicos</b>	<b>45</b>
4.1.5.1. Condições do massas de alta resolução	46

4.1.6.	<b>Aminas bioativas e aminoácidos livres.....</b>	<b>46</b>
4.1.7.	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>47</b>
4.1.7.1.	Cepas bacterianas.....	47
4.1.7.2.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	48
4.1.7.3.	Determinação da concentração bactericida mínima.....	49
4.1.8.	<b>Delineamento experimental e análise estatística.....</b>	<b>49</b>
4.2.	<b>EXPERIMENTO 2: FORMULAÇÃO, ESTABILIDADE E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE NANOEMULSÕES DE EXTRATOS DE POLPAS E SEMENTES DE <i>Passiflora alata</i> e <i>P. setacea</i>.....</b>	<b>49</b>
4.2.1.	<b>Formulação das nanoemulsões.....</b>	<b>49</b>
4.2.2.	<b>Caracterização e estabilidade das nanoemulsões.....</b>	<b>51</b>
4.2.2.1.	Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta.....	51
4.2.2.2.	Potencial hidrogeniônico.....	51
4.2.2.3.	Fenólicos totais.....	51
4.2.2.4.	Estabilidade à força centrífuga.....	51
4.2.2.5.	Estresse térmico.....	52
4.2.3.	<b>Atividade antioxidante <i>in vitro</i>: capacidade do sequestro de radicais DPPH•.....</b>	<b>52</b>
4.2.4.	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>53</b>
4.2.5.	<b>Delineamento experimental e análise estatística.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 2.</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL 1 “<i>Composition and biological properties of wild passifloras from Brazilian savanna</i>”.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL 2 “Atividades antioxidante e antimicrobiana de nanoemulsões e extratos de polpas e sementes de passifloras nativas do Cerrado”.....</b>	<b>97</b>
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>132</b>

## ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está estruturada como descrito a seguir: **Capítulo 1** composto por introdução, revisão bibliográfica, objetivos e material e métodos. **Capítulo 2** com resultados, discussão e conclusão do experimento 1, que compôs a pesquisa realizada no doutorado, apresentados em formato de um artigo original, intitulado “*Composition and biological properties of wild passifloras from Brazilian savanna*”, submetido ao periódico “*Food Chemistry*”. **Capítulo 3** com resultados, discussão e conclusão do experimento 2, que compôs a pesquisa realizada no doutorado, apresentados em formato de um artigo original, intitulado “Atividades antioxidante e antimicrobiana de nanoemulsões e extratos de polpas e sementes de passifloras nativas do Cerrado”, com vistas a ser submetido ao periódico “*LWT – Food Science and Technology*”. E, por fim, **Capítulo 4**, com as considerações finais da tese.

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

Diversas plantas do Cerrado apresentam potencial valor de exploração, mas ainda são subutilizadas. Estudos classificaram esses frutos no rol mundial de alimentos ricos em compostos bioativos, com grande capacidade de sequestrar radicais livres (SIQUEIRA *et al.*, 2013), o que pode influenciar no retardamento de processos como o envelhecimento (NORATTO *et al.*, 2010) e na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (FERNANDES *et al.*, 2015).

Maracujá é o nome popular dado às espécies do gênero *Passiflora*, Família Passifloraceae. Estima-se que 150 espécies são nativas do Brasil (BELLON *et al.*, 2007), das quais 70 possuem potencial para uso alimentar e terapêutico. As espécies mais cultivadas são a *P. edulis* e a *P. alata*. Em nível mundial, inclui-se também a *P. incarnata*. Mais de 40 espécies de passifloras silvestres são encontradas no Cerrado, dentre as quais se destacam a *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. quadrangulares*, *P. serrato-digitata* e *P. setacea* (FALEIRO *et al.*, 2005; GADIOLI *et al.*, 2016).

Folhas, cascas e polpas de passifloras são comumente utilizadas na medicina popular, na forma de sucos ou chás, para prevenir ou minimizar os efeitos de insônia, tremores, diabetes e obesidade. Além disso, a literatura vem provando que vários compostos presentes em diferentes partes das passifloras são responsáveis pela modulação dessas propriedades biológicas (CARVAJAL *et al.*, 2014; MIN *et al.*, 2014; ARGENTIERI *et al.*, 2015). Tais efeitos estão relacionados principalmente à presença de compostos bioativos, como carotenoides e compostos fenólicos, especialmente orientina, isorientina, vitexina e isovitexina, que são os principais flavonoides presentes nas passifloras (GADIOLI *et al.*, 2016). Por outro lado, as poliaminas, aminas bioativas recentemente identificadas em polpas de diferentes espécies de passiflora (SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2011; BOMTEMPO *et al.*, 2016), também foram descritas com propriedades antioxidantes e neuroativas (KALAC, 2014).

No entanto, dados sobre a composição e os efeitos biológicos de passifloras silvestres, nativas do Cerrado ainda são escassos, especialmente das sementes, que são um subproduto da obtenção de polpas e, muitas vezes, desperdiçadas. Por isso, ainda é necessário continuar a elucidação da composição das passifloras silvestres do Cerrado.

Nesse contexto, extratos com compostos bioativos, como compostos fenólicos, e com aminas bioativas podem ser obtidos de passifloras para o desenvolvimento de

novos suplementos dietéticos ou agentes antimicrobianos, à base de diferentes partes das plantas de passiflora. Uma possível alternativa para a aplicação desses extratos de frutos ricos em compostos bioativos, na indústria alimentícia, é por meio do uso de nanotecnologia, com a nanoemulsificação dos extratos, uma vez que esta tecnologia ajuda a manter a estabilidade dos compostos e até mesmo a potencializar certas atividades biológicas inerentes a esses extratos (O'HANLON *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2016).

Estudos recentes têm mostrado que produtos naturais apresentam bom desempenho quando nanoemulsificados, mantendo uma estabilidade prolongada dos compostos, além de aprimorarem suas atividades antioxidante, antimicrobiana, melhorarem a digestibilidade e a biodisponibilidade. É o caso das nanoemulsões de óleo de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (LOU *et al.*, 2017), extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (ZORZI *et al.*, 2016) e de *Vellozia squamata* (QUINTÃO *et al.*, 2013).

No cenário em que a indústria de alimentos precisa se adaptar às novas demandas de busca por alimentos seguros, livres de contaminantes e mais saudáveis, a nanotecnologia é estratégica. Os avanços nessa área permitem encontrar tecnologias que prolonguem a vida de prateleira, minimizem ou impeçam a oxidação e mantenham a inocuidade, tornando o alimento mais saudável, estável e com boas características sensoriais. Um exemplo é a criação de filmes com atividade antimicrobiana (SHANTHILAL e BHATTACHARYA, 2014; LOU *et al.*, 2017).

Com a nanotecnologia, também é possível desenvolver novas ferramentas de processamento para a fabricação de ingredientes, utilizar novos materiais em embalagens e aprimorar os sistemas de entrega de princípios ativos, melhorando a biodisponibilidade de nutrientes. Por isso, existe um interesse crescente em utilizar nanoestruturas para aperfeiçoar o desempenho e a performance de alimentos (CUSHEN *et al.*, 2012; CORREDIG, 2013).

Tendo em vista que produtos naturais são ricos em compostos com propriedades biológicas benéficas para a saúde, que frutos do Cerrado apresentam boa qualidade em compostos bioativos e que passifloras são amplamente utilizadas na medicina popular, nanoemulsificar extratos de passifloras, visando o aproveitamento integral dos alimentos, a estabilidade dos seus compostos e o aprimoramento de atividades antioxidantes e antimicrobiana, pode ser uma alternativa viável.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BIODIVERSIDADE

A biodiversidade é um tema estratégico no contexto da alimentação e medicina popular, uma vez que plantas fornecem alimentos, remédios e boa parte da matéria-prima industrial utilizada pelo ser humano (WWF, 2017). Entretanto, é necessário evidenciar o impacto negativo das atividades humanas em detrimento da biodiversidade, que vem causando a extinção de inúmeras plantas e animais (SANTOS, 2016).

Áreas protegidas, localizadas nos países em desenvolvimento, contemplam as maiores reservas de biodiversidade do planeta. O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em biodiversidade e, devido às suas dimensões geográficas, possui maior responsabilidade global na proteção de três grandes regiões naturais: Amazônia, Pantanal e Caatinga; e dois *hotspots* de biodiversidade: Mata Atlântica e Cerrado (ARMSWORTH *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016).

O Cerrado tem especial contribuição para a conservação da biodiversidade mundial, pois é a savana com maior número de espécies endêmicas do planeta. Diferentes condições de solo ao longo de sua extensão, bem como a heterogeneidade da vegetação e da fauna são fatores que o levam ser considerado com grande riqueza biológica. Entretanto, ressalta-se que é a vegetação menos protegida no Brasil e constantemente sofre impactos negativos ocasionados pelas modificações humanas, como a pecuária extensiva, as monoculturas e a construção de estradas (BERNACCI *et al.*, 2005; QUEIROZ, 2009).

Na América do Sul, o Cerrado é o segundo maior bioma, com área correspondente a 24% do território brasileiro. Sua extensão contínua incide sobre os estados do Planalto Central (Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e o Distrito Federal) e em parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí, além de ocorrer em áreas isoladas em quase todos os estados da região Norte (Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia) e também em São Paulo (RIBEIRO *et al.*, 1998), conforme pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1.** Distribuição dos ecossistemas brasileiros, incluindo o bioma Cerrado  
 Fonte: PARRON *et al.* (2008).

Com uma flora bastante diversificada, muitas plantas do Cerrado possuem potencial valor de exploração em diversos setores, inclusive no alimentício e medicinal (SANO *et al.*, 2004; FRANZON, 2009). As partes comestíveis de plantas do Cerrado, como frutos, seus subprodutos e folhas apresentam elevado valor nutricional e características sensoriais peculiares, que permitem o seu consumo *in natura* ou processados na forma de geleias, bolos, farinhas, barras de cereal, sorvetes e sucos (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2004; SANO *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2010). Propriedades anti-inflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana e laxativa destacam o uso dessas plantas na medicina popular (LUIZ-FERREIRA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013).

Mais de 40 espécies de passifloras silvestres são encontradas no Cerrado, dentre as quais se destacam *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. quadrangulares*, *P. serrato-digitata* e *P. setacea* (FALEIRO *et al.*, 2005).

## 2.2. PASSIFLORAS

O gênero *Passiflora* possui a maior expressividade da Família Passifloraceae e agrupa de 450 a 600 espécies de passifloras, das quais cerca de 70 são comestíveis e popularmente conhecidas por maracujá. Estima-se que de 150 a 200 espécies sejam originárias do Brasil (BELLON *et al.*, 2007; CERVI, 2010). As passifloras são

plantas com elevado poder de diversificação, que podem ser utilizadas por suas propriedades agrícolas, alimentares, medicinais, cosméticas e até na área ornamental, devido à exuberância e singularidade das formas de suas flores (FALEIRO, 2008).

Diferentes partes das passifloras, tais como folhas, polpas, sementes e cascas têm revelado a presença significativa de vitamina C, vitamina E, carotenoides, polifenóis e aminas bioativas (SANTANA *et al.*, 2015; BOMTEMPO *et al.*, 2016; GADIOLI *et al.*, 2016). Mesmo o Brasil sendo o maior produtor e consumidor mundial de maracujá (IBGE, 2013), a medicina popular utilizando essas plantas para ações terapêuticas e estudos comprovando essas mesmas funções, como ação neuroprotetora, antimicrobiana e antioxidante (PINELI *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014; ARGENTIERI *et al.*, 2015), apenas duas espécies de maracujá são comercialmente cultivadas no país: *P. edulis*, com predominância em quase sua totalidade (95%) e *P. alata* (MELETTI, 2011). Além delas, vale ressaltar que a *P. incarnata* é amplamente comercializada no mundo, por seu valor medicinal na produção de fitoterápicos (APPEL *et al.*, 2011). Entretanto, o interesse por explorar espécies silvestres, como a *P. setacea* e até mesmo a *P. alata* (Figura 2), tem aumentado devido às propriedades biológicas e qualidade sensorial cada vez mais destacadas das passifloras (COHEN *et al.*, 2008; OZAROWSKI e THIEM, 2013; PINELI *et al.*, 2014).

Em revisão sistemática sobre o perfil de compostos fenólicos de todas as espécies de passifloras até então estudadas, publicada pelo nosso grupo (GADIOLI *et al.*, 2016), dos 82 artigos selecionados no estudo, 24 foram desenvolvidos por grupos brasileiros. Fenólicos de 34 espécies de passifloras foram avaliados, das quais 30,8% eram *P. edulis*, 19,2% *P. incarnata* e 9,6% *P. alata*. Apenas um estudo avaliou o perfil de fenólicos da *P. setacea* (VIEIRA, 2013).



**Figura 2.** Passifloras silvestres nativas do Cerrado. (a) *Passiflora setacea*. (b) *Passiflora alata*

A *P. alata* é originária do Brasil, com distribuição nativa, não endêmica, no Cerrado, na Mata Atlântica e na Amazônia, estando presente em todas as regiões geográficas do país (CERVI, 2010). Popularmente, é conhecida como maracujá-doce, maracujá-grande, maracujá-guaçu, maracujá-alado, maracujá-de-refresco e maracujá-de-comer. Como características sensoriais, apresenta polpa com leve acidez, adocicada e odor forte e agradável (MELETTI, 2011). Em contrapartida, as infusões, preparadas com as folhas, lembram o gosto amargo do chá verde, possivelmente em razão do seu conteúdo de compostos fenólicos (PINELI *et al.*, 2014). Quanto à composição química, é possível encontrar carotenoides, vitaminas do complexo B e vitamina C; minerais como cálcio, ferro e fósforo (COSTA e TUPINAMBÁ, 2005), compostos fenólicos (COHEN *et al.*, 2008) e amins bioativas como espermina e espermidina (BOMTEMPO *et al.*, 2016). Estudos têm revelado a *P. alata* com propriedades biológicas importantes para a saúde humana, tais como atividade anti-inflamatória, com ação antidiabética (FIGUEIREDO *et al.*, 2016), ação gastroprotetora (WASICKY *et al.*, 2015), efeitos sedativos (DOYAMA *et al.*, 2005) e atividade antioxidante (PINELI *et al.*, 2014). Porém todos esses estudos têm investigado as folhas da referida espécie. Ainda é escasso, na literatura, dados disponíveis sobre propriedades biológicas e até mesmo composição química das polpas e sementes de *P. alata*.

A *P. setacea* é uma espécie silvestre de ocorrência natural nos biomas Caatinga e Cerrado, bem como em áreas de transição como o Semiárido do norte de

Minas Gerais, regiões típicas de alta incidência solar. Ela é popularmente conhecida como maracujá-sururuca, maracujá-de-boi, maracujá-do-Cerrado e maracujá-do-sono (de OLIVEIRA e RUGGIERO, 2005; CERVI, 2010). A polpa apresenta gosto doce-acidulado e a infusão à base de folhas apresenta boa aceitação entre os consumidores, com características sensoriais que remetem ao chá preto e ao chá mate (LESSA, 2011; PINELI *et al.*, 2014). Em sua composição, encontram-se compostos fenólicos, carotenoides, aminas bioativas, elevados teores de minerais como potássio (1.600 mg/100 g) e magnésio (75 mg/100 g). As propriedades biológicas da *P. setacea* ainda não estão muito bem descritas, mas sabe-se da ação antioxidante de suas folhas e do óleo extraído de suas sementes, bem como efeito anti-úlceras das folhas (BOMTEMPO *et al.*, 2016; PINELI *et al.*, 2014; de SANTANA *et al.*, 2015; VETORE NETO, 2015).

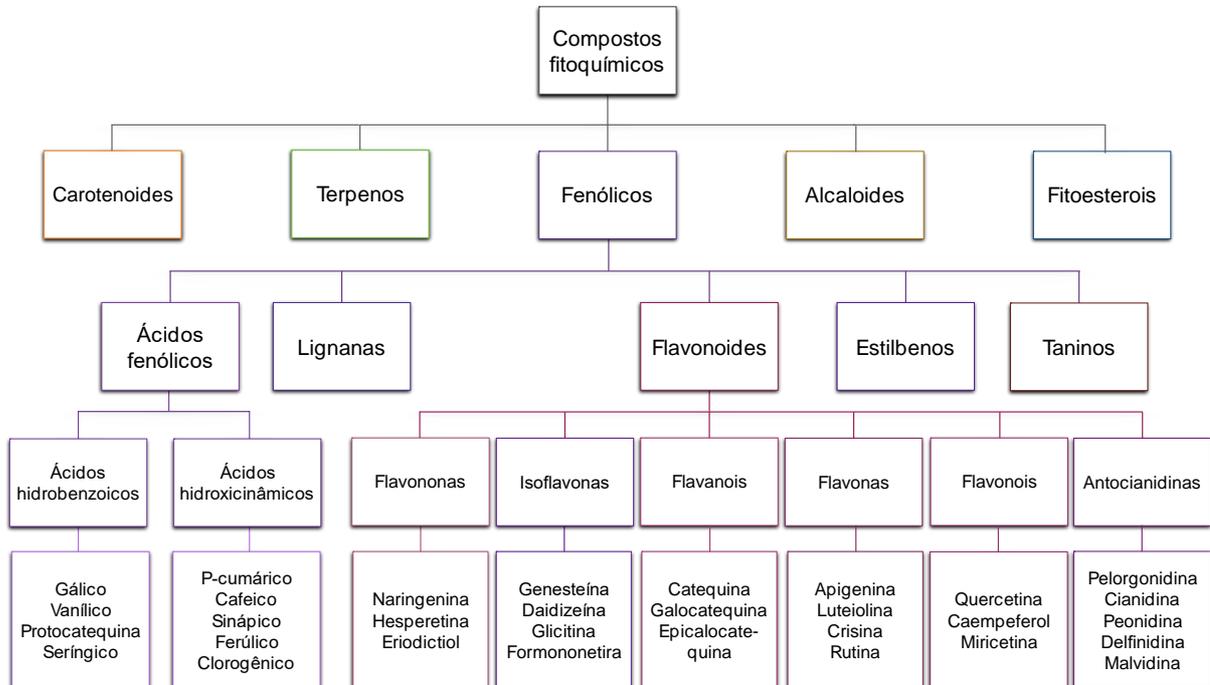
Visto que o uso popular de passifloras silvestres e convencionais está associado aos benefícios que elas podem gerar à saúde e que estudos vêm comprovando diversas atividades biológicas favoráveis (DENG *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014; CAZARIN *et al.*, 2015) a continuação da caracterização de outras partes das plantas de passifloras silvestres, bem como a investigação das propriedades biológicas e funcionais que seus compostos podem gerar se mantém importante. Em especial, destaca-se a investigação de passifloras nativas do Cerrado, um bioma que tem revelado frutos com elevada qualidade nutricional e de compostos bioativos (CANDIDO *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2017). Ademais, vale ressaltar a importância de se estudar todas as partes da planta que possam virar alimento, já que sementes e cascas têm apresentado teor de compostos fenólicos bastante elevado quando comparadas às partes usualmente comestíveis (YILMAZ *et al.*, 2015).

### 2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático, ligado a um ou mais grupos hidroxila. Sua síntese ocorre pela necessidade de mecanismos de proteção contra o estresse biológico e ambiental (ataque de pragas e fungos, infecções bacterianas e alta exposição aos raios ultravioletas), além de contribuir para o crescimento e desenvolvimento da planta (CROZIER *et al.*, 2008; IGNAT *et al.*, 2011).

A classe dos compostos fenólicos compreende o maior grupo dentre os fitoquímicos e contempla mais de 8.000 substâncias com estruturas variadas,

categorizadas em cinco subclasses, de acordo com a sua estrutura química básica (Figura 3): ácidos fenólicos, lignanas, flavonoides, estilbenos e taninos (GARCIA-SALAS *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Classes de fitoquímicos, com subdivisão da classe dos fenólicos

Fonte: da CUNHA (2017).

Fatores geográficos, climáticos e intrínsecos às plantas, tais como genótipo, idade da planta, estágio de maturação, ambiente de cultivo, tipo de solo, exposição à luz solar e precipitação interferem diretamente na síntese de metabólitos secundários dos vegetais. Esses fatores, inclusive, contribuem para a diferente concentração de fenólicos encontradas nas distintas partes de uma mesma planta, como folhas, cascas, polpas e sementes (CANDIDO *et al.*, 2015; YILMAZ *et al.*, 2015).

Tendo em vista a interferência dos fatores edafoclimáticos sobre a composição fenólica de frutos e seus subprodutos, os frutos do Cerrado têm se revelado matrizes fontes de fenólicos. RUFINO *et al.* (2010) propuseram uma classificação para conteúdo de compostos fenólicos, em matéria fresca, em matrizes alimentares: alta para concentrações acima de 500 mg de ácido gálico equivalente (AGE)/100 g, média para concentrações entre 100-500 mg AGE/100 g e baixa para conteúdos abaixo de 100 mg AGE/100 g. De acordo com essa classificação, polpas de frutos do Cerrado como gabirola (1.222 mg AGE/100 g) e buriti (435 mg AGE/100 g) são consideradas com elevado e médio teores de compostos fenólicos totais, respectivamente.

Associado à quantidade de compostos fenólicos presentes em produtos naturais, também é importante elucidar quais os tipos de fenólicos estão presentes na matriz estudada. A partir dessa caracterização, é possível inferir e avançar nos estudos das propriedades biológicas que o alimento possui, de acordo com a atividade desenvolvida por cada tipo de fenólico presente (GADIOLI *et al.*, 2016). LÓPEZ-VARGAS *et al.* (2013) identificaram atividade antioxidante e antimicrobiana de polpas + sementes de *P. edulis* e atribuíram essas atividades aos fenólicos encontrados na planta.

A quantificação dos compostos fenólicos em frutas e hortaliças revela informações a respeito da qualidade do alimento e dos potenciais benefícios à saúde que eles trazem. Os fenólicos são considerados compostos bioativos por exercerem papel importante na saúde. Diversos estudos os tem caracterizado com ações biológicas benéficas ao organismo humano, como ação antioxidante, antimicrobiana, neuroprotetora, antidiabética, anti-inflamatória, anticancerígena, entre outros (ABBASI *et al.*, 2012; BORGHI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A partir do exposto, nota-se que os compostos fenólicos são amplamente estudados. Existem diversos métodos capazes de identificar e quantificá-los. Os métodos colorimétricos são fundamentais para verificar a presença de fenólicos. Eles fazem dosagem totais, como o método de *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON e ROSSI, 1965), ou dosam algumas subclasses, como flavonoides totais (GONZÁLEZ-AGUILAR *et al.*, 2007), antocianinas totais (SHIN *et al.*, 2007) e 4-dimetilaminocinamaldeído (DMAC) (PRIOR *et al.*, 2010), responsável por quantificar os taninos condensados totais.

Entretanto, é com métodos mais sensíveis, como os cromatográficos, espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear, que é possível realizar a separação e quantificação dos compostos fenólicos isoladamente (GADIOLI *et al.*, 2016). Os fenólicos raramente estão disponíveis na forma livre; geralmente são encontrados como ésteres ou glicosídeos e costumam estar ligados a um número variável de açúcares (glicose, xilose, rutinose, arabinose, raminose e galactose) (JUSTESEN *et al.*, 1998). Esses tipos de compostos ligados só são possíveis de serem identificados a partir de técnicas como a espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear.

Em revisão sistemática sobre os compostos fenólicos das passifloras (GADIOLI *et al.*, 2016), foi possível concluir que os fenólicos das passifloras são amplamente estudados e alvo de grande interesse para pesquisas. Os principais compostos presentes nas passifloras são orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e seus derivados. O principal método usado para identificá-los foi o de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), mas ele ainda restringe uma elucidação mais específica dos compostos, pois não consegue verificar a que os fenólicos estão ligados. Por fim, foi enfatizada a necessidade de se explorar o uso das técnicas de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, que são capazes de mostrar mais detalhes dos compostos fenólicos, como seus isômeros e ligações com outras moléculas.

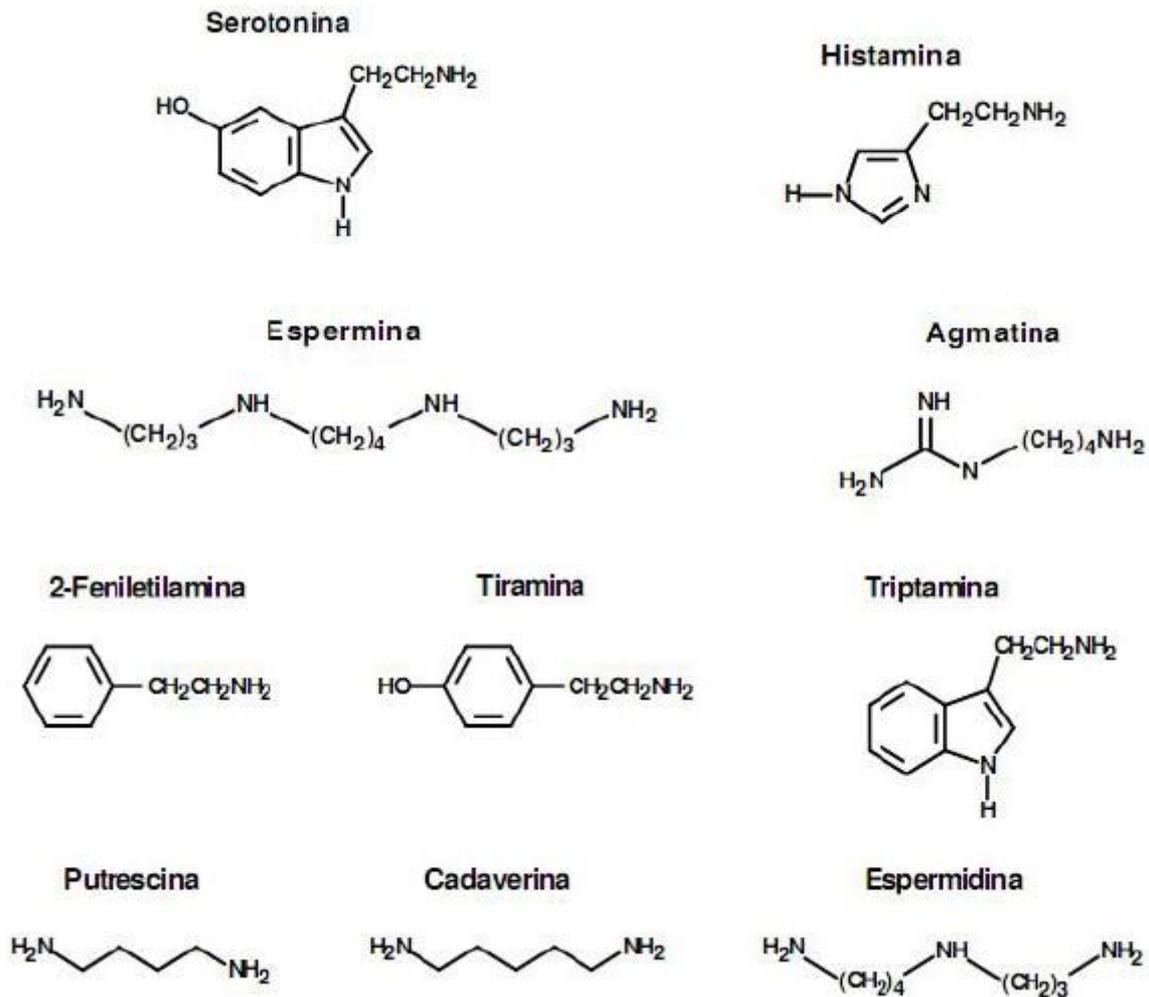
#### 2.4. AMINAS BIOATIVAS E AMINOÁCIDOS

Nos alimentos, os aminoácidos livres podem ocorrer normalmente ou serem liberados de alguma proteína, como resultado da atividade de microrganismos proteolíticos, que podem fazer parte da microbiota associada ao alimento ou serem introduzidos para a obtenção de produtos fermentados. Por sua vez, a presença de aminas bioativas em alimentos ocorre pela disponibilidade de aminoácidos livres, pela presença de microrganismos com atividade de descarboxilase em aminoácidos, pela existência de condições favoráveis para o crescimento de microrganismos ou pela produção e ação de enzimas de descarboxilação (GLORIA, 2005).

Os aminoácidos são precursores de uma série de substâncias importantes para a saúde humana, incluindo as aminas bioativas. Aminas bioativas são bases orgânicas alifáticas, cíclicas ou heterocíclicas, com baixo peso molecular, presentes em animais, plantas e microrganismos (Figura 4). Recebem essa nomenclatura justamente pelas várias funções metabólicas que desempenham nas células (BARDÓCZ, 1995; GLORIA, 2005).

As aminas bioativas podem ser classificadas de acordo com sua:

- estrutura química: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, agmatina) ou aromáticas (tiramina, feniletilamina, histamina, triptamina, serotonina);
- número de grupamentos amina: monoaminas (tiramina, feniletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina, cadaverina) ou poliaminas (espermina, espermidina e agmatina);



**Figura 4.** Estrutura química de algumas aminas bioativas

Fonte: DE FARIA (2011).

- via biossintética: naturais (agmatina, putrescina, espermidina, espermina e histamina) e biogênicas (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina);
- função fisiológica: poliaminas e aminas biogênicas.

Das classificações apresentadas, a que tem relevância para a saúde é o grupo função fisiológica (BRITO *et al.*, 2017).

O grupo das poliaminas é formado pelos compostos espermina, espermidina e agmatina e pela diamina putrescina. As poliaminas são bases orgânicas alifáticas, de baixo peso molecular, hidrossolúveis e em pH fisiológico se encontram na forma de polications (MOINARD *et al.*, 2005). A síntese de poliaminas pode acontecer via ornitina, pela ação da ornitina descarboxilase (ODC), ou via arginina, citrulina ou metionina. A rota mais comum para a formação da agmatina é pela via ornitina, mas

a presença dessa poliamina em passifloras sugeriu que outro caminho seja possível, que é o da via arginina (SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2011). Na síntese da espermina e espermidina, a metionina é responsável pelo fornecimento de um grupo aminopropílico à putrescina, formando espermidina; e à espermidina, que forma a espermina (LARQUE *et al.*, 2007).

As poliaminas desempenham funções importantes na regulação do crescimento e proliferação celular, estabilização de cargas negativas de DNA, transcrição de RNA, síntese proteica, apoptose, regulação da resposta imune, atividade antioxidante, atividades neuro ou vasoativas e até mesmo antimicrobianas (LARQUE *et al.*, 2007; KALAC, 2014; KOSTOPOULOU *et al.*, 2014; PINAZO *et al.*, 2016).

Histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina, cadaverina e serotonina são compostos que formam o grupo das aminas biogênicas. A síntese de aminas biogênicas ocorre através dos aminoácidos precursores histidina, triptofano, fenilalanina e lisina (SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2011; BOMTEMPO *et al.*, 2016).

As aminas biogênicas são vasoativas, neuroativas ou psicoativas. Em baixas concentrações, modulam diversas atividades fisiológicas relevantes. A histamina e a serotonina são vaso e neuroativas; atuam na transmissão neural no sistema nervoso central e no sistema vascular. A tiramina, triptamina e a feniletilamina são vasoconstritoras, responsáveis pelo aumento da pressão sanguínea, da velocidade e da força da contração cardíacas. A histamina tem funções importantes na resposta imune, além de participar indiretamente da percepção de dor, da regulação da ingestão de água e do controle da temperatura corpórea. A serotonina atua como vasoconstritora, reduz o volume e a acidez do suco gástrico, atua no metabolismo dos carboidratos e está envolvida na regulação de diversas outras funções, tais como sono, sede, humor e atividade sexual (GLORIA, 2005). Quando em concentrações elevadas, as aminas biogênicas podem causar efeitos adversos para a saúde humana como dor de cabeça, crise hipertensiva e enxaqueca (BRITO *et al.*, 2017).

As aminas bioativas estão naturalmente presentes nas frutas, principalmente putrescina, agmatina, espermidina e espermina, com predominância de espermidina. Os perfis e concentrações de aminas em vegetais variam de acordo com a espécie e o tipo de tecido (GLORIA, 2005). Em polpas de diferentes espécies de passifloras, incluindo a *P. alata* e a *P. setacea*, foram encontrados teores elevados de espermidina (20,3 – 69,8 mg/100 g), espermina (3,5 – 14,4 mg/100 g), putrescina (9,9 – 84,1

mg/100 g), agmatina (0,7 – 13,7 mg/100 g), além de triptamina (0,2 – 0,6 mg/100 g) e serotonina (0,2 mg/100 g) (SANTIAGO-SILVA *et al.*, 2011; BOMTEMPO *et al.*, 2016).

## 2.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A defesa de mecanismos antioxidantes em razão da necessidade de combater radicais livres, gerados em processos metabólicos, busca controlar a ocorrência de danos decorrentes de tais espécies reativas. Espécie reativa de oxigênio (ERO) é o nome genérico dado a uma variedade de moléculas e radicais livres provenientes do oxigênio, dentre as quais se destacam o oxigênio singlete, o superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio, o radical peroxila e o óxido nítrico (COVARRUBIAS *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010).

Naturalmente, há um equilíbrio entre a geração de radicais livres e sua remoção pelos antioxidantes, contudo o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio causado entre oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, podendo levar a danos (POUNIS *et al.*, 2013). Elevadas concentrações de radicais livres num meio destroem o balanço redox interno e causam uma variedade de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), por exemplo senilidade prematura (GUPTA *et al.*, 2014). Fatores ambientais e biológicos, como exposição à luz ultravioleta, raios-X e raios gama, tabagismo, poluição, medicamentos e produtos químicos influenciam na formação dos radicais livres (WANG *et al.*, 2011).

Antioxidante é qualquer substância, a baixas concentrações, capaz de retardar significativamente ou inibir os danos provocados pela oxidação nas células vegetais e animais (PRIOR, 2003; SOUSA *et al.*, 2007). Tais substâncias podem ser de origem endógena (enzimas glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase) ou alimentar (algumas vitaminas e minerais, compostos fitoquímicos, aminas bioativas) (VETRANI *et al.*, 2013; KALAC, 2014). Como mecanismos de ação dos antioxidantes, citam-se a captura de radicais livres, a neutralização ou eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a ligação de íons metálicos a outros compostos, tornando-os indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (BARBOSA *et al.*, 2010).

Com a intenção de eliminar radicais livres em excesso e manter a homeostase, assim como contribuir para a redução dos riscos de DCNT, recomenda-se o consumo de antioxidantes. Entretanto, antioxidantes sintéticos podem desempenhar efeitos tóxicos ao organismo. Portanto, o uso de antioxidantes naturais advindos de alimentos

deve ser a primeira escolha, já que exercem papel fundamental na prevenção e no tratamento adjunto de DCNT e por evitarem algumas reações adversas à saúde humana (LI *et al.*, 2014). Diversos compostos antioxidantes podem ser isolados de plantas, a partir de extratos naturais para serem usados como potenciais antioxidantes em vários segmentos da indústria, inclusive na forma de nanoemulsões (RAUDONIS *et al.*, 2014).

Folhas de espécies do gênero *Passiflora* demonstraram atuação positiva na redução do estresse oxidativo *in vivo*, indicando que seus compostos bioativos podem contribuir positivamente na redução de riscos ocasionados por radicais livres (DA SILVA *et al.*, 2013; COLOMEU *et al.*, 2014). LÓPEZ-VARGAS *et al.* (2013) determinaram atividade antioxidante para polpas e sementes de *P. edulis*, atribuindo-a aos compostos fenólicos presentes nas matrizes estudadas. Em um cenário onde a busca por antioxidantes naturais, capazes de proteger as células contra a degradação oxidativa advinda dos radicais livres, e o apoio ao desenvolvimento sustentável estão cada vez mais necessários, ressalta-se a importância por encontrar compostos naturais que atuem benéficamente nos alimentos e na saúde humana, seja para o setor farmacêutico, cosmético ou alimentício (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Visto isso, há um grande interesse em avaliar a capacidade antioxidante de compostos naturais. Para tanto, diversos métodos podem ser empregados. Os mais comuns compõem dois grupos: ensaio baseado na reação de transferência de um elétron desemparelhado, monitorado pela mudança da coloração da reação quando o oxidante é reduzido; e ensaio baseado na reação de transferência de um átomo de hidrogênio, em que o antioxidante e o substrato competem pelos radicais peróxil gerados termicamente através da decomposição de compostos (HUANG *et al.*, 2005; APAK *et al.*, 2007).

Os métodos cujo princípio é a transferência de elétrons avaliam, *in vitro*, a habilidade de um composto antioxidante reduzir compostos como íons metálicos, grupos carbonila e radicais, por meio da transferência de um elétron. Nos ensaios dessa natureza, os antioxidantes reagem com o agente oxidante, que pode ser um indicador fluorescente ou colorimétrico, que muda de cor quando é reduzido. A concentração de antioxidantes presentes na amostra é proporcional à mudança de cor da reação (APAK *et al.*, 2007).

A título de exemplo, os ensaios baseados na transferência de elétrons incluem: capacidade de eliminação do radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ensaio de

descoloração do radical ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]), capacidade de redução do Fe<sup>3+</sup> (FRAP) e redução de cobre (CUPRAC). Os ensaios de transferência de átomo de hidrogênio são: potencial reativo antioxidante total (TRAP) e capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; BENZIE, I. F. e STRAIN, J. J., 1996; PRIOR, 2003; HUANG *et al.*, 2005).

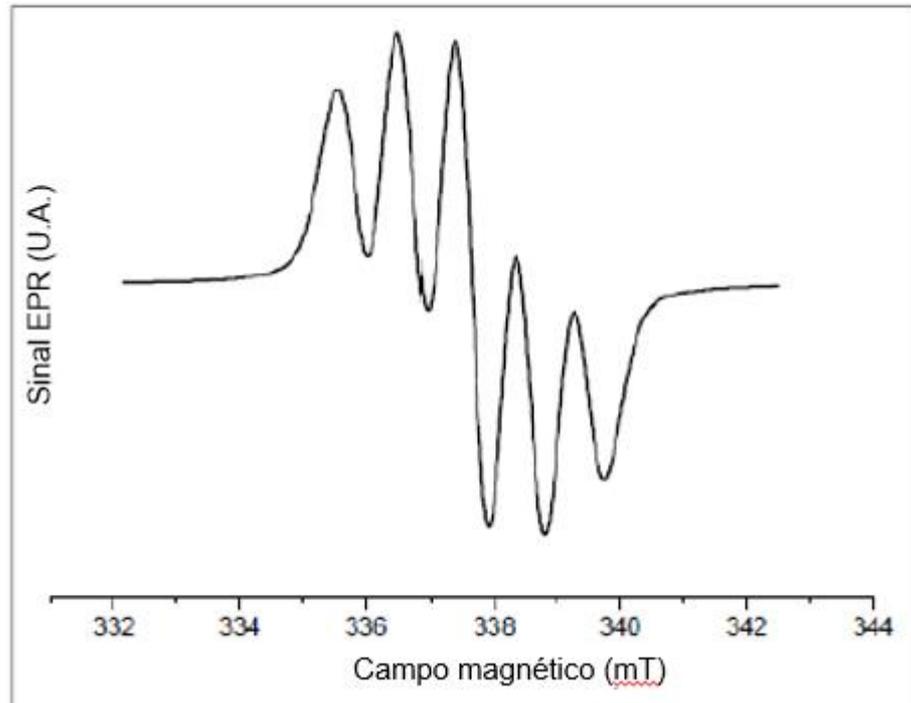
Como o complexo antioxidante de uma matriz de origem natural pode ter padrão de atividade diferente em métodos de avaliação da atividade antioxidante distintos, com produção de resultados diferentes a cada triagem, recomenda-se a utilização conjunta de pelo menos dois métodos *in vitro* a fim de assegurar o resultado obtido (LOPEZ-ALARCON e DENICOLA, 2013).

Entretanto, tem sido encontrada correlação positiva entre os métodos usados para avaliação da atividade antioxidante (ABTS, DPPH, FRAP and ORAC), conforme observado nos ensaios com frutos do Cerrado nos estudos de CANDIDO *et al.* (2015) e ALVES *et al.* (2017). Este fato sugere que os métodos podem ser comparáveis entre si, dependendo da natureza da matriz alimentar avaliada.

Além de ensaios colorimétricos *in vitro* para determinar a atividade antioxidante de compostos naturais, outras técnicas também podem ser empregadas, como é o caso da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), capaz de avaliar a atividade antioxidante de radicais como o DPPH•.

A espectroscopia de EPR se baseia no princípio da presença de campos magnéticos fortes, que resultam na absorção da radiação de micro-ondas (eletromagnéticas) por elétrons não emparelhados, gerando sinais de EPR. A EPR, portanto, é a técnica ideal para a detecção de espécies com elétrons desemparelhados, já que as moléculas ou átomos precisam estar nessa condição para liberarem o sinal desejado. Com isso, os radicais livres mostram um comportamento paramagnético e podem ser identificados, independentemente da interferência de cor provocada por extratos de plantas e pelas reações dos métodos de atividade antioxidante (NAIK *et al.*, 2014; MORALES *et al.*, 2015).

Isto posto, o DPPH• é um radical paramagnético que gera cinco linhas EPR, com intensidades diferentes, observadas no seu espectro. Essas linhas podem ser explicadas pela interação do elétron desemparelhado com dois núcleos de nitrogênio (Figura 5) (KRZYTEK *et al.*, 1997).



**Figura 5.** Sinal de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) do radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Os resultados da atividade antioxidante da amostra avaliada são verificados com a redução do sinal EPR do DPPH quando na presença de antioxidantes.

## 2.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A cultura popular tradicionalmente utiliza produtos naturais como métodos terapêuticos na cura, prevenção e minimização de efeitos de doenças. O interesse na busca de compostos originários de plantas, com propriedades antibacterianas, tem aumentado, inclusive pela necessidade de se encontrar novas alternativas contra a resistência dos microrganismos em geral. Além disso, os antimicrobianos naturais podem ser utilizados tanto para ações terapêuticas, na saúde humana, como no controle do crescimento de microrganismos em alimentos, na indústria de alimentos (TANG *et al.*, 2012; HILL e GOMES, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

Alimentos e plantas podem apresentar mecanismos de defesa frente ao ataque de microrganismos devido à presença de substâncias naturais presentes em sua constituição. Estudos têm caracterizado essas substâncias como agentes antimicrobianos, dentre as quais, podem-se exemplificar eugenol, timol e carvacrol, compostos originários do metabolismo secundário de plantas como o orégano, canela e cravo (KAMIMURA *et al.*, 2014; TAO *et al.*, 2014). Contudo, nem sempre os

princípios ativos de uma planta são conhecidos. Mesmo assim ela pode apresentar atividade antimicrobiana satisfatória e ser aplicada para o propósito desejado. É o caso de extratos de polpas e sementes de passifloras; ou polpas, cascas e sementes de acerola e goiaba, por exemplo (LÓPEZ-VARGAS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Plantas ricas em compostos bioativos como os compostos fenólicos, têm sido descritas com ótimo desempenho na atividade antimicrobiana. A maioria dos estudos tem atribuído essa ação aos compostos fenólicos. Entretanto, óleos essenciais, aminas bioativas, certos aminoácidos ou peptídeos também já foram descritos como antimicrobianos de fontes naturais (KOSTOPOULOU *et al.*, 2014; IRWANSYAH *et al.*, 2015; PINAZO *et al.*, 2016; LOU *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação desses agentes antimicrobianos naturais ainda não está muito bem descrito, mas acredita-se que eles atuem causando danos à membrana citoplasmática e provocando vazamento do conteúdo das células bacterianas (NEGI *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014).

Como agentes etiológicos de alta patogenicidade e comuns a toxinfecções alimentares podem-se elencar a *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, com habilidade de fermentar glicose e lactose, bem como de crescer em ambientes com alta variabilidade de pH, 4,4 a 9,0. É um patógeno de origem alimentar, está presente no intestino e nas fezes de animais de sangue quente e do homem. Alimentos como carnes, aves, pescados e hortaliças, maionese, produtos lácteos, entre outros, estão susceptíveis à contaminação com *E. coli*. Essa contaminação é de origem fecal, por meio do contato com alimentos e utensílios contaminados inicialmente por manipuladores. A transmissão para os humanos ocorre pelo consumo de alimentos e utensílios contaminados, bem como mãos não higienizadas e alimentação cruzada. A *E. coli* pode se multiplicar em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na produção de alimentos e em resíduos de alimentos. Ampicilina, cefazolina e cefalotina são exemplos de antimicrobianos sintéticos utilizados para a eliminação de *E. coli* (JAY, 2005; GERMANO, 2011; FORSYTHE, 2013)

O *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, com formato de coco, geralmente se encontra agrupado, em formato de cachos de uva. É anaeróbio facultativo, formador de esporos, catalase positivo. A importância do *S. aureus* para a saúde, se

dá na sua alta patogenicidade e fácil contaminação de produtos cárneos, ovos, leite, alimentos crus. Os seres humanos são o principal reservatório dessa bactéria e os responsáveis pela contaminação de alimentos, utensílios e superfícies. A transmissão do *S. aureus* ocorre por meio de ferimentos nas mãos ou lesões purulentas. As infecções mais importantes causadas pelo *S. aureus* são bacteremia, endocardites e infecções do trato respiratório. Cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina e rifampicina são os antimicrobianos sintéticos comumente utilizados para o combate ao *S. aureus* (TORTORA, 2012).

Há diversos ensaios que podem ser empregados na avaliação da atividade antimicrobiana de extratos ou compostos naturais, como o de difusão em ágar, com a técnica do poço ou do disco, ensaios de macro ou microdiluição em caldo. As desvantagens de se adotar as técnicas de difusão em ágar é que a solubilidade e difusibilidade dos compostos de todas as amostras precisam ser equivalentes. Peso molecular e solubilidade em água são fatores que interferem, facilitando ou prejudicando a difusão da amostra pelo ágar (RIBEIRO, 2000; ESTRELA, 2003; DA SILVA SILVEIRA *et al.*, 2009).

Por outro lado, o ensaio de microdiluição em caldo, uma técnica adaptada da macrodiluição, é todo realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços e apresenta diversas vantagens como maior facilidade da interação entre o microrganismo e a amostra a ser testada, pelo fato de estarem em meio líquido; maior economia de espaço e de reagentes em razão da miniaturização do teste de diluição; reprodutibilidade dos resultados devido à possibilidade de preparar grande quantidade de amostras para usar na mesma placa; e a geração de um resultado quantitativo (concentração inibitória mínima) (ANVISA, 2008).

## 2.7. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar, que engloba as mais distintas áreas, como matemática, física, química, biologia, saúde, agronomia, alimentos, informática e ciências dos materiais. Ela se baseia no desenvolvimento e na aplicação de estruturas na escala nanométrica ( $10^{-9}$  m). Dado o tamanho das nanoestruturas, que costumam variar de 1 a 300 nm, com a nanotecnologia é possível fabricar, manipular, caracterizar e utilizar esses materiais, que por sua vez, apresentam propriedades físicas e químicas diferentes daquelas observadas quando estão em escala macroscópica (PORTER e YOUTIE, 2009). Materiais na escala nanométrica e

o desenvolvimento de tecnologias para manipular ou formular esses materiais podem fornecer informações comerciais, tecnológicas e científicas para a indústria (HUANG *et al.*, 2011).

Com o surgimento da nanotecnologia e seu aprimoramento, uma série de perspectivas tem ocorrido nos mais diversos setores de atuação. Para atender a essas demandas, uma gama de nanomateriais é desenvolvida, de acordo com o seu objetivo de aplicação. Eles podem se organizar em nanopartículas, nanoesferas, nanocristais, lipossomas, nanotubos, nanofibras, fulereno, entre outros. Para a área de alimentos, geralmente se usam nanopartículas e nanoemulsões (SILVA *et al.*, 2012).

### **2.7.1. Nanotecnologia de alimentos**

No cenário em que a indústria de alimentos precisa se adaptar às novas demandas de busca por alimentos seguros, livres de contaminantes e mais saudáveis, a nanotecnologia é estratégica. Nesse sentido, almeja-se encontrar tecnologias que contribuam para prolongar a vida de prateleira, minimizem ou impeçam a oxidação e mantenham a inocuidade do alimento. Além disso, é preciso ressaltar que o mercado de alimentos minimamente processados ou livres de aditivos químicos está em alta valorização (CUSHEN *et al.*, 2012).

A nanotecnologia é uma das áreas que está em alta ascensão na área de ciência e tecnologia de alimentos. Ela inclui uma série de aplicações diferentes: desenvolvimento de novas ferramentas de processamento para fabricação de ingredientes, uso de novos materiais em embalagem de alimentos, utilização de sensores e nanopartículas para a detecção de contaminantes e agentes patogênicos ou desenvolvimento de melhores sistemas de entrega para aprimorar a biodisponibilidade de nutrientes. Por isso, existe um interesse crescente em utilizar nanoestruturas para melhorar o desempenho e a performance de produtos alimentares (CORREDIG, 2013).

A aplicação da nanotecnologia na indústria de alimentos pode permitir a modificação de muitas características macroscópicas, como textura, gosto, outros atributos sensoriais, força de coloração, processabilidade e estabilidade durante a vida útil do alimento, levando a uma grande quantidade de novos produtos. Além disso, também é possível melhorar a solubilidade dos compostos em água, a estabilidade térmica, bem como a biodisponibilidade oral de compostos bioativos (RAO e MCCLEMENTS, 2011; SARI *et al.*, 2015).

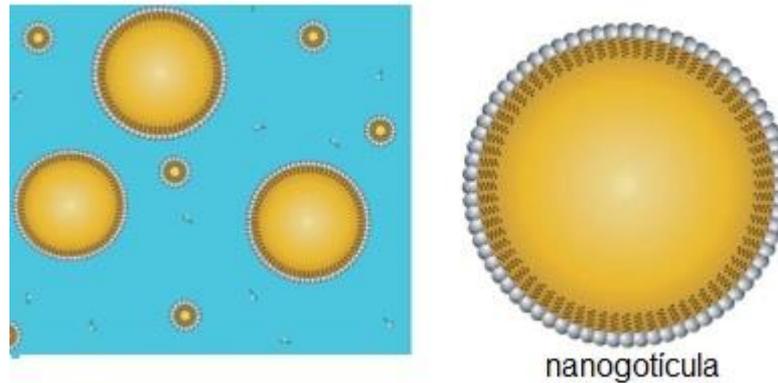
Estudos recentes têm mostrado que compostos bioativos ou extratos apresentam uma boa estabilidade quando nanoemulsificados, além de potencializarem certas atividades biológicas quando em escala nanométrica. É o caso das nanoemulsões de óleo de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (LOU *et al.*, 2017), extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (ZORZI *et al.*, 2016) e de *Vellozia squamata* (QUINTÃO *et al.*, 2013), ou das nanopartículas de PLGA (poly[DL-lactide-co-glycolide]), carregadas com extratos de sementes de *P. edulis* (SILVA *et al.*, 2014), que apresentaram boa estabilidade e melhor do desempenho antioxidante ou antimicrobiano.

### 2.7.2. Nanoemulsões

Entre os diversos tipos de sistemas nanoestruturados existem as nanoemulsões, que são dispersões líquidas compostas por uma fase oleosa e uma fase aquosa, estabilizadas por tensoativos em proporções definidas, que, formam gotas com diâmetro menor que 200 nm, o que as tornam sistemas translúcidos (ANTON e VANDAMME, 2011; O'HANLON *et al.*, 2012). Uma vez que a energia livre total de formação é sempre positiva e a tensão interfacial entre ambas as fases do sistema é grande, as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis e a parte imiscível se encontra dispersa no formato de gotículas esféricas na fase dispersante (Figura 6). Embora as nanoemulsões sejam termodinamicamente instáveis, a taxa de desestabilização é baixa porque o efeito do movimento Browniano é suficiente para superar as forças gravitacionais. Por esta razão, as nanoemulsões são mais estáveis à sedimentação, cremação, coalescência do que as emulsões convencionais (TADROS *et al.*, 2004; MCCLEMENTS, 2012; GUPTA *et al.*, 2016).

Diversos são os fatores que influenciam na estabilidade das nanoemulsões. Na fase oleosa, quando a viscosidade do óleo é alta, as gotículas ficam mais firmes e menos susceptíveis ao rompimento de suas membranas por meios mecânicos. Por isso, o conhecimento das características físico-químicas da fase oleosa é necessário para se ajustar a nanoemulsão à função desejada (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2017). A relação de viscosidade entre fase oleosa e fase aquosa também afetam o tamanho final da gotícula: quanto mais perto é a relação de viscosidade entre a fase oleosa e a fase aquosa, mais eficiente é a homogeneização e menor é o tamanho das gotículas (QIAN e MCCLEMENTS, 2011). Outro fator que também deve ser levado em consideração é a solubilidade do óleo, pois óleos com tendência a uma maior solubilidade em água favorecem o fenômeno de desestabilização chamado

maturação de *Ostwald*, que consiste no aumento das gotículas provocado pela alimentação de gotículas menores, devido à rápida difusão da fase oleosa ao longo da fase contínua (TAYLOR, 1998; GUERRA-ROSAS *et al.*, 2016).



**Figura 6.** Esquema de uma nanoemulsão formulada com óleo, água e surfactante. A nanogotícula é estruturada com um núcleo hidrofóbico, para onde estão voltadas as caudas do surfactante, e uma superfície hidrofílica, formada pela cabeça do surfactante, que tem afinidade com a fase dispersante (água)

Fonte: Adaptado de MCCLEMENTS (2012).

O tipo e a concentração de tensoativo também exercem grande impacto nas características de nanoemulsões, pois ele pode atuar de maneiras distintas na interface óleo-água, a depender da sua estrutura molecular, que determina o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e a capacidade de adsorção, para reduzir a tensão interfacial entre óleo-água. À medida em que se aumenta a concentração de surfactante no sistema, o tamanho das gotículas tende a diminuir (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2017). A maioria dos tensoativos de grau alimentício são não iônicos, ou seja, não possuem carga na molécula, como o solutol, tween e span. Eles são muito usados na formulação de nanoemulsões devido à sua baixa toxicidade e à facilidade em formarem esses sistemas. A porção lipofílica geralmente é composta pelos ácidos graxos esteárico, palmítico, oleico ou linoleico, ou pela combinação deles. Já o grupo hidrofílico é geralmente composto por grupos hidroxil ou carboxil. Estudos com Solutol® HS15 têm demonstrado que ele contribui para melhor biodisponibilidade e absorção de compostos nanoemulsificados (ABDALLA *et al.*, 2008; MCCLEMENTS e RAO, 2011; DASH *et al.*, 2015).

As nanoemulsões são nanosistemas atraentes para a indústria de alimentos por serem estáveis, apresentarem reologia ajustável e devido às suas características translúcidas, com tamanho pequeno da gotícula, o que favorece os sistemas de

entrega, biodisponibilidade e potencializa certas atividades benéficas para a saúde, como atividades antioxidante e antimicrobiana. Na indústria de alimentos, elas podem ser utilizadas na produção de alimentos inteligentes, incorporando ingredientes difíceis de solubilizar em água, como os carotenoides ou a curcumina, por exemplo, para melhorar a qualidade nutricional. Elas também podem atuar na estabilidade de aromatizantes ou conservantes naturais, ou como filmes comestíveis que conservam melhor os alimentos, em embalagens ou superfícies de alimentos altamente perecíveis, como produtos lácteos, frutas e vegetais. Ainda, podem ser ingredientes de suplementos alimentares, com a função, inclusive, de prolongar a estabilidade dos compostos bioativos e também podem atuar como substitutos de antioxidantes sintéticos, tais como o hidroxitolueno butilado (BHT) (SARI *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2016; LOU *et al.*, 2017).

Por fim, é interessante destacar que há um interesse crescente no desenvolvimento de nanoemulsões para fins alimentares, que utilizem surfactantes biodegradáveis, tais como proteínas, polissacarídeos ou fosfolipídios, que conferem propriedades de textura específicas, além da habilidade na formação de filmes (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2017; LOU *et al.*, 2017).

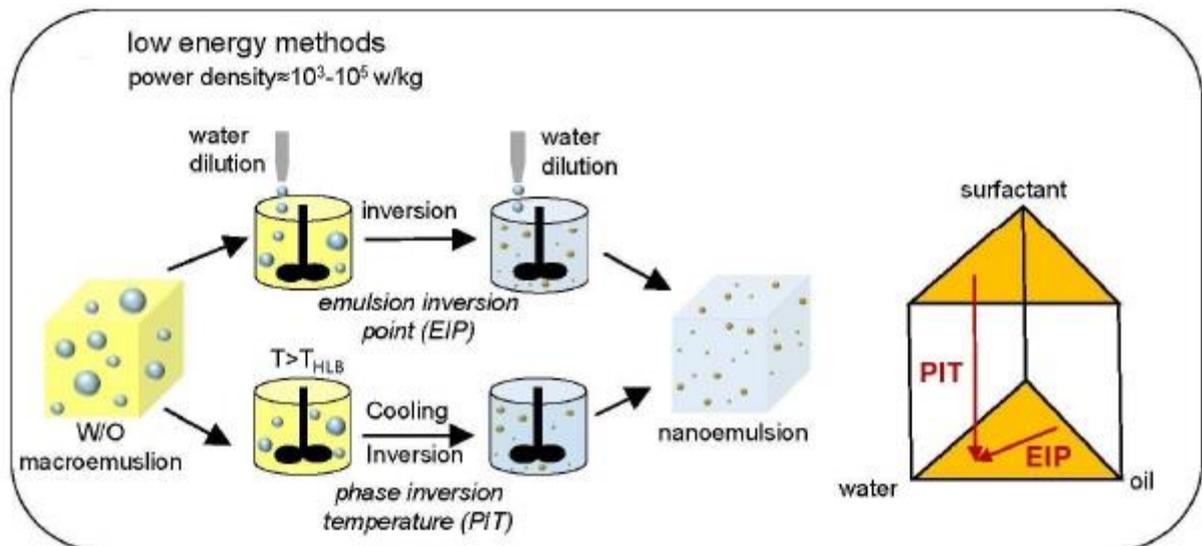
### **2.7.3. Métodos para obtenção de nanoemulsões**

O tipo de processo utilizado para a formulação de uma nanoemulsão interfere diretamente na sua estrutura. Normalmente, as nanoemulsões são obtidas por processos que demandam alta ou baixa energia ou condensação (GUPTA *et al.*, 2016; KOMAIKO e MCCLEMENTS, 2016).

Os métodos de alta energia incluem o uso de equipamentos sofisticados, que fornecem energia suficiente para reduzir a tensão interfacial entre a fase oleosa e a fase aquosa, formando gotículas da fase dispersa na escala manométrica. As técnicas mais comuns são as de microfluidização de alta pressão, homogeneização-*evaporação*, homogeneização de alta pressão e as que utilizam dispositivos ultrassônicos. Os equipamentos utilizados para obter nanoemulsões por métodos de alta energia são caros e podem limitar a viabilidade comercial. Além disso, tem sido constatado que métodos de alta energia tendem a gerar gotículas com tamanho superior às obtidas pelos métodos de baixa energia (GUPTA *et al.*, 2016; GUTTOFF *et al.*, 2015; MCCLEMENTS, 2012). Já os métodos de baixa energia se apresentam com diversas vantagens em relação aos demais, por serem executados com baixo

custo, utilizarem poucos processos, serem eficientes em termos de energia, com fácil implementação, não precisarem de equipamentos especializados para execução, além de aumentarem o rol de substâncias que podem ser emulsificadas, já que não precisam, necessariamente, de utilizar temperaturas elevadas para a obtenção de nanoemulsões (MAYER *et al.*, 2013; KOMAIKO e MCCLEMENTS, 2016). Em contrapartida, como desvantagens elencam-se a limitação quanto ao tipo de óleo e de tensoativo que será usado na nanoemulsão. É necessária grande quantidade de surfactante e os métodos de baixa energia só mostram funcionar com surfactantes sintéticos, o que pode limitar a aplicação dos sistemas formulados (OSTERTAG *et al.*, 2012; GUTTOFF *et al.*, 2015).

Em contraste aos métodos de alta demanda energética, os de baixa energia começam com uma macroemulsão água em óleo (A/O), que é transformada em uma nanoemulsão óleo em água (O/A), de acordo com mudanças ocorridas na composição e na temperatura do sistema (Figura 7) (GUPTA *et al.*, 2016).



**Figura 7.** Métodos de baixa energia para obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A)

Fonte: Adaptado de GUPTA *et al.* (2016).

Dentre os métodos de emulsificação por baixa energia, é possível destacar o método de inversão de fase por temperatura (PIT), descrito inicialmente por SHINODA e SAITO (1969). Basicamente, a dispersão coloidal obtida pelo PIT, opticamente transparente, é formada quando uma mistura de surfactante, óleo e água é aquecida

em torno da temperatura de inversão de fase e, em seguida, o sistema é resfriado por meio de agitação contínua (MCCLEMENTS, 2012).

Esse método induz uma inversão de fase com o aquecimento do sistema, forçando a transição de uma emulsão O/A em baixa temperatura para uma emulsão A/O em alta temperatura (fase de inversão transicional). Ao ser resfriado novamente até a temperatura ambiente, o sistema passa por um ponto de curvatura zero, com tensão interfacial mínima, retornando para a conformação O/A, com a formação de gotículas de óleo finamente dispersas. Nesse sentido, a tensão interfacial da interface óleo-água perto do ponto de inversão é muito baixa e pequenas gotículas, com alta área de superfície específica, podem ser geradas a partir de baixa energia (GUPTA *et al.*, 2016).

#### **2.7.4. Métodos de caracterização de nanoemulsões**

Técnicas macro e microscópicas são utilizadas para caracterizar nanoemulsões quanto aos seus aspectos físicos, químicos e morfológicos. Essas técnicas fornecem informações qualitativas e quantitativas, como o tamanho das gotículas, morfologia, carga da superfície, coalescência, cremação e informações de modificação conforme o tempo de armazenamento (SILVA *et al.*, 2012).

Microscopia eletrônica e técnicas que envolvam o espalhamento de luz são indicadas para avaliar o tamanho e a distribuição das gotículas na dispersão. O método de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* – DLS) mede o movimento Browniano (movimento aleatório) das gotículas, fornecendo a medida do raio ou do diâmetro hidrodinâmico em nanômetros (nm) e o índice de polidispersão (PDI). As medidas são aferidas em espectrofotômetro de espalhamento de luz dinâmica, através de um laser de hélio ou neon com comprimento de onda de 632 nm, a 25 °C (SILVA *et al.*, 2012).

A mobilidade eletroforética avalia o potencial zeta pela diferença de potencial entre a fase de dispersão e a fase estacionária do fluido ligado à partícula dispersa, com unidade de medida em milivolts. Para isso, é aplicado um campo elétrico à dispersão e as partículas carregadas positiva ou negativamente migram para o eletrodo de carga oposta a uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta. Essa velocidade é expressa em mobilidade eletroforética (KASZUBA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).

Aferição do pH de uma nanoemulsão é um dos testes de caracterização de estabilidade utilizados, por ser uma variável importante em determinar a presença de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise de ácidos graxos dos tensoativos e dos triglicerídeos da formulação; e por apresentar relação com o crescimento de microrganismos e com o potencial zeta, a partir do ponto isoelétrico (BRUXEL *et al.*, 2012).

Submeter as nanoemulsões a diferentes velocidades de centrifugação é outro teste de caracterização e estabilidade que permite verificar a susceptibilidade da amostra à coalescência ou cremeação (SOLANS *et al.*, 2005; MISHRA *et al.*, 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar extratos de folhas, polpas e sementes de *Passiflora alata* e *P. setacea* nativas do Cerrado quanto à sua composição química e propriedades biológicas, para formulação de nanoemulsões.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os compostos fenólicos de polpas, folhas e sementes de *P. setacea* e *P. alata*.
- Analisar as aminas bioativas e os aminoácidos livres de polpas, folhas e sementes de *P. setacea* e *P. alata*.
- Formular nanoemulsões de extratos de *P. setacea* e *P. alata*.
- Caracterizar as nanoemulsões quanto às suas propriedades físicas, químicas e estabilidade.
- Determinar a atividade antimicrobiana, contra o crescimento de bactérias patogênicas, de extratos e de nanoemulsões de *P. setacea* e *P. alata*.
- Determinar a atividade antioxidante de extratos e de nanoemulsões de *P. setacea* e *P. alata*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. EXPERIMENTO 1: OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS, POLPAS E SEMENTES DE *Passiflora alata* e *P. setacea*

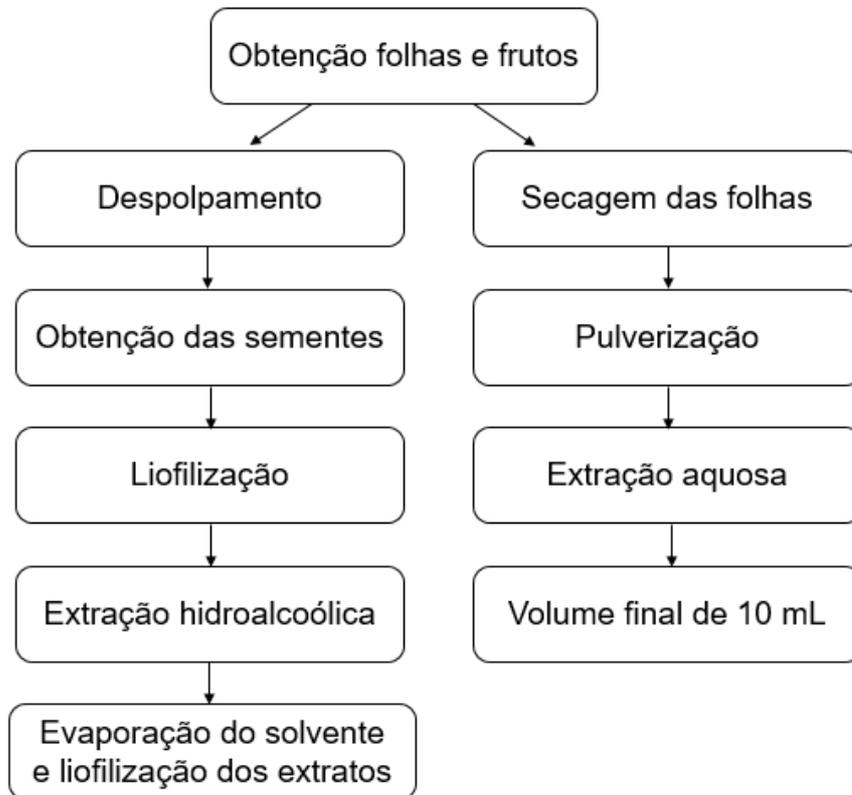
#### 4.1.1. Obtenção da matéria prima e preparo dos extratos

Frutos maduros e folhas de *P. alata* e *P. setacea*, nativas do Cerrado, foram colhidos na área experimental da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, Brasil. A obtenção das polpas e sementes foi realizada no Laboratório de Alimentos da Embrapa Cerrados. As cascas foram removidas das polpas, com o auxílio de facas e colheres, para que as polpas fossem obtidas por meio de despoldadeira (DES 60, linha nobre, MB Braesi). O subproduto do despoldamento foi considerado como sendo as amostras de sementes (Figura 8). As amostras foram congeladas a -80°C, para posterior liofilização em liofilizador Gamma 2-16 LSC plus (Christ, Alemanha). As condições de liofilização foram: 20 minutos de aquecimento da bomba, temperatura da prateleira de 20°C, pressão da secagem primária de 0,0721 mbar e pressão da secagem secundária de 0,001 mbar.

Extratos brutos de polpas e sementes foram obtidos pesando-se 1 g de amostra liofilizada, que foi homogeneizada com 10 mL de etanol 70%, incubados em banho-maria a 80°C por 30 minutos, seguida de centrifugação a 1.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado. O mesmo procedimento foi repetido, usando-se acetona 70%. Os solventes orgânicos foram evaporados a vácuo e, depois, os extratos foram liofilizados e armazenados a -80°C para realização dos ensaios posteriores (SANTANA, 2015) (Figura 8). As amostras de polpas e sementes, assim como os seus extratos liofilizados, foram submetidas à análise de umidade (AOAC, 2005).

Após coletadas, as folhas foram pré-lavadas em água corrente, para a eliminação do excesso de terra e sujeira e, em seguida, armazenadas em sacos de papel para secagem em estufa de circulação de ar forçada a 50°C por 5 dias, com posterior pulverização em moedor de café (Cadence, Santa Catarina, Brasil). Os extratos brutos das folhas foram preparados como uma infusão, a partir da pesagem de 150 mg de folhas secas com adição de 10 mL de água em ebulição. Após 10

minutos, os extratos foram filtrados em papel filtro Whatman nº 6 e o volume foi completado para 10 mL em balão volumétrico (PINELI *et al.*, 2014) (Figura 8).



**Figura 8.** Processos de obtenção das matérias primas e dos extratos das polpas, folhas e sementes das passifloras silvestres

#### 4.1.2. Fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados pelo método de *Folin-Ciocalteu*, a partir da capacidade dos compostos fenólicos em reduzir a mistura dos ácidos fosfotungstístico e fosfomolibdico, componentes do reagente *Folin-Ciocalteu*, em óxidos de tungstênio e de molibdênio, de cor azul, com absorvância máxima de 765 nm (SINGLETON e ROSSI, 1965). Para realizar a reação, utilizou-se a proporção 5:4:1 (v:v:v) dos reagentes *Folin-Ciocalteu* 10% (v/v), carbonato de sódio 7,5% diluídos em água, e de extrato devidamente diluído, respectivamente. Após incubação por 2 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro de microplacas Spectramax M2 (Molecular devices, Califórnia, USA). A concentração de fenólicos totais no extrato foi obtida através da substituição das absorvâncias das amostras na equação da reta ( $y=11,49x + 0,0205$ ;  $R^2=0,9989$ )

gerada a partir da curva padrão de ácido gálico em concentrações que variaram de 5 mg/L a 80 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente/100 g de matéria fresca (mg AGE/100 g MF) para polpas e sementes ou em mg AGE/L para folhas.

#### 4.1.3. Taninos

A dosagem de proantocianidinas foi realizada a partir do método colorimétrico DMAC (4-dimetilaminocinamaldeído), com metodologia proposta por PRIOR *et al.* (2010). As determinações analíticas foram realizadas em microplacas de poliestireno de 96 poços (Kasvi, Parana, Brasil). A cada poço, foram adicionados 210 µL do reagente DMAC 0,1% (preparado em etanol:água:HCl, na proporção de 6:1:1) e 70 µL de amostra devidamente diluída. Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas Spectramax M2 (Molecular devices, California, EUA) com comprimento de onda de 640 nm. Os resultados foram calculados a partir da interpolação das absorbâncias das amostras com a curva padrão ( $y = 16,438x + 0,03$ ;  $R^2 = 0,9982$ ) de procianidina B2, com concentrações que variaram de 0,01 a 0,08 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg de procianidina B2 equivalente/100 g de matéria fresca (mg PB2E/100 g MF) para polpas e sementes ou mg PB2E/L para folhas.

#### 4.1.4. Atividade antioxidante

##### 4.1.4.1. Ensaio DPPH (2,2- diphenil-1-picril-hidrazila) *in vitro*

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* por DPPH foi realizada a partir da reação entre uma alíquota de 0,1 mL de amostra e outra de 3,9 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mM) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Após 60 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 517 nm, tendo metanol como branco e o controle obtido a partir da absorbância inicial da solução de DPPH 0,06 mM, que deveria estar em  $0,7 \pm 0,005$ . Para obtenção dos resultados, foi construída uma curva padrão de trolox, com concentrações que variaram de 50 a 250 mg/mL. Com as absorbâncias dessas concentrações do padrão e daquelas geradas nas leituras das amostras, bem como do controle de DPPH, foi possível obter os percentuais de inibição do DPPH, por meio da equação:

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{(\text{absorbância controle DPPH} - \text{absorbância amostra})}{\text{absorbância controle DPPH}} \times 100$$

Os valores do % de inibição das concentrações do padrão permitiram gerar uma equação da reta ( $y = 0,0865x + 1,9355$ ;  $R^2 = 0,9971$ ), a partir da qual foi possível calcular a concentração de trolox equivalente à atividade antioxidante das amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de trolox equivalente/100 gramas de matéria fresca ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ MF}$ ) para polpas e sementes ou em  $\mu\text{mol TE}/\text{L}$  para folhas.

#### 4.1.4.2. Ensaio da capacidade de redução do $\text{Fe}^{3+}$ (FRAP) *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* pelo ensaio FRAP dos extratos de polpas, folhas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* foi realizada com método descrito por PULIDO *et al.* (2000). Para o preparo do reagente FRAP, foram utilizadas soluções de tampão acetato 0,3 M, TPTZ (2,4,6-tris [2-piridil]-s-triazina) 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, nas proporções de 10:1:1 (v:v:v), respectivamente. A reação para verificar a atividade antioxidante das amostras ocorreu pela mistura de 2,7 mL de reagente frap com 90  $\mu\text{L}$  de extrato e 270  $\mu\text{L}$  de água destilada, incubados por 30 minutos em banho-maria a 37 °C. Como branco foi utilizada a solução FRAP e a absorbância foi medida a 595 nm. O trolox foi o padrão escolhido para fazer a curva de calibração com concentrações que variaram de 100 a 800  $\mu\text{mol}/\text{L}$  ( $y = 0,0012x - 0,001$ ;  $R^2 = 0,9969$ ). Os cálculos foram feitos pela interpolação das absorbâncias das amostras com a curva padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de trolox equivalentes/100 gramas de matéria fresca ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ MF}$ ) para polpas e sementes ou em  $\mu\text{mol TE}/\text{L}$  para folhas.

#### 4.1.5. Perfil de fenólicos

O perfil de fenólicos foi realizado de acordo com metodologia proposta por (LOPES NETO *et al.*, 2017). Os extratos de polpas, folhas e sementes foram analisados por espectrometria de massas para tentativa de elucidação das suas estruturas fenólicas. A análise cromatográfica foi realizada através de um Cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Acquity UPLC, Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QtoF, Waters), pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna

Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), em temperatura fixa de 40°C. Foram utilizadas como fases móveis: (A) água com 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico em gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), em fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL.

#### 4.1.5.1. Condições do massas de alta resolução

O modo *electrospray ionization mass spectrometry* (ESI<sup>-</sup>) foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, com temperatura da fonte fixada a 120°C, temperatura de dessolvatação de 350°C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V e voltagem capilar de 2,6 kV. Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo de aquisição foi o MS<sup>E</sup>. O instrumento foi controlado pelo *software* Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

#### 4.1.6. Aminas bioativas e aminoácidos livres

Todos os extratos obtidos foram analisados segundo metodologia descrita por FIECHTER *et al.* (2013), para determinação de aminas bioativas e aminoácidos livres. As aminas e os aminoácidos dos extratos foram derivados (derivação pré-coluna) por reação com 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), utilizando o kit Waters AccQ.Fluor<sup>®</sup> (Waters, 1993), sendo 5 µL de extrato neutralizado, adicionados de 35 µL de tampão borato AccQ.Fluor<sup>®</sup> e 10 µL de reagente AQC, após 1 minuto de descanso, aquecido a 55°C por 10 minutos em banho-maria para completar a reação de derivação. As amostras derivadas foram filtradas em filtros de seringa com 0,20 µm de poro (Whatman<sup>®</sup>, GE Healthcare, Reino Unido) e então analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência.

A análise cromatográfica das aminas e aminoácidos derivados foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra eficiência modelo Waters Acquity<sup>®</sup> Ultra Performance LC (UPLC<sup>®</sup>) (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector Acquity<sup>®</sup> tunable ultraviolet (TUV) (Waters, Milford, MA, EUA). Utilizou-se coluna de fase reversa Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) para separação. Foram duas soluções de fase móvel empregadas na separação conforme gradiente demonstrado na Tabela 1: A) tampão acetato de sódio 0,1 mol/L em água ultrapura com pH ajustado para 4,8 com ácido acético e B) acetonitrila de grau cromatográfico, ambos filtrados à vácuo em membrana com poro de 0,22µm (GV Durapore Merck<sup>®</sup>) e sonicados por 30 minutos. O volume de injeção de amostra na coluna foi 2 µL, o fluxo de 1 mL/min e o

comprimento de onda de detecção UV foi 249 nm a uma taxa de amostragem de 40 pontos/s. O software Waters Empower 2 foi utilizado para controle do UPLC e aquisição dos dados.

**Tabela 1.** Gradiente de concentração das soluções de fases móveis empregadas na separação das aminas bioativas e aminoácidos livres nos extratos de passifloras

Tempo	% A (tampão acetato pH 4,8)	% B (acetonitrila)
inicial	100	0
2,5 min	100	0
4 min	97	3
9 min	70	30
9,5 min	0	100
10 min	0	100
10,5 min	100	0

Reequilíbrio às condições iniciais por mais 1,5 minuto.

Tempo total corrida: 12 minutos.

A identificação das aminas e aminoácidos foi feita por comparação do tempo de retenção dos picos dos analitos na amostra em relação aos da solução padrão e também pela adição de solução da substância suspeita à amostra. O cálculo da concentração das aminas e aminoácidos livres foi feito por interpolação nas respectivas curvas analíticas. Os resultados foram expressos em mg/100 g de matéria fresca para polpas e sementes ou em mg/L para folhas.

#### 4.1.7. Atividade antimicrobiana

A triagem antimicrobiana dos extratos de polpas, folhas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* foi realizada de acordo com o protocolo NCCLS traduzido pela ANVISA (2003), com modificações descritas nos itens a seguir.

##### 4.1.7.1. Cepas bacterianas

Os microrganismos *Escherichia coli* (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) foram escolhidos para o ensaio de atividade antimicrobiana devido à sua patogenicidade e importância para as toxinfecções alimentares. Ambas as cepas eram ATCC® 25922™, ATCC® 25923™, respectivamente. Mesmo assim, elas foram submetidas a testes bioquímicos para confirmação do seu fenótipo. O *S. aureus* foi inoculado em ágar Manitol e a *E. coli* em ágar MacConkey, para crescimento e isolamento das colônias. As colônias isoladas foram inoculadas em meio de

enriquecimento (*brain heart infusion* - caldo BHI), com subsequente inoculação em caldo Müller Hinton (MH) com glicerol 20%, para evitar o rompimento das membranas celulares das células microbianas, com o congelamento e armazenamento a -20 °C.

As curvas de crescimento de cada inóculo foram realizadas a 37°C, com leituras da densidade óptica (DO) a 630 nm a cada 30 minutos e adição da cultura em ágar Triptona de Soja (TSA) para contagem das colônias em placa a cada tempo, após 24 horas de incubação. Após determinação das curvas de crescimento das bactérias, deu-se prosseguimento ao ensaio da concentração inibitória mínima (CIM).

#### 4.1.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da CIM dos extratos foi realizada com as culturas de *E. coli* e *S. aureus*, que foram reativadas em caldo MH, onde ficaram por 12 horas, com posterior reinoculação também em caldo MH, para obtenção de uma DO ajustada para 0,08 a 0,1, após 8 a 10 horas de incubação, em média. Uma DO nessa faixa de leitura a 630 nm indica que o inóculo se encontra na sua melhor fase de desenvolvimento (fase log), representado pela concentração de, aproximadamente,  $10^8$  unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). Após ajuste da DO, as culturas foram diluídas em caldo de MH para se obter uma concentração de microorganismos de  $10^7$  UFC/mL, de modo que a concentração final de cada inóculo nos poços de reação fosse  $10^3$  UFC/mL. As análises da CIM foram realizadas em microplacas estéreis de poliestireno com 96 poços (Kasvi, Paraná, Brasil). Foram avaliadas suspensões aquosas dos extratos em caldo MH, que variaram de 500 a 8.000 µg/mL. Os extratos foram ressuspensos em caldo MH, então, como controle positivo, foi utilizado o próprio caldo MH. Os controles negativos foram antimicrobianos sintéticos já conhecidos por inibir o crescimento das bactérias estudadas: ampicilina para os ensaios com *E. coli* e cloranfenicol para os ensaios com *S. aureus*.

Os ensaios foram realizados com leituras cinéticas a cada 20 minutos, a 37°C, em espectrofotômetro Spectramax M2 (Molecular devices, California, USA) com comprimento de onda de 630 nm, nas primeiras 12 horas de experimento. Uma última leitura foi realizada com 24 horas de incubação para completar o tempo do experimento. Os poços que apresentaram diferenças  $\leq 0,05$  nas DOs lidas entre os tempos 0 e 24 horas foram selecionados para realização dos ensaios de atividade antibactericida. A CIM foi declarada como sendo a menor concentração da amostra

capaz de inibir o crescimento do microrganismo, em todas as replicatas, após 24 horas de incubação.

#### 4.1.7.3. Determinação da concentração bactericida mínima

Os poços contendo as amostras classificadas com inibição dos microrganismos procederam ao ensaio de atividade antibactericida. Os conteúdos dos devidos poços foram transferidos para eppendorfes de 2 mL para lavagem com o dobro de caldo MH, a fim de eliminar os extratos que inibiram o crescimento dos inóculos. A mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e repetição da lavagem do *pellet* segundo o mesmo procedimento. Após garantida a eliminação do extrato, o *pellet* foi reinoculado em 250 µL de caldo MH por 24 horas, para verificar se o extrato foi capaz de matar o microrganismo ou apenas de inibi-lo, quando na sua presença. Caso a DO dos poços não se alterasse durante esse período, a concentração de extrato avaliado foi considerada bactericida. A concentração bactericida mínima (CBM) foi declarada como sendo a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento do microrganismo após retirada do extrato.

#### 4.1.8. Delineamento experimental e análise estatística

O estudo do experimento 1 foi inteiramente casualizado, totalizando seis tratamentos, provenientes do esquema fatorial 2 x 3, no qual analisaram-se duas espécies de passifloras (*P. alata* e *P. setacea*) e três partes da planta (folhas, polpas e sementes). Os resultados foram analisados em triplicatas, com três repetições cada e foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova), seguida do teste de comparação de médias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), com o auxílio do software XLSTAT (ADDINSOFT, Paris, France).

### 4.2. EXPERIMENTO 2: FORMULAÇÃO, ESTABILIDADE E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTIMICROBIANAS DE NANOEMULSÕES DE EXTRATOS DE POLPAS E SEMENTES DE *Passiflora alata* e *P. setacea*

#### 4.2.1. Formulação das nanoemulsões

As amostras de polpas, folhas ou sementes de *P. alata* e *P. setacea* que apresentaram melhores desempenhos quanto às suas atividades antimicrobianas e

antioxidantes, avaliadas no experimento 1, prosseguiram para o experimento 2. Portanto, foram utilizados para a formulação das nanoemulsões, extratos liofilizados de polpas e sementes de *P. alata* e de *P. setacea* nativas do Cerrado.

Na Tabela 2 estão descritos todos os materiais da fase dispersa, escolhidos para a formulação das nanoemulsões, cuja fase dispersante foi água Milli-Q.

**Tabela 2.** Descrição dos materiais da fase dispersa e proporções, utilizados para a formulação das nanoemulsões

Material	Marca	Função	EHL <sup>1</sup>	Proporção
Castor oil (óleo de rícino)	Sigma-aldrich	Fase oleosa	14 - hidrofílico	1
Óleo de girassol	Liza	Fase oleosa	6,5 - hidrofóbico	1
Solutol® HS15	Sigma-aldrich	Tensoativo	15 - hidrofílico	6

<sup>1</sup>Equilíbrio hidrofílico-lipofílico.

As nanoemulsões de polpa de *P. alata* (NEPA), polpa de *P. setacea* (NEPS), semente de *P. alata* (NESA) e semente de *P. setacea* (NESS) foram preparadas a partir do método de emulsificação de baixa energia, com inversão de fase por temperatura (PIT) (SHINODA e SAITO, 1969). As NESA e NESS foram obtidas na concentração de 4 mg de extrato/mL em relação ao volume de água utilizado. A concentração das NEPA e NEPS foi de 8 mg de extrato/mL. A proporção da fase dispersa foi de 6:1:1, sendo Solutol® HS15, castor oil (óleo de rícino) e óleo de girassol, respectivamente.

A formulação das nanoemulsões foi composta pelas seguintes etapas:

- **Etapas 1:** o extrato liofilizado, pesado com a fase dispersa em erlenmeyer, foi levado a banho ultrassônico a 45°C por 15 min, seguido de agitação a 300 rpm por 5 minutos a 50°C.
- **Etapas 2:** sob agitação, adicionaram-se 12 mL de água Milli-Q a 50°C e aguardou-se o sistema atingir 70°C, ponto em que se iniciou a inversão de fases, adicionando-se mais 8 mL de água Milli-Q em seguida.
- **Etapas 3:** resfriamento imediato do sistema em barra de gelo, sob agitação, até 40°C, com subsequente banho ultrassônico por 15 minutos a 40°C e finalização em agitação a 300 rpm por mais 30 minutos.

As nanoemulsões foram filtradas em membrana PES de poro 0,22 µm, com filtro de seringa, para obtenção da esterilidade do sistema. O armazenamento também

foi feito em frascos estéreis para utilização nos testes de caracterização, estabilidade, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

#### **4.2.2. Caracterização e estabilidade das nanoemulsões**

##### 4.2.2.1. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o índice de polidispersão (PDI) das nanoemulsões foram analisados por espalhamento de luz dinâmico (DLS); e o potencial zeta (PZ), por mobilidade eletroforética (LIANG *et al.*, 2012), no equipamento Zetasizer Nano Series ZEN3690 (Malvern Instruments®, Reino Unido). As análises foram realizadas com as nanoemulsões diluídas 20 vezes em água Milli-Q, a 25°C, tempo de equilíbrio de 60 segundos, em cubetas de poliestireno com ângulo de detecção de 90 graus. Os resultados de DH foram apresentados em nanômetros (nm) e os do PZ em milivolts (mV). As medidas foram realizadas ao longo de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias a partir do dia de preparo das nanoemulsões, com as amostras estocadas a 4 e a 25°C, para o estudo de estabilidade.

##### 4.2.2.2. Potencial hidrogeniônico

A partir das nanoemulsões diluídas 10 vezes, foi aferido o potencial hidrogeniônico (pH) em pHmetro de bancada microprocessado NTPHM (Nova Tecnica, Brasil), precisão  $\pm 0,01$ , sensibilidade 99% (ĐORĐEVIĆ *et al.*). Inicialmente, foi realizada a calibração do aparelho com soluções padrão pH 4,0 e pH 7,0. As leituras foram realizadas em triplicata a 25°C. As aferições foram feitas ao longo de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias a partir do dia de preparo das nanoemulsões, para o estudo de estabilidade.

##### 4.2.2.3. Fenólicos totais

A dosagem de fenólicos totais das nanoemulsões foi realizada segundo o mesmo protocolo descrito no item 4.1.2 do experimento 1. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$ .

##### 4.2.2.4. Estabilidade à força centrífuga

O teste de estabilidade à força centrífuga foi operado nas velocidades de rotação de 1.000, 2.500, 3.500 e 7.000 rpm. O processo para cada velocidade durou 15 minutos, na temperatura de 25°C. Os testes ocorreram na ultra centrífuga modelo

Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Alemanha. Cada nanoemulsão foi distribuída em três eppendorfes de 2 mL, que foram alocados na centrífuga e avaliados quanto à separação ou não de fases e cremação (SANTOS, 2015). Esse procedimento foi realizado durante 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias para o estudo de estabilidade.

#### 4.2.2.5. Estresse térmico

A análise de estabilidade acelerada das nanoemulsões, ocorreu por meio do teste de estresse térmico, realizado em cinco ciclos, cada um deles composto pelo resfriamento da amostra a 4°C por 24 horas e subsequente aquecimento da mesma amostra a 37°C por 24 horas também. Para o resfriamento, utilizou-se geladeira modelo RFCT 451, *frost free*, BSH Continental©, Brasil e para o aquecimento, as amostras foram alocadas em estufa DL-SE (De Leo Equipamentos, Brasil). Após o término de cada ciclo, foi realizada a leitura do DH, PDI e PZ de cada na nanoemulsão (BALI *et al.*, 2010).

#### 4.2.3. Atividade antioxidante *in vitro*: capacidade do sequestro de radicais DPPH•

O método de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi escolhido para os ensaios de comparação da capacidade antioxidante das nanoemulsões com os seus extratos livres, em razão da alta sensibilidade e seletividade que essa técnica apresenta em detectar sinais de radicais DPPH•. Para tanto, foi utilizado protocolo desenvolvido no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica, do Instituto de Física, Universidade de Brasília.

Inicialmente, foram preparadas cinco diluições das amostras (nanoemulsões e seus extratos livres) de polpas (D1: 250, D2: 500, D3: 1.000, D4: 2.000 e D5: 4.000 µg/mL, em que D = diluição) e cinco diluições das amostras de sementes (D1: 37,5, D2: 75, D3: 150, D4: 300 e D5: 600 µg/mL), a fim de verificar em qual delas era melhor visualizar diferenças entre a capacidade antioxidante das nanoemulsões e dos seus extratos livres correspondentes. A reação entre as amostras e o DPPH• foi organizada de modo que a concentração final do DPPH fosse 125 µM em todas as diluições avaliadas. Após 60 minutos de incubação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, 50 µL das reações foram inseridos em capilares de vidro, selados com critoseal e congelados em nitrogênio líquido, permanecendo nesta condição até o momento da medição. As medições EPR foram realizadas com um espectrômetro Bruker EMX plus

EPR, com banda X, usando um ressonador de alta sensibilidade 4119HS, sob modulação de 10 G para melhorar a relação sinal/ruído, largura de varredura de 100 G e potência de microondas de 20 mW. Foram realizadas 10 varreduras de 10 segundos cada, com as amostras sob temperatura controlada de 25°C. A amplitude EPR usada foi a integral dupla do sinal detectado. Os resultados foram expressos em % de inibição de DPPH•, calculados a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{(\text{integral dupla controle DPPH} - \text{integral dupla amostra})}{\text{integral dupla controle DPPH}} \times 100$$

#### **4.2.4. Atividade antimicrobiana**

O ensaio de atividade antimicrobiana das nanoemulsões seguiu a mesma metodologia do item 4.1.7 do experimento 1. Nesta etapa, as concentrações avaliadas das nanoemulsões variaram de 125 a 2.000 µg/mL para NESA e NESS e de 250 a 4.000 µg/mL para NEPA e NEPS.

#### **4.2.5. Delineamento experimental e análise estatística**

O estudo foi inteiramente casualizado, proveniente do esquema fatorial 2 x 2 x 2 x 6, arranjados em duas partes da planta (polpas e sementes), duas espécies (*P. alata* e *P. setacea*), duas temperaturas de armazenamento (4 e 25°C) e 6 tempos de armazenamento (1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos à Análise de variância (Anova), seguida do Teste de comparação de médias de Tukey (p<0,05), com o auxílio do programa estatístico Assistat 7.7 (Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil).

## Referências

ABBASI, E.; NASSIRI-ASL, M.; SHAFEEI, M.; SHEIKHI, M. Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid, on pentylentetrazole-induced seizure in rats. **Chem Biol Drug Des**, v. 80, n. 2, p. 274-8, Aug 2012. ISSN 1747-0285 (Electronic) 1747-0277 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554436>>.

ABDALLA, A.; KLEIN, S.; MÄDER, K. A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: Characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 5, p. 457-464, 2008/12/18/ 2008. ISSN 0928-0987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098708003990> >.

ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 60, p. 12-22, 2017/02/01/ 2017. ISSN 0924-2244. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416301765> >.

ALBERGARIA DE QUEIROZ, F. Impactos da sojicultura de exportação sobre a biodiversidade do Cerrado. **Sociedade & Natureza**, v. 21, n. 2, 2009. ISSN 0103-1570.

ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011. ISSN 0963-9969.

ALVES, A. M.; DIAS, T.; HASSIMOTTO, N. M. B.; NAVES, M. M. V. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. **Food Science and Technology (Campinas)**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017. ISSN 0101-2061.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 978-985, May 01 2011. ISSN 1573-904X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1> >.

ANVISA. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. Norma M7-A6**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2003.

\_\_\_\_\_. Interpretação de dados microbiológicos. III Métodos para o TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos. 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/metodos2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.htm) >. Acesso em: 30/09/2016.

AOAC. 18. Gaithersburg: AOAC International, 2005.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; OZYÜREK, M.; CELIK, S. E.; BEKTAŞOĞLU, B., BERKER, K.I.; OZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496-1547, 2007.

APPEL, K. ROSE, T.; FIEBICH, B.; KAMMLER, T.; HOFFMANN, C.; WEISS, G. MODULATION of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy research**, v. 25, n. 6, p. 838-843, 2011. ISSN 1099-1573.

ARGENTIERI, M. P.; LEVI, M.; GUZZO, F.; AVATO, P. Phytochemical analysis of *Passiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolin-derived flavonoids with antioxidant properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 11, p. 1603-1612, 2015. ISSN 2042-7158. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12454> >.

ARMSWORTH, P. R.; CANTÚ-SALAZAR, L.; PARNELL, M.; DAVIES, Z. G.; STONEMAN, R. Management costs for small protected areas and economies of scale in habitat conservation. **Biological Conservation**, v. 144, n. 1, p. 423-429, 2011. ISSN 0006-3207.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 410-420, 2010/04/01/ 2010. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776509006031> >.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 2010. ISSN 1415-5273.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 10, p. 341-346, 1995. ISSN 0924-2244.

BELLON, G. et al. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 124-127, 2007. ISSN 0100-2945. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452007000100027&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452007000100027&nrm=iso) >.

BERNACCI, L. C. et al. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, p. 558-586, 2005.

BOMTEMPO, L. L. et al. Bioactive amines in *Passiflora* are affected by species and fruit development. **Food Research International**, v. 89, p. 733-738, 2016/11/01/ 2016. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916304197> >.

BORGHI, S. M. et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1141-9, Jun 28 2013. ISSN 1520-6025 (Electronic) 0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23742617> >.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. ISSN 0023-6438.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, p. 1827-1840, 2012. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422012000900023&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900023&nrm=iso) >.

CANDIDO, T. L.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chem**, v. 177, p. 313-9, Jun 15 2015. ISSN 0308-8146 (Print) 0308-8146 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660891> >.

CARVAJAL, L. et al. Functional and nutritional properties of six species of *Passiflora* (Passifloraceae) from the department of Huila, Colombia. **Caldasia**, v. 36, n. 1, p. 1-15, 2014. ISSN 0366-5232.

CAZARIN, C. B. B. et al. Intake of *Passiflora edulis* leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 575-586, 2015. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615002728> >.

CERVI, A. C. A., M.A.M.D., BERNACCI, L.C. Passifloraceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Rio de Janeiro, 2010.

COLOMEU, T. C. et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 106-115, 2014/01/01/ 2014. ISSN 1567-5769. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156757691300413X> >.

CORREDIG, M. Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 146, 2013/10/01/ 2013. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224413001581> >.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais—estado da arte. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, p. 475-508, 2005.

COVARRUBIAS, L. et al. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? **Developmental biology**, v. 320, n. 1, p. 1-11, 2008. ISSN 0012-1606.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 0470994134.

CUSHEN, M. et al. Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 1, p. 30-46, 2012/03/01/ 2012. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411002378> >.

DA CUNHA, M. S. B. **Efeito do Consumo de Tucum-do-cerrado (Bactris setosa Mart) em Marcadores de Envelhecimento em Ratos Adultos Suplementados com Ferro**. 2017. 116 (Doutorado). Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília.

DA SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: *in vitro* and *in vivo* study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882-890, 2013/10/01/ 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913000033> >.

DA SILVA SILVEIRA, L. M. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, p. 2, 2009.

DA SILVEIRA AGOSTINI-COSTA, T. et al. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1075-1080, 2004. ISSN 1678-4596.

DASH, R. N. et al. Design, optimization and evaluation of glipizide solid self-nanoemulsifying drug delivery for enhanced solubility and dissolution. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 5, p. 528-540, 2015/10/01/ 2015. ISSN 1319-0164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016415000377> >.

DIAS, T. C. A. C.; DA CUNHA, A. C.; DA SILVA, J. M. C. Return on investment of the ecological infrastructure in a new forest frontier in Brazilian Amazonia. **Biological Conservation**, v. 194, p. 184-193, 2016. ISSN 0006-3207.

DE FARIA, F. M. Perfil e teores de amins bioativas em frutas brasileiras. 2011.

COHEN, K., O. et al. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSTOS FUNCIONAIS DA POLPA DA PASSIFLORA ALATA. 2008.

DE OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. 2005.

DENG, J. et al. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 148-153, 2010. ISSN 0378-8741.

DO CARMO BRITO, B. N. et al. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chem**, v. 228, p. 484-490, Aug 01 2017. ISSN 0308-8146 (Print)

0308-8146 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28317753>>.

DOYAMA, J. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005. ISSN 0378-8741.

DORĐEVIĆ, S. M. et al. Experimental Design in Formulation of Diazepam Nanoemulsions: Physicochemical and Pharmacokinetic Performances. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 11, p. 4159-4172, ISSN 0022-3549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jps.23734> >. Acesso em: 2017/08/10.

ESTRELA, C. R. A. E., C. ; REIS, C. ; BAMMANN, L. L. ; PECORA, JESUS DJALMA . . Control of Microorganisms in Vitro by Different Irrigant Solutions. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n. 2, p. 6, 2003.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. **Embrapa Cerrados-Livros científicos (ALICE)**, 2005.

FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético de maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisas 2005-2008**. Planaltina, DF, Brazil: Embrapa Cerrados, 2008. 57.

FERNANDES, T. et al. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 184-193, 2015. ISSN 2214-7500.

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100-108, 2013. ISSN 0378-8741.

FIECHTER, G.; SIVEC, G.; MAYER, H. K. Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 927, p. 191-200, May 15 2013. ISSN 1873-376X (Electronic) 1570-0232 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294548> >.

FIGUEIREDO, D. et al. Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic). **International immunopharmacology**, v. 35, p. 127-136, 2016. ISSN 1567-5769.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 2. ed. Artmed: Artmed, 2013.

FRANZON, R. C. Fruteiras nativas do Cerrado têm potencial para exploração. **Embrapa Cerrados-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2009.

GADIOLI, I. L. et al. A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-23, 2016. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805> >.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813-8826, 2010.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2011.

GLORIA, M. B. A. Bioactive amines. In: HUI, H., NOLLET, L. L. (Ed.). **Handbook of food science, technology and engineering**. 3: Taylor & Francis v.1, 2005. p.1-38.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. et al. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, 2007. ISSN 1750-3841.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 438-446, 2016/01/01/ 2016. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15300278> >.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

GUPTA, R. K. et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer. **Asian Pacific Cancer Prevention**, v. 15, p. 4405-4409, 2014.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, p. 117-122, 3/15/ 2015. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614013119> >.

HILL, L. E.; GOMES, C. L. Optimization of synthesis process of thermally-responsive poly-n-isopropylacrylamide nanoparticles for controlled release of antimicrobial

hydrophobic compounds. **Materials Research Express**, v. 1, n. 4, p. 045404, 2014. ISSN 2053-1591.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005. ISSN 0021-8561.

HUANG, Y. et al. Nanosilver Migrated into Food-Simulating Solutions from Commercially Available Food Fresh Containers. **Packaging Technology and Science**, v. 24, n. 5, p. 291-297, 2011. ISSN 1099-1522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pts.938> >.

IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística, p.56. 2013

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011. ISSN 0308-8146.

IRWANSYAH, I. et al. Gram-positive antimicrobial activity of amino acid-based hydrogels. **Adv Mater**, v. 27, n. 4, p. 648-54, Jan 27 2015. ISSN 1521-4095 (Electronic) 0935-9648 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447243> >.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 799, n. 1, p. 101-110, 1998. ISSN 0021-9673.

KALAC, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005-mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27-39, Oct 15 2014. ISSN 0308-8146 (Print) 0308-8146 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837918> >.

KAMIMURA, J. A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 701-709, 2014. ISSN 0023-6438.

KASZUBA, M. et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1927, p. 4439-4451, 2010.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods.

**Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331-352, 2016. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12189> >.

KOSTOPOULOU, O. N. et al. Conjugation with polyamines enhances the antibacterial and anticancer activity of chloramphenicol. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 13, p. 8621-34, Jul 2014. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939899> >.

KRZYSTEK, J. et al. DPPH as a Standard for High-Field EPR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 125, n. 1, p. 207-211, 1997/03/01/ 1997. ISSN 1090-7807. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090780796910988> >.

LARQUE, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 87-95, Jan 2007. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113752> >.

LESSA, A. O. **Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo do potencial para processamento da polpa de frutos de maracujá das espécies silvestres (Passiflora setacea DC, Passiflora cincinnata MAST)**. 2011. 83 Dissertação (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

LI, S. et al. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3, p. 110-116, 2014. ISSN 2213-4530.

LIANG, R. et al. Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7548-7555, 2012/08/01 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf301129k> >.

LIMA, J. C. R. et al. Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa de baru. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2010. ISSN 1983-9774.

LOPES NETO, J. J. et al. Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 999-1007, 2017. ISSN 0753-3322.

LOPEZ-ALARCON, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, Feb 06 2013. ISSN 1873-4324 (Electronic) 0003-2670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340280> >.

LÓPEZ-VARGAS, J. H. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit

(Passiflora edulis var. flavicarpa) co-products. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 756-763, 2013/05/01/ 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913000823> >.

LOU, Z. et al. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from Citrus medica L. var. sarcodactylis and its nanoemulsion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 371-377, 2017/07/01/ 2017. ISSN 0023-6438. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381730138X> >.

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of Anacardium humile St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7153-7166, 2010.

MAYER, S.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 122-130, 2013/07/15/ 2013. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979713003603> >.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012. ISSN 1744-683X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C2SM06903B> >.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011/03/25 2011. ISSN 1040-8398. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.559558> >.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 83-91, 2011. ISSN 0100-2945.

MIN, B. et al. Phenolic compounds from the stem bark of Passiflora foetida and their anti-inflammatory activity. **Planta Medica**, v. 80, n. 10, p. PD48, 2014. ISSN 0032-0943.

MISHRA, R. K.; SONI, G. C.; MISHRA, R. P. A review article: On nanoemulsion. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 3, n. 9, p. 258-274, 2014.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.-P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 184-197, 2005. ISSN 0261-5614.

MORALES, N. P. et al. Electron Paramagnetic Resonance Study of the Free Radical Scavenging Capacity of Curcumin and Its Demethoxy and Hydrogenated Derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 10, p. 1478-1483, 2015.

NAIK, A.; MEDA, V.; LELE, S. S. Application of EPR Spectroscopy and DSC for Oxidative Stability Studies of Nigella sativa and Lepidium sativum Seed Oil. **Journal**

of the **American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 6, p. 935-941, June 01 2014. ISSN 1558-9331. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2430-5> >.

NEGI, B. S.; DAVE, B. P.; AGARWAL, Y. Evaluation of antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea* leaves under in vitro conditions. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 3, p. 360-365, 2012. ISSN 0046-8991.

NORATTO, G. D. et al. Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4104-12, Apr 14 2010. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205391> >.

O'HANLON, C. E. et al. NIR-labeled perfluoropolyether nanoemulsions for drug delivery and imaging. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 137, p. 27-33, 2012/05/01/2012. ISSN 0022-1139. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022113912000498> >.

OLIVEIRA, D. A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55-62, 2016. ISSN 0896-8446.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of colloid and interface science**, v. 388, n. 1, p. 95-102, 2012.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 937-947, 2013/11/01/2013. ISSN 0102-695X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X1370125X> >.

PARRON, L. M. et al. **Cerrado: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Embrapa Cerrados, 2008. ISBN 8570750404.

PINAZO, A. et al. Amino acid-based surfactants: new antimicrobial agents. **Advances in colloid and interface science**, v. 228, p. 17-39, 2016. ISSN 0001-8686.

PINELI, L. L. O. et al. Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild *passiflora* from Brazilian savannah: potential as functional beverages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1500-1506, 2014. ISSN 1097-0010.

PORTER, A. L.; YOUTIE, J. How interdisciplinary is nanotechnology? **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 11, n. 5, p. 1023-1041, 03/06 12/17/received 02/14/accepted 2009. ISSN 1388-0764 1572-896X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2988207/> >.

POUNIS, G. et al. Consumption of healthy foods at different content of antioxidant vitamins and phytochemicals and metabolic risk factors for cardiovascular disease in

men and women of the Moli-sani study. **European journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 2, p. 207, 2013. ISSN 0954-3007.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 3, p. 570S-578S, 2003. ISSN 0002-9165.

PRIOR, R. L. et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1473-1478, 2010. ISSN 1097-0010.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000. ISSN 0021-8561.

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1000-1008, 2011/07/01/ 2011. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X10002328> >.

QUINTÃO, F. J. O. et al. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 101-107, 2013/01/01/ 2013. ISSN 0102-695X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X13700139> >.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1413-1423, 2011/08/01/ 2011. ISSN 0268-005X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11000397> >.

RAUDONIS, R. et al. Phenolic and antioxidant profiles of rowan (*Sorbus L.*) fruits. **Natural product research**, v. 28, n. 16, p. 1231-1240, 2014. ISSN 1478-6419.

RIBEIRO, J. F. et al. Fitofisionomias do bioma Cerrado. **Cerrado: ambiente e flora**, 1998.

RIBEIRO, M. C. S., M.M.S.R. . **Microbiologia prática: roteiro e manual**. São Paulo: Atheneu, 2000.

ROSA, F. R. et al. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 110, 2016.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010. ISSN 0308-8146.

SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; DE BRITO, M. A. Baru: biologia e uso. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2004.

SANTANA, F. C. **Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de Passiflora spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica**. 2015. 180 (PhD). Universidade de São Paulo

SANTANA, F. C. et al. Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian Passiflora seed oils. **Journal of food science**, v. 80, n. 12, p. C2647-C2654, 2015.

SANTIAGO-SILVA, P.; LABANCA, R. A.; GLORIA, M. B. A. Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. **Food research international**, v. 44, n. 5, p. 1264-1268, 2011. ISSN 0963-9969.

SANTOS, D. S. **Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante in vitro de nanoformulações contendo óleo do fruto Orbignya phalerata Martius**. 2015. 132 (Master). Universidade de Brasília

SANTOS, M. Research on urban ants: approaches and gaps. **Insectes sociaux**, v. 63, n. 3, p. 359-371, 2016. ISSN 0020-1812.

SARI, T. P. et al. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 540-546, 2015/01/01/ 2015. ISSN 0268-005X. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X14002549> >.

SHANTHILAL, J.; BHATTACHARYA, S. Nanoparticles and Nanotechnology in Food. In: (Ed.). **Conventional and Advanced Food Processing Technologies**: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p.567-594. ISBN 9781118406281.

SHIN, Y. et al. Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 349-357, 2007. ISSN 0925-5214.

SHINODA, K.; SAITO, H. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 30, n. 2, p. 258-263, 1969.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 854-867, April 01 2012. ISSN 1935-5149. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7> >.

SILVA, L. M. et al. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 165, p. 362-370, 2014/12/15/ 2014. ISSN

0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614008346> >.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965. ISSN 0002-9254.

SIQUEIRA, E. M. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991156> >.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 3, p. 102-110, 2005/10/01/ 2005. ISSN 1359-0294. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029405000348> >.

SOUSA, C. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 303-318, 2004/05/20/ 2004. ISSN 0001-8686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000186860300157X> >.

TANG, S. Y. et al. Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 2, p. 330-345, 2012/03/01/ 2012. ISSN 1350-4177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041771100143X> >.

TAO, F. et al. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 247-255, 2014. ISSN 0023-6438.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 2, p. 107-163, 1998/04/16/ 1998. ISSN 0001-8686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868698000359> >.

TORTORA, G. J. F., B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VETORE NETO, A. **Avaliação da atividade anti-úlceras e segurança de uso de *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae)** 2015. 178 (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo

VETRANI, C. et al. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. 3, p. 312-326, 2013. ISSN 0963-7486.

VIEIRA, G. P. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de Passifloras spp.** 2013. 81 (Master of Science). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

WANG, S. et al. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 14-22, 2011. ISSN 0963-9969.

WASICKY, A. et al. Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 407-412, 2015. ISSN 0102-695X.

WWF. Natureza Brasileira: Questões Ambientais e Biodiversidade. Disponível em: < [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/questoes\\_ambientais/biodiversidade/](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biodiversidade/) >. Acesso em: 28/07/2017.

YANG, S. H. et al. The Novel p53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1154-1161, 2013. ISSN 1099-1573.

YILMAZ, Y. et al. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Seed, Skin and Pulp Parts of 22 Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars (4 Common and 18 Registered or Candidate for Registration). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1682-1691, 2015. ISSN 1745-4549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jfpp.12399> >.

ZORZI, G. K. et al. Antioxidant Effect of Nanoemulsions Containing Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C.—Asteraceae. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 4, p. 844-850, August 01 2016. ISSN 1530-9932. Disponível em: < <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0408-8> >.

## CAPÍTULO 2

Artigo Original 1

### **Composition and biological properties of wild passifloras from Brazilian savanna**

Manuscrito submetido ao periódico *Food Chemistry*

## **Composition and biological properties of wild passifloras from Brazilian savanna**

Gadioli, I.L.<sup>1\*</sup>; Oliveira, L.L.<sup>2</sup>; Machado, G.M.<sup>3</sup>; Glória, M.B.A.<sup>3</sup>; Araújo-Júnior, S.D.<sup>4</sup>; Brito, E.S.<sup>5</sup>; Costa, A.M.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Human Nutrition, Faculty of Health Sciences, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. PO Box 70910- 900.

<sup>3</sup> Department of Food, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Cellular Biology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brazil.

<sup>5</sup> Embrapa Agroindústria Tropical, Brazil.

<sup>6</sup> Laboratory of Food Science, Embrapa Cerrados, Brazil.

**\*Corresponding author:** e-mail: [Izabel.lucena.gadi@gmail.com](mailto:Izabel.lucena.gadi@gmail.com)

## ABSTRACT

The present study aimed at evaluating composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Passiflora alata* and *P. setacea* from the Brazilian savanna. Bioactive compounds extracts were obtained by hydroalcoholic extraction at 80°C for pulps and seeds; and by boiling water for leaves. *P. setacea* seeds presented higher amounts of TPC (4,754.6 mg GAE/100 g FW), tannins (645.3 mg PB2E/100 g FW) and higher antioxidant activity. Fifteen phenolic compounds were tentatively identified, comprising 10 flavonoids and 5 phenolic acids. Amino acids elucidation resulted in 16, of which 9 were essential. Spermine was only quantified in *P. alata* pulp, which also presented the highest amount of spermidine (1.6 mg/100 g FW). MIC of pulps and seeds ranged from 0.5 to 8.0 mg/mL. Bactericidal effects were observed for the seeds against *E. coli* (4.0-8.0 mg/mL). *Passiflora* seeds presented important antioxidant activity; pulps and seeds can be considered antimicrobial agents, mostly effective against Gram-positive bacteria.

**Keywords:** *Passiflora*, phenolic compounds, bioactive amines, amino acids, antioxidant activity, antimicrobial activity, Brazilian savanna.

## 1. Introduction

There is a large number of fruit species from the Brazilian savanna with great potential for economic exploitation, which still remains underutilized. Studies have ranked these fruits in a global list of foods rich in compounds with great capacity to scavenge free radicals and whose high antioxidant activity (Siqueira, Rosa, Fustinoni, de Sant'Ana, & Arruda, 2013) may be influencing the delay of cellular aging processes (Noratto, Bertoldi, Krennek, Talcott, Stringheta, & Mertens-Talcott, 2010) and preventing chronic diseases (Fernandes, de Ávila, de Moura, de Almeida Ribeiro, Naves, & Valadares, 2015).

Passion fruit belongs to *Passiflora* genus of Passifloraceae Family and is the popular name given to several species of this genus. It is estimated that 150 species are from Brazil (Cervi, 2010), among which the most cultivated are *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* and *P. alata*. The Brazilian savanna is among the five Brazilian areas of greatest abundance of native plants. This biome comprises more than 40 wild *Passiflora* species, of which *P. cincinnata*, *P. alata*, *P. setacea*, *P. nitida*, *P. serrato-digitata* and *P. quadrangularis* (Faleiro, Junqueira, & Braga, 2005) stand out.

Passiflora fruits, peels, teas and pulps are usually taken as a popular medicine to control anxiety, prevent insomnia, trembling, diabetes and obesity, although the literature has already proved that various compounds present in different parts of passiflora plants are responsible for modulating these biological effects (Argentieri, Levi, Guzzo, & Avato, 2015; Carvajal et al., 2014; Min, Nguyen, Kim, & Lee, 2014). These effects are mainly related to the presence of the bioactive compounds, such as carotenoids and polyphenols, especially orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin, which are the main flavonoids present in passiflora species (Gadioli, da Cunha, de Carvalho, Costa, & Pineli, 2016; Morais et al., 2015). On the other hand, polyamines, which have been recently identified in passiflora (Bomtempo, Costa, Lima, Engeseth, & Gloria, 2016), also have been described to have antioxidant and neuroprotective properties (Kalac, 2014). Nevertheless, the composition and the biological effects of wild passifloras from the Brazilian savanna have not been investigated yet. Therefore, the present study aimed at evaluating the phenolic compounds, bioactive amines, amino acids, as well as antimicrobial and antioxidant activities of pulps, leaves and seeds of *P. alata* and *P. setacea*, wild passifloras from the Brazilian savanna.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and bioactive compounds extraction

Ripe fruits and leaves of the wild *Passiflora alata* and *P. setacea* were collected at Embrapa Cerrados, located in Brasília, Brazil, in January 2015. Leaves were dried at 50°C for 5 days. The shell was removed, and pulps were obtained through a depulper. The by-product from the depulping process was considered the seed samples. Pulps and seeds were lyophilized. Samples were stored at -80°C during the analysis period. Bioactive compounds extraction for pulps and seeds were performed in water bath at 80°C for 30 minutes, where 1.0 g of lyophilized sample was homogenized in 10 mL of 70% ethanol for 30 minutes. At the end of the extraction, the mixture was centrifuged at 1.000 rpm for 15 minutes and the supernatant was collected. The same procedure was repeated using 70% acetone. Organic solvents were vacuum-evaporated (Santana, 2015), with adaptations). Leaves extraction procedure was performed by adding 150.0mg of dried leaves in 10 mL of boiling water for 10 minutes, with filtration on Whatman filter nº 6 and the volume was completed to 10 mL in a volumetric flask (Pineli et al., 2015). All extracts were lyophilized and stored at -80°C during the analysis period. The samples were protected from light throughout the procedures conduction.

### 2.2. Moisture

Moisture was determined by gravimetry, by drying the samples at 105°C until constant weight (AOAC, 2005).

### 2.3. Total phenolic compounds (TPC)

TPC were quantified by using Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton & Rossi, 1965). A 0.2 mL aliquot of the extract was mixed with 1.0 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:9, reagent: distilled water), incubated for 1 minute at room temperature and 0.8 mL of 7.5% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added. After 2h at room temperature and protected from light, absorbance was measured at 765 nm. The results were presented in milligrams of gallic acid equivalent/100 g of fresh weight (mg GAE/100 g FW) for pulps and seeds or mg GAE/L for leaves.

#### 2.4. Tannins (proanthocyanidins)

The dosing of proanthocyanidins was performed through the colorimetric method DMAC (4-dimethylaminocinnamaldehyde), according to Prior et al. (2010). The determinations were performed on 96-well polystyrene microplates (Kasvi, Parana, Brazil). We added 210  $\mu\text{L}$  of the 0.1% DMAC reagent (prepared in ethanol:water:HCl, with ratio 75:12.5:12.5) to 70  $\mu\text{L}$  of properly diluted sample. After a 30-minute incubation protected from light, the reading was performed on a Spectramax M2 (Molecular devices, California, USA) microplate spectrophotometer at a wavelength of 640 nm. The results were expressed in mg procyanidin B2 equivalent/100 g fresh weight (mg PB2E/100 g FW) for pulps and seeds or mg PB2E/L for leaves.

#### 2.5. Total antioxidant activity (TAA)

TAA was calculated with two methods, both protecting from light: diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995), based on the radical-scavenging by antioxidants; and ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000). The absorbance was measured in 517 and 595 nm, respectively. The results were presented in  $\mu\text{mol}$  of trolox equivalent/100 g of fresh weight ( $\mu\text{mol TE}/100$  g FW) for pulps and seeds or  $\mu\text{mol TE}/\text{L}$  for leaves.

#### 2.6. Identification of phenolic compounds by Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass-spectrometry (UPLC–QToF-MS/MS) method

This analysis was based on the methodology described by Lopes Neto et al. (2017).

Chromatographic analysis: the analysis was performed in an Acquity Ultra performance liquid chromatography (UPLC) (Waters, Milford, MA, EUA) system, coupled to a Quadrupole/time-of-flight (QToF) (Waters, Milford, MA, EUA) system of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). Chromatographic runs were performed on a Waters Acquity UPLC BEH column (150 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), at fixed temperature of 40°C, mobile phases water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B), gradient ranging from 2.0% to 95.0% B (15 min), flow 0.4 mL/min and injection volume of 5  $\mu\text{L}$ .

Mass spectrometry: the ESI-mode was acquired in the range of 110-1180 Da, at fixed source temperature of 120°C, desolvation temperature 350°C, desolvation gas flow 500 L/h, extraction cone 0.5 V, capillary voltage 2.6 kV. Leucine enkephalin was used as a lock mass. The acquisition mode was MS<sup>E</sup>. The instrument was controlled by Masslynx 4.1 software (Waters Corporation).

## 2.7. Bioactive amines and amino acids

Samples were analyzed according to the methodology described by Fiechter, Sivec, and Mayer (2013) for determination of bioactive amines and free amino acids. The bioactive amines and amino acids in the extracts were derived (pre-column bypass) by reaction with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) using Waters AccQ.Fluor® kit (WatersAccQ, 1993). We added 35 µL of AccQ.Fluor® borate buffer and 10 µL of AQC reagent to 5 µL of neutralized extract, after 1 minute of rest, heated at 55°C for 10 minutes in a water bath to complete the bypass reaction. The derived samples were filtered on 0.20 µm pore syringe filters (Whatman®, GE Healthcare, UK).

Chromatographic analysis of derived bioactive amines and amino acids was performed on Waters Acquity Ultra Performance LC (UPLC®) (Waters, Milford, MA, USA) UPLC equipped with an Acquity® tunable ultraviolet detector (TUV) (Waters, Milford, USA). Acquity UPLC® BEH C18 reverse phase column (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) was used for separation. Two mobile phase solutions were employed in the gradient mode shown in Table 1: A) 0.1 mol/L sodium acetate buffer in ultrapure water with pH adjusted to 4.8 with acetic acid, and B) acetonitrile of Chromatographic grade, both vacuum-filtered 0.22µm pore membrane (GV Durapore Merck®) and sonicated for 30 minutes. The injection volume of the samples in the column was 2.0 µL, the flow rate was 1.0 mL/min and the UV detection wavelength was 249 nm at a sampling rate of 40 dots/s. Waters Empower 2 software was used to control UPLC and data acquisition. Results were presented in mg/100 g of fresh weight (mg/100 g FW) for pulps and seeds or mg/L for leaves.

**Table 1.** Concentration gradient of the mobile phase solutions employed in the separation of the bioactive amines and free amino acids in the passiflora extracts

Time <sup>1</sup>	% A (acetate buffer pH 4.8)	% B (acetonitrile)
Initial	100	0
2.5 min	100	0
4.0 min	97	3
9.0 min	70	30
9.5 min	0	100
10.0 min	0	100
10.5 min	100	0

<sup>1</sup> Rebalance to initial conditions for an additional 1.5 minutes. Total running time: 12 min.

## 2.8. Antimicrobial activity

Bacterial cultures: *Escherichia coli* ATCC® 25922™ (Gram negative) and *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ (Gram positive) strain were chosen for their pathogenicity. *S. aureus* and *E. coli* were inoculated on Manitol agar and MacConkey agar, respectively, for initial growth and confirmation of the phenotype. After growth in these media, isolated colonies were inoculated into enrichment medium (brain heart infusion – BHI – broth) for subsequent inoculation into Müller Hinton broth (MH) with glycerol 20%, not to break the cell membranes of the inoculum with freezing, and stored at -20°C to be used during the assays.

Antimicrobial activity: Antibacterial screening was performed according to the NCCLS protocol translated by ANVISA (2003), with modifications described as follows. Pulps, seeds and leaves of *P. alata* and *P. setacea* extracts minimum inhibitory and bactericidal concentration (MICs and MBCs) were determined following broth microdilution assay. Initially, growth curves were obtained at 37°C for each strain to correlate optical density (OD) values at 630 nm with plate counts. For the assays, overnight (8-14 h) bacterial cultures were diluted in double-strength MH to obtain initial inoculum of approximately 10<sup>8</sup> CFU/mL, optical density (OD) adjusted from 0.08 to 0.1 at 630 nm. After OD determination in the range of acceptability, cultures were diluted in MH broth to obtain a concentration of microorganisms of 10<sup>7</sup> CFU/mL so that the final concentration of each inoculum in the reaction wells was 10<sup>3</sup> CFU/mL. The MIC analyses were carried out in sterilized 96-well polystyrene microplate (Kasvi, Parana,

Brazil). Aqueous suspensions of extracts ranging from 500 to 8,000 µg/mL were evaluated for MIC and MBC values for both bacteria.

Positive controls containing inoculum and sterile distilled water at test concentrations (combined and singly) were tested to ensure solvents and additives had no effect on OD at 630 nm measurements or antimicrobial activity. Negative controls consisting of known antimicrobial solutions (ampicillin for *E. coli* and chloramphenicol for *S. aureus*) and sterile 2x broth were included for baseline adjustment (OD at 630 nm).

The assay was performed with readings in Spectramax M2 (Molecular devices, California, USA) microplate spectrophotometer, every 20 minutes for the first 12 hours and a further reading after 24 hours of microplate incubation at 37°C. Test wells that showed  $\leq 0.05$  change in OD at 630 nm from 0 to 24 h were classified as inhibitory (after appropriate baseline adjustments). MIC was considered the lowest antimicrobial concentration that inhibited the visible microorganism growth for all replicates after overnight incubation.

All wells classified as inhibitory for the test microorganism were then assessed for bactericidal activity. Microplates contents of the wells were mixed with twice the volume of broth MH to wash the inocula, removing the extracts. The mixture was centrifuged at 4,000 rpm for 5 min, the supernatant was discarded and the procedure repeated one more time. The pellet obtained in the last centrifugation was reinoculated with 250 µL of MH broth for 24 hours to verify if there was growth of microorganism in the absence of the extract. If OD did not increase over the 24 hours, the treatment concentration was considered bactericidal. The lowest antimicrobial concentration demonstrating bactericidal activity across all replicates was declared MBC.

## 2.9. Statistical analysis

A completely randomized design was carried out, comprising six treatments, from the 2 x 3 factorial scheme, arranged in two species of passiflora (*P. alata* and *P. setacea*) and 3 parts of the plant (leaves, pulps and seeds). All experiments were performed in triplicate as independent experiments and results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Data were submitted to Variance Analysis (ANOVA) and

the means were compared by Tukey test ( $p \leq 0.05$ ), using XLSTAT program (ADDINSOFT, Paris, France).

### 3. Results and discussion

Many passiflora species have biological beneficial effects to human health, but there is still a diversity of passifloras little explored, with their effects and composition not clearly elucidated, such as those from the Brazilian savanna. Thus, this is an exploratory study on phenolic compounds, amino acids, bioactive amines of wild *Passiflora alata* and *P. setacea* leaves, pulps and seeds, and their antioxidant and antimicrobial activities.

#### 3.1. Phenolic compounds, tannins and antioxidant activity

Contents of moisture, TPC, tannins, as well as antioxidant activity of *P. alata* and *P. setacea* pulps, seeds and leaves are described in Table 2.

In the present study, *P. setacea* seeds presented expressively high amount of TPC (4,754.6 mg GAE/100 g FW), tannins (645.3 mg Procyanidin B2 equivalent/100 g FW) and, consequently, higher antioxidant activities by both DPPH (31,345.8  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$ ) and FRAP (37,625.1  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$ ) assays, compared with the other parts of *P. setacea* and with all the *P. alata* parts. For both species, pulps and leaves presented lower TPC content (at least 34-fold lower in relation to *P. setacea* seeds), and TAA by DPPH (306.2 - 410.9  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$ ) and FRAP (528.1  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g FW}$  - 928.7  $\mu\text{mol TE}/\text{L}$ ) assays, in relation to *P. setacea* and *P. alata* seeds. For tannins, all the analyzed parts of *P. alata* showed similar levels of Procyanidin B2 equivalent/100 g FW, whereas *P. setacea* seeds presented higher tannins levels compared to the other parts of this species (more than 35-fold higher).

**Table 2.** Moisture, total phenolic compounds, tannins and antioxidant activity by DPPH and FRAP, in fresh weight (FW), of wild passiflora pulps, seeds and leaves from Brazilian savanna

Parameters	<i>Passiflora alata</i>			<i>Passiflora setacea</i>		
	Leaves (mg/L)	Pulps (mg/100g FW)	Seeds (mg/100g FW)	Leaves (mg/L)	Pulps (mg/100g FW)	Seeds (mg/100g FW)
Moisture <sup>1</sup>	-	85.4 <sup>b</sup> ± 0.0	48.4 <sup>c</sup> ± 1.0	-	85.8 <sup>a</sup> ± 0.1	45.4 <sup>d</sup> ± 0,0
Total phenolic compounds (GAE <sup>2</sup> )	125. 5 <sup>c</sup> ± 6.8	80.5 <sup>c</sup> ± 2.4	1,406.5 <sup>b</sup> ± 106.7	140.0 <sup>c</sup> ± 9.7	76.8 <sup>c</sup> ± 5.4	4,754.6 <sup>a</sup> ± 480,3
Tannins (PB2E <sup>3</sup> )	5.2 <sup>b</sup> ± 0.6	5.5 <sup>b</sup> ± 0.9	15.8 <sup>b</sup> ± 3.0	6.5 <sup>b</sup> ± 0.7	17.4 <sup>b</sup> ± 1.0	645.3 <sup>a</sup> ± 44.1
DPPH (TE <sup>4</sup> )	357.4 <sup>c</sup> ± 11.1	306.2 <sup>c</sup> ± 20.0	9,673.1 <sup>b</sup> ± 872.8	347.4 <sup>c</sup> ± 17.7	410.9 <sup>c</sup> ± 36.3	31,345.8 <sup>a</sup> ± 872.8
FRAP (TE <sup>4</sup> )	888.1 <sup>c</sup> ± 59.1	528.1 <sup>c</sup> ± 14.4	12,202.7 <sup>b</sup> ± 491.7	928.7 <sup>c</sup> ± 57.3	638.4 <sup>c</sup> ± 48.8	37,625.1 <sup>a</sup> ± 3,742.3

Values are means ± standard deviations (n=3). In a same column, means with different superscript small letters are significantly different according to ANOVA followed by Tukey's test (p≤ 0.05).

<sup>1</sup>Values presented in percentage (%). <sup>2</sup>Galic acid equivalent. <sup>3</sup>Procyanidin B2 equivalent. <sup>4</sup>Trolox equivalent.

Considering the categorization of TPC proposed by Rufino et al. (2010), the seeds of the passifloras explored in the present study may be classified as important sources of TPC, once in this part of the plants there was a high content of these compounds (>500 mg GAE/100 g FW), whereas the leaves presented medium and the pulps low content of TPC (100-500 mg GAE/100 g FW; <100 mg GAE/100 g FW, respectively).

Similar to what was found in the present study, Yilmaz et al. (2015) verified that seeds of grape presented high phenolic levels in this part of the plant. They attributed the big difference in TPC concentration of the different fractions of plants to climate, degree of ripeness, plant size and fruit variety.

Another study (de Santana, Shinagawa, Araujo Eda, Costa, & Mancini-Filho, 2015) showed that the oil extracted from *P. setacea* seed presented a 3-fold higher TPC content (15,000.2 mg GAE/100 g) than the seed from the present study. Probably this occurred because TPC amount is mainly present in the oily part of *P. setacea* seeds, suggesting that many of the phenolics of the *P. setacea* seeds are from hydrophobic origin. de Santana et al. (2015), who analyzed the phytochemical and TAA of oils from *Passiflora* spp. seeds, also showed that it was possible to conclude that the *P. setacea* oil had the highest quality regarding TPC and TAA, corroborating with our findings for seeds, pulps and leaves *P. setacea*.

Further, the TPC of the passiflora seeds in the present study were much higher than strawberries (174.4 mg GAE/100 g FW), which is worldwide known to be source of TPC and TAA (Pineli et al., 2015). Thus, it is suggested that passiflora seeds are excellent sources of antioxidant compounds and may also exert important biological effects.

Since the food matrix presents a wide diversity of antioxidant compounds, usually, the antioxidant activity of different parts of plants is determined by the combination of at least two methods such as DPPH and FRAP (Lopez-Alarcon & Denicola, 2013). The highest TAA by both DPPH (31,345.8  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g FW}$ ) and FRAP (37,625.1  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g FW}$ ) assays were determined in the *P. setacea* seeds. TAA of these seeds by DPPH was 76-fold higher than the pulps and 98-fold than the leaves of *P. setacea*. By FRAP, the TAA of *P. setacea* seeds was 59-fold higher than the pulps and 41-fold higher than the leaves of that species. Comparing the TAA of *P.*

*alata* plant parts with each other, the same trend is observed, in which the seeds have TAA much higher than those of the pulps and leaves. By DPPH it was 30-fold higher than pulps and leaves, and by the FRAP method it was 23-fold and 14-fold higher than the pulps and leaves, respectively.

Exotic Brazilian fruits such as buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) and gabioba (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) pulps have high TAA, ~3,500.0 and 7,700.0  $\mu\text{mol TE}/100\text{ g FW}$  (ALVES, DIAS, HASSIMOTTO, & NAVES, 2017; Candido, Silva, & Agostini-Costa, 2015), values that are lower than those found for *P. alata* and *P. setacea* seeds, but are much higher (up to 25-fold) when compared to passiflora pulps and leaves.

The cultivation site is one of the factors that influence the chemical composition of the plants, which can be attributed to soil characteristics, climate, rainfall, age of the plant and sunlight exposure. In the Brazilian savanna, the fruits are exposed to a dry environment, acid soil, high temperatures, higher incidence of sunlight, which in this case may contribute to the formation of secondary metabolites of the plant, such as phenolic compounds (Candido et al., 2015).

In order to identify the possible antioxidant compounds of *P. alata* and *P. setacea* pulps, leaves and seeds, we attempted to elucidate some phenolic structures by mass spectrometry (Table 3). The use of ESI as ionization source operating in the negative mode has proved to be more efficient and sensitive for phenolic compounds and flavonoids characterization, since it provides an identification of polar organic compounds with acidic sites, such as the phenolics (Spínola, Pinto, & Castilho, 2015).

The chromatographic fingerprint of polyphenolic compounds from samples was analyzed using UPLC-QToF-MS/MS. Compounds were subsequently tentatively identified by UPLC-QToF-MS/MS based on the interpretation of their generated fragments obtained from mass spectra ( $\text{MS}^2$  experiments) and by comparison with literature data. We tried to identify 15 phenolic compounds, comprising 10 flavonoids and 5 phenolic acids. It was easier to identify the compounds of the leaves. It was possible to elucidate 10 phenolic structures in them. Although interesting peaks appeared in pulps spectrum (data not shown), it was not possible to identify any compound in the *P. alata* pulps.

Of all 10 flavonoids tentatively identified, 5 are O-glucoside and 5 are C-glucoside. The usual passiflora flavonoids structures, namely apigenin, orientin, isorientin, isovitexin, vitexin, luteolin or their derivatives were tentatively identified.

**Table 3.** Attempt of phenolic compounds identification of wild *Passiflora alata* and *P. setacea* from Brazilian savanna, by UPLC–QToF-MS/MS in negative ion mode

Nº	t <sub>R</sub> range (min)	Molecular formula [M - H] <sup>-</sup>	Fragments	Calculated m/z [M - H] <sup>-</sup>	Compound	Phenolic classification	<i>Passiflora alata</i>			<i>Passiflora setacea</i>		
							Leaves	Pulps	Seeds	Leaves	Pulps	Seeds
1	1.59	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub>	<b>343</b>	343.0665	Galloylquinic acid	Phenolic acid	-	-	-	-	+	-
2	2.30	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	<b>153</b>	153.0188	Protocatechuic acid	Phenolic acid	-	-	+	-	-	-
3	2.57	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	167, <b>152</b>	167.0344	Vanillic acid	Phenolic acid	-	-	+	-	-	-
4	2.62	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>	447, 259, 233, <b>152</b>	447.1139	Dihydroxybenzoic acid hexoside pentoside	Phenolic acid	-	-	-	+	-	-
5	3.12	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	417, <b>152</b> , 153, 241	417.1033	Dihydroxybenzoic acid-O-dipentoside	Phenolic acid	+	-	-	-	-	-
6	3.70	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	609, 489, <b>429</b> , 309	609.1456	Isoorientin-2"-O-glucoside	Flavonid	-	-	-	+	-	-
7	3.79	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>15</sub>	579, <b>459</b> , 429, 357, 267, 153	579.135	Luteolin-6-C-arabinosyl-8-C-glucoside	Flavonid	-	-	-	+	-	-
8	3.90	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	447, 357, <b>327</b> , 285, 267	447.0927	Luteolin 6-C-glucoside (isorientin)	Flavonid	-	-	-	+	-	-
9	4.09	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	593, <b>413</b> , 293	593.1506	Isovitexin-2"-O-glucoside	Flavonid	+	-	-	++	-	-
10	4.26	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>14</sub>	577, 413, <b>293</b>	577.1557	Vitexin-2"-O-rhamnoside	Flavonid	++	-	-	-	-	-
11	4.27	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	563, 443, 413, 341, <b>293</b>	563.1401	Apigenin-O-pentosyl-8-C-hexoside	Flavonid	-	-	-	+	-	-

N <sup>o</sup>	t <sub>R</sub> range (min)	Molecular formula [M - H] <sup>-</sup>	Fragments	Calculated m/z [M - H] <sup>-</sup>	Compound	Phenolic classification	<i>Passiflora alata</i>			<i>Passiflora setacea</i>		
							Leaves	Pulps	Seeds	Leaves	Pulps	Seeds
12	4.37	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	341, <b>311</b> , 283	341.0661	Pyranodelphinin		+	-	-	-	-	-
13	4.46	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub>	597, 489, 477, 417, 387, <b>357</b> , 315, 239, 209, 167	597.1819	Phloretin-3',5'-di- C-glucoside	Flavonid	-	-	-	-	++	+
14	4.49	C <sub>35</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	607, <b>443</b> , 341, 323	607.1604	Unknown diosmetin conjugate	Flavonid	+	-	-	-	-	-
15	4.54	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	461, 371, 341, <b>298</b>	461.1084	Diosmetin 8-C- glucoside (Orientin 4'-methyl ether)	Flavonid	-	-	-	+	-	-

+: tentatively identified compound; ++: major compound; -: compound could not be tentatively identified.

Five flavonoids had already been identified in leaves and pericarp of other passiflora species (*P. coacrilis* and *P. incarnata*). Based on previously published fragmentation spectra, compounds 6, 8, 9, 11 and 16 were named as isoorientin-2''-O-glucoside (m/z 609), luteolin 6-C-glucoside (isorientin) (m/z 447), isovitexin-2''-O-glucoside (m/z 593), vitexin-2''-O-rhamnoside (m/z 577) and diosmetin 8-C-glucoside (Orientin 4'-methyl ether) (m/z 461) (Argentieri, Levi, Guzzo, & Avato, 2015; Brito, Ramirez, Areche, Sepúlveda, & Simirgiotis, 2014; Escobar, Liu, & Mabry, 1983; Negri, Santi, & Tabach, 2012; Patil, 2013; Zucolotto, Fagundes, Reginatto, Ramos, Castellanos, Duque, et al., 2012).

The attempt to identify other compounds, which have not yet been elucidated in *Passiflora*, was based on the fragments and mass described in other plant species. Peaks 1, 2, 3, 4 and 5 are phenolic acids and were identified as galloylquinic acid exhibiting m/z 343 (Hanhineva, Rogachev, Kokko, Mintz-Oron, Venger, Kärenlampi, et al., 2008), protocatechuic acid m/z 153 (Chen, Wang, Wang, Bei, Wang, See, et al., 2012), vanillic acid m/z 167 (Vallverdú-Queralt, Regueiro, Alvarenga, Martinez-Huelamo, Leal, & Lamuela-Raventos, 2015), dihydroxybenzoic acid hexoside pentoside m/z 447 (Zhao, Li, Zeng, Huang, Hou, & Lai, 2014) and dihydroxybenzoic acid-O-dipentoside m/z 417 (Beelders, De Beer, Stander, & Joubert, 2014). Probably, the unprecedented identification of these compounds may have occurred because most of them were found in the seeds, which is a by-product still unexplored in the *Passiflora* (Gadioli, da Cunha, de Carvalho, Costa, & Pineli, 2016). The flavonoids pyranodelphinin with m/z 341 and MS/MS 311 and 283, as well as phloretin-3',5'-di-C-glucoside m/z 597 and intensity fragment 357 allowed their tentatively identification, when comparing the same compounds identified for blackcurrant (Lu & Foo, 2002) and herbal tea (Beelders, De Beer, Stander, & Joubert, 2014).

Although the following compounds luteolin-6-C-arabinosyl-8-C-glucoside, apigenin-O-pentosyl-8-C-hexoside, unknown diosmetin conjugate have never been identified for passiflora, their aglycones and other derivatives are commonly found in species of this genus, such as *P. edulis* (Xu, Wang, Yang, Luo, Fan, Zi, et al., 2013) and *P. coacrilis* (Escobar, Liu, & Mabry, 1983). Those compounds were previously identified in tropical citrus fruits (Roowi & Crozier, 2011), herbal tea (Beelders, De Beer, Stander, & Joubert, 2014) and rice leaves (Jung, Lee, Lim, Ha, Liu, & Lee, 2013).

The detection of phenolic compounds in foods such as passifloras contributes in the search for a healthy diet, as well as to the therapeutic use of natural products, since it is already known that many polyphenols of passifloras present positive biological activities for health, acting against the oxidative stress and presenting neuroprotective, antioxidant, anti-inflammatory and antidepressant effects, for example (Argentieri, Levi, Guzzo, & Avato, 2015; Gadioli, da Cunha, de Carvalho, Costa, & Pineli, 2016).

### 3.2. Amino acids and bioactive amines

In food, free amino acids may occur normally or be released from protein as a result of the activity of proteolytic microorganisms, which may be part of the microbiota associated with the food or be introduced to obtain fermented products. In turn, the presence of bioactive amines in foods includes the availability of free amino acids, the presence of microorganisms with decarboxylase activity on amino acids, the existence of favorable conditions for the growth of microorganisms, production and action of decarboxylation enzymes (Bomtempo, Costa, Lima, Engeseth, & Gloria, 2016; do Carmo Brito, Campos Chiste, da Silva Pena, Abreu Gloria, & Santos Lopes, 2017). This is the first study that links the production of amino acids and bioactive amines in passiflora plants. The dosing and identification of the amino acids and bioactive amines found in the pulp, leaves and seed of *P. alata* and *P. setacea* are described in Table 4.

**Table 4.** Amino acids and bioactive amines, in fresh weight (FW), of wild passiflora pulps, seeds and leaves from Brazilian savanna

Analyte	<i>Passiflora alata</i>			<i>Passiflora setacea</i>		
	Leaves (mg/L)	Pulps (mg/100g FW)	Seeds (mg/100g FW)	Leaves (mg/L)	Pulps (mg/100g FW)	Seeds (mg/100g FW)
Amino acids						
Aspartic acid (Asp)	12.0 <sup>d</sup> ± 1.2	23.0 <sup>b</sup> ± 1.7	17.5 <sup>c</sup> ± 1.4	8.1 <sup>e</sup> ± 0.4	36.7 <sup>a</sup> ± 2.8	24.2 <sup>b</sup> ± 2.3
Serine (Ser)	8.3 <sup>b</sup> ± 0.7	8.5 <sup>b</sup> ± 0.7	7.0 <sup>c</sup> ± 0.6	20.0 <sup>a</sup> ± 0.9	5.3 <sup>d</sup> ± 0.5	4.7 <sup>d</sup> ± 0.4
Glycine (Gly)	1.1 <sup>c</sup> ± 0.1	3.2 <sup>a</sup> ± 0.3	1.7 <sup>b</sup> ± 0.1	-	0.5 <sup>d</sup> ± 0.1	-
Glutamic acid (Glu)	7.4 <sup>c</sup> ± 0.6	7.4 <sup>c</sup> ± 0.4	11.2 <sup>a</sup> ± 0.9	11.9 <sup>a</sup> ± 1.1	7.4 <sup>c</sup> ± 0.6	8.8 <sup>b</sup> ± 0.6
Histidine (His)	6.5 <sup>c</sup> ± 0.6	10.8 <sup>b</sup> ± 0.9	13.5 <sup>a</sup> ± 1.2	5.7 <sup>c</sup> ± 0.6	0.8 <sup>d</sup> ± 0.1	0.5 <sup>d</sup> ± 0.1
Threonine (Thr)	0.8 <sup>e</sup> ± 0.1	2.0 <sup>b</sup> ± 0.1	1.7 <sup>c</sup> ± 0.1	3.1 <sup>a</sup> ± 0.2	0.8 <sup>e</sup> ± 0.1	1.2 <sup>d</sup> ± 0.1
Arginine (Arg)	4.3 <sup>d</sup> ± 0.4	22.3 <sup>b</sup> ± 2.1	42.0 <sup>a</sup> ± 3.1	6.5 <sup>c</sup> ± 0.5	2.1 <sup>d</sup> ± 0.2	3.7 <sup>d</sup> ± 0.3
Alanine (Ala)	13.6 <sup>a</sup> ± 1.3	11.3 <sup>b</sup> ± 0.7	11.1 <sup>b</sup> ± 0.9	10.4 <sup>b</sup> ± 0.4	3.4 <sup>c</sup> ± 0.3	3.6 <sup>c</sup> ± 0.3
Phenylalanine (Phe)	8.2 <sup>b</sup> ± 0.7	1.5 <sup>d</sup> ± 0.1	2.5 <sup>c</sup> ± 0.2	8.8 <sup>a</sup> ± 0.4	0.2 <sup>f</sup> ± 0.0	0.7 <sup>e</sup> ± 0.0
Proline (Pro)	42.3 <sup>b</sup> ± 3.6	23.7 <sup>d</sup> ± 1.7	18.0 <sup>e</sup> ± 1.5	71.2 <sup>a</sup> ± 2.7	30.7 <sup>c</sup> ± 2.8	22.4 <sup>d</sup> ± 2.2
Tyrosine (Tyr)	5.0 <sup>c</sup> ± 0.7	7.6 <sup>b</sup> ± 0.7	11.0 <sup>a</sup> ± 1.1	5.9 <sup>c</sup> ± 0.4	0.7 <sup>e</sup> ± 0.1	2.1 <sup>d</sup> ± 0.3
Valine (Val)	10.0 <sup>b</sup> ± 0.9	2.0 <sup>d</sup> ± 0.2	2.7 <sup>c</sup> ± 0.2	10.8 <sup>a</sup> ± 0.3	1.5 <sup>d</sup> ± 0.1	2.1 <sup>cd</sup> ± 0.4
Methionine (Met)	-	0.5 <sup>c</sup> ± 0.0	1.2 <sup>b</sup> ± 0.1	4.0 <sup>a</sup> ± 0.3	-	-
Lysine (Lys)	1.0 <sup>c</sup> ± 0.1	2.0 <sup>b</sup> ± 0.1	2.6 <sup>a</sup> ± 0.2	1.8 <sup>b</sup> ± 0.1	1.0 <sup>cd</sup> ± 0.1	0.8 <sup>d</sup> ± 0.1
Isoleucine (Ile)	1.1 <sup>d</sup> ± 0.1	1.9 <sup>a</sup> ± 0.2	1.3 <sup>c</sup> ± 0.1	1.5 <sup>b</sup> ± 0.1	0.5 <sup>f</sup> ± 0.1	0.8 <sup>e</sup> ± 0.0
Leucine (Leu)	0.5 <sup>d</sup> ± 0.0	1.0 <sup>b</sup> ± 0.1	1.4 <sup>a</sup> ± 0.1	0.8 <sup>c</sup> ± 0.1	0.4 <sup>d</sup> ± 0.0	1.1 <sup>b</sup> ± 0.1
Bioactive amines						
Histamine (Him)	-	2.1 <sup>a</sup> ± 0.1	1.4 <sup>b</sup> ± 0.1	-	1.4 <sup>b</sup> ± 0.2	1.0 <sup>c</sup> ± 0.1
Agmatine (Agm)	-	1.4 <sup>a</sup> ± 0.1	-	-	0.4 <sup>b</sup> ± 0.0	-
Tyramine (Tym)	-	0.2 <sup>b</sup> ± 0.0	-	2.0 <sup>a</sup> ± 0.2	0.2 <sup>b</sup> ± 0.0	-
Putrescine (Put)	3.3 <sup>b</sup> ± 0.2	1.2 <sup>d</sup> ± 0.1	1.7 <sup>cd</sup> ± 0.1	22.2 <sup>a</sup> ± 1.3	2.1 <sup>c</sup> ± 0.2	1.9 <sup>cd</sup> ± 0.2
Spermidine (Spd)	-	1.6 <sup>a</sup> ± 0.2	1.1 <sup>b</sup> ± 0.0	-	0.6 <sup>c</sup> ± 0.1	-
Spermine (Epm)	-	0.4 ± 0.1	-	-	-	-
Phenylethylamine (Pea)	-	-	0.5 <sup>b</sup> ± 0.0	-	-	1.0 <sup>a</sup> ± 0.1

Analyte	<i>Passiflora alata</i>			<i>Passiflora setacea</i>		
	Leaves (mg/L)	Pulps (mg/100g FW)	Seeds (mg/100g FW)	Leaves (mg/L)	Pulps (mg/100g FW)	Seeds (mg/100g FW)
Total bioactive amines <sup>1</sup>	3.3	6.9	3.3	24.2	4.7	3.9

Values are means  $\pm$  standard deviations (n=3). In a same row, means with different superscript small letters are significantly different according to ANOVA followed by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

<sup>1</sup>Total biogenic amines + polyamines.

The identification and quantification of passifloras amino acids resulted in 16 amino acids elucidated, of which 9 are essential (arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine and valine) (Table 4). *P. alata* seeds presented the highest amounts of the following amino acids, in mg/100g FW: glutamic acid (11.2), histidine (13.5), arginine (42.0), tyrosine (11.0), lysine (2.6) and leucine (1.4). Proline was the main amino acid of *P. setacea* leaves (71.2 mg/L). Alanine and valine were more prevalent in *P. alata* leaves (13.6 and 10.0 mg/L, respectively), whereas highest amounts of glycine and isoleucine were found in *P. alata* pulps (3.2 and 1.9 mg/100 g FW, respectively). The aspartic acid was the only amino acid more prevalent in the *P. setacea* pulps, presenting great amount (37.7 mg/100 g FW). In comparison with all samples investigated, *P. setacea* seeds did not present any high value for the amino acids elucidated. A study with chinese *P. edulis* seeds, also found the same amino acids, besides cystine, however in concentrations much higher than those of our samples (Liu, Yang, Li, Zhang, Ji, & Hong, 2008). Besides species, environment, ripeness, edaphoclimatic conditions, the large difference in the amino acids amount of the both studies could be explained due to the method of extraction, which was acid in Liu's study and aqueous or hydroalcoholic in this one. Glycine and methionine were not identified in leaves and seeds of *P. setacea*, whilst in *P. alata* leaves only methionine was not detected.

Amino acids are precursors of a number of important substances for human health, including bioactive amines, which have several beneficial biological functions, such as antioxidant activity, growth effect, psycho or vasoactive functions, among others. The amines are formed from the decarboxylation of amino acids. Synthesis of polyamines is a process that can occur via arginine, citrulline or methionine. The synthesis of biogenic amines occurs through the precursor amino acids histidine, tryptophan, phenylalanine and lysine (Bomtempo et al., 2016; Santiago-Silva, Labanca, & Gloria, 2011).

According to biological functions, bioactive amines can be classified as polyamines or biogenic amines (do Carmo Brito, Campos Chiste, da Silva Pena, Abreu Gloria, & Santos Lopes, 2017). In the present study, of the bioactive amines existent in the environment, seven types were found in the two passiflora species studied, being three polyamines (spermine, spermidine and agmatine), one diamine (putrescine) and

three biogenic amines (histamine, tyramine, phenylethylamine). Concentrations and composition of the seven bioactive amines varied among passiflora species and their parts of plants (Table 4).

All parts of the plants presented putrescine in their composition, which was found in higher concentration in *P. setacea* leaves (22.2 mg/L), followed by *P. alata* leaves (3.3 mg/L), which in turn presented a content almost 7-fold lower than that found in the leaves of *P. setacea*. Since putrescine can cause a putrid flavor to food, it could be a factor that interfere in the passiflora acceptability. Pineli et al. (2015) reported low acceptance in their sensory analysis with infusion of leaves of *Passiflora* spp.

*P. alata* pulps concentrated highest amounts, in mg/100g FW, of histamine (2.1), agmatine (1.4), spermidine (1.6) and spermine (0.4). Spermine was only identified and quantified in *P. alata* pulp. In the study by Bomtempo et al. (2016), higher amounts of spermidine (7.0 mg/100 g FW) and spermine (1.4 mg/100 g FW) were found for *P. alata* pulp. On the other hand, the concentration of agmatine (0.2 mg / 100 g FW) was almost 10 times lower than in the *P. alata* pulp of the present study, and histamine was not detected.

Higher levels of tyramine (2.0 mg/100 g FW) and phenylethylamine (1.0 mg/100 g FW) were reported in the pulp and seeds of *P. setacea*, respectively. Bomtempo et al. (2016) quantified a much lower tyramine value in the *P. setacea* pulp and did not detect phenylethylamine in any of its samples. Possibly, dosage differences and compounds identified between this study and what has been already described in the literature may be due to the type of extraction used to perform the analysis, since ours started from an aqueous or hydroalcoholic extract, followed by acid extraction, whereas the others performed acid extraction from the initial matrix. Other bioactive amine, serotonin (0.4 mg/100 g FW), which was reported in the literature for *P. alata* pulps (Santiago-Silva, Labanca, & Gloria, 2011), was not found in our study.

Bioactive amines play relevant roles in plant development and human health. At low levels, they are important to human health, i.e. polyamines act in cell development, growth and resistance to stress and present antioxidant activity, preventing damage to cell membranes and DNA. At low concentrations, biogenic amines modulate vaso and neuro-activities relevant to human. On the other hand, some amines, especially biogenic, at high levels, may cause adverse effects to human health, such as histamine which is associated with allergic type reactions and headache, whereas high levels of

tyramine, tryptamine and phenylethylamine can cause hypertensive crisis and migraine (do Carmo Brito, Campos Chiste, da Silva Pena, Abreu Gloria, & Santos Lopes, 2017).

### 3.3. Antimicrobial activity

Brazilian fruits (exotic and tropical) and their by-products may be promising ingredients for nutraceutical and pharmaceutical manufacturers, due to their rich bioactive compound content (Bailão, Devilla, da Conceição, & Borges, 2015). Thus, in the present study, the broth microdilution method was used to determine the antimicrobial activity of *P. alata* and *P. setacea* pulps, leaves and seeds extracts. Their MICs and MBCs concentrations for *E. coli* and *S. aureus* are shown in Table 5.

Pulps and seeds extracts from both *Passiflora* species showed inhibitory activity against both microorganisms which is consistent with previous studies reporting antimicrobial properties of *Passiflora* spp. extracts against pathogenic bacteria, i.e.; *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *E. coli* and *S. aureus* (Oliveira, Angonese, Gomes, & Ferreira, 2016; Siebra et al., 2016; Silva, Hill, Figueiredo, & Gomes, 2014). Results showed lower MIC values for *S. aureus* than *E. coli* for pulps and seeds extracts studied. The MIC values of *P. alata* and *P. setacea* seeds and pulps were of 8,000, 4,000, 4,000 and 4,000 µg/mL, respectively for *E. coli*; and 500, 4,000, 1,000 and 2,000 µg/mL, respectively, for *S. aureus*. Positive controls showed no inhibitory action for both microorganisms, whereas negative controls inhibited the microorganisms' growth for 24 hours (data not shown). Bactericidal effects were only observed in the seeds, against *E. coli* (8,000 µg/mL for *P. alata* and 4,000 µg/mL for *P. setacea*).

**Table 5.** Minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC) values for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* for free wild passiflora extracts from Brazilian savanna

Antimicrobial extract	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Passiflora alata</i> leaves	nd	nd
<i>Passiflora alata</i> pulps	8,000	>8,000
<i>Passiflora alata</i> seeds	4,000	8,000
<i>Passiflora setacea</i> leaves	nd	nd
<i>Passiflora setacea</i> pulps	4,000	>8,000
<i>Passiflora setacea</i> seeds	4,000	4,000
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Passiflora alata</i> leaves	nd	nd
<i>Passiflora alata</i> pulps	4,000	>8,000
<i>Passiflora alata</i> seeds	500	>8,000
<i>Passiflora setacea</i> leaves	nd	nd
<i>Passiflora setacea</i> pulps	2,000	>8,000
<i>Passiflora setacea</i> seeds	1,000	>8,000

<sup>1</sup>nd = not determined

MIC results show that the extracts were mostly effective against Gram-positive bacteria (*S. aureus*), compared to the results for Gram-negative (*E. coli*). Same behavior was observed by Oliveira et al. (2016) in a study with raw extracts of *P. edulis* seeds (8,000 µg/mL). The better effective action of the extracts against Gram-positive bacteria tested may be due to its cell membrane, which facilitates penetration of compounds present in the extracts. In contrast, the higher resistance of Gram-negative bacteria may be related to its sophisticated permeability barrier (Silva, Hill, Figueiredo, & Gomes, 2014).

The antimicrobial activities observed in this study for *Passiflora* pulps and seeds may be due to the combination of several compounds constituents of seeds and pulps and we could not elucidate exactly which class of compounds are responsible for this

activity, since the absence of antimicrobial activity of the leaves and the low TPC content in the pulps indicate that this activity probably does not come from phenolics. In the literature there is consistent information about the antimicrobial activities of amino acids (Pinazo, Manresa, Marques, Bustelo, Espuny, & Perez, 2016). Polyamines were also described as having antimicrobial effects (Kostopoulou, Kouvela, Magoulas, Garnelis, Panagoulas, Rodi, et al., 2014). However many studies attribute antimicrobial activities of fruits and fruits' by-products to their phenolics; the reason behind this capacity is not well documented (Saravanan & Parimelazhagan, 2014; Silva, Hill, Figueiredo, & Gomes, 2014).

#### **4. Conclusion**

Both *Passiflora* seeds presented great phenolic and tannin contents, as well as antioxidant activities, especially those of *P. setacea* species. It was easier to attempt the identification of leaves phenolic compounds, where flavonoids were mainly found. Possibly, the aqueous and hydroalcoholic extraction method of the bioactive compounds has interfered in the amount of bioactive amines and amino acids found in all parts of the *Passiflora* plants studied. However, it was still possible to observe the presence of important bioactive amines, such as spermine and spermidine, in the pulps of both species and in the *P. alata* seeds, as well as essential amino acids in all parts of the plants. Both pulps and seeds presented antimicrobial activity against Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria, but there was a better performance (lower MIC) against *S. aureus*. Microbicide activity was observed in the seeds against *E. coli*. *Passiflora* presented important compounds for human health, which may contribute to the occurrence of beneficial biological functions, such as antimicrobial and antioxidant activities.

## References

- Alves, A. M., Dias, T., Hassimotto, N. M. A., & Naves, M. M. V. (2017). Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. *Food Science and Technology (Campinas)*(AHEAD), 0-0.
- Anvisa. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada (2003).
- AOAC. (2005). (18 ed.). Gaithersburg: AOAC International.
- Argentieri, M. P., Levi, M., Guzzo, F., & Avato, P. (2015). Phytochemical analysis of *Passiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolin-derived flavonoids with antioxidant properties. *J Pharm Pharmacol*, 67(11), 1603-1612. doi: 10.1111/jphp.12454
- Bailão, E. F. L. C., Devilla, I. A., da Conceição, E. C., & Borges, L. L. (2015). Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 23760-23783.
- Beelders, T., De Beer, D., Stander, M. A., & Joubert, E. (2014). Comprehensive phenolic profiling of *Cyclopia genistoides* (L.) Vent. by LC-DAD-MS and-MS/MS reveals novel xanthone and benzophenone constituents. *Molecules*, 19(8), 11760-11790.
- Bomtempo, L. L., Costa, A. M., Lima, H., Engeseth, N., & Gloria, M. B. A. (2016). Bioactive amines in *Passiflora* are affected by species and fruit development. *Food Res Int*, 89(Pt 1), 733-738. doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.028
- 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.
- Brito, A., Ramirez, J. E., Areche, C., Sepúlveda, B., & Simirgiotis, M. J. (2014). HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules*, 19(11), 17400-17421.
- Candido, T. L., Silva, M. R., & Agostini-Costa, T. S. (2015). Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. *Food Chem*, 177, 313-319. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.041
- Carvajal, L., Turbay, S., Álvarez, L., Rodríguez, A., Alvarez, M., Bonilla, K., . . . Parra, M. (2014). Functional and nutritional properties of six species of *Passiflora* (Passifloraceae) from the department of Huila, Colombia. *Caldasia*, 36(1), 1-15.
- Cervi, A. C. A., M.A.M.D., Bernacci, L.C. (2010). Passifloraceae. *Lista de Espécies da Flora do Brasil*, 2017
- Chen, W., Wang, D., Wang, L.-s., Bei, D., Wang, J., See, W. A., . . . Liu, Z. (2012). Pharmacokinetics of protocatechuic acid in mouse and its quantification in human plasma using LC-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 908, 39-44.
- Costa, G. M., Gazola, A. C., Madóglío, F. A., Zucolotto, S. M., Reginatto, F. H., Castellanos, L., Schenkel, E. P. (2013). Vitexin derivatives as chemical markers in the differentiation of the closely related species *Passiflora alata* Curtis and *Passiflora quadrangularis* Linn. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(12), 1697-1707.
- Fernandes, T., de Ávila, R. I., de Moura, S. S., de Almeida Ribeiro, G., Naves, M. M. V., & Valadares, M. C. (2015). *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits

- protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Toxicology Reports*, 2, 184-193.
- de Santana, F. C., Shinagawa, F. B., Araujo Eda, S., Costa, A. M., & Mancini-Filho, J. (2015). Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian Passiflora Seed Oils. *J Food Sci*, 80(12), C2647-2654. doi: 10.1111/1750-3841.13102
- de Souza, J. C., Piccinelli, A. C., Aquino, D. F., de Souza, V. V., Schmitz, W. O., Traesel, G. K., Arena, A. C. (2017). Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of Campomanesia adamantium fruit barks. *Nutritional neuroscience*, 20(1), 23-31.
- do Carmo Brito, B. N., Campos Chiste, R., da Silva Pena, R., Abreu Gloria, M. B., & Santos Lopes, A. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chem*, 228, 484-490. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.004
- Escobar, L. K., Liu, Y.-L., & Mabry, T. J. (1983). C-glycosylflavonoids from *Passiflora coactilis*. *Phytochemistry*, 22(3), 796-797.
- Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., & Braga, M. F. (2005). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. *Embrapa Cerrados-Livros científicos (ALICE)*.
- Fiechter, G., Sivec, G., & Mayer, H. K. (2013). Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 927, 191-200. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.12.006
- Gadioli, I. L., da Cunha, M. d. S. B., de Carvalho, M. V. O., Costa, A. M., & Pineli, L. d. L. d. O. (2016). A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Critical reviews in food science and nutrition*(just-accepted), 00-00.
- Hanhineva, K., Rogachev, I., Kokko, H., Mintz-Oron, S., Venger, I., Kärenlampi, S., & Aharoni, A. (2008). Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. *Phytochemistry*, 69(13), 2463-2481.
- Jung, E. S., Lee, S., Lim, S.-H., Ha, S.-H., Liu, K.-H., & Lee, C. H. (2013). Metabolite profiling of the short-term responses of rice leaves (*Oryza sativa* cv. Ilmi) cultivated under different LED lights and its correlations with antioxidant activities. *Plant science*, 210, 61-69.
- Kalac, P. (2014). Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005-mid 2013. *Food Chemistry*, 161, 27-39. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.102
- Kostopoulou, O. N., Kouvella, E. C., Magoulas, G. E., Garnelis, T., Panagoulas, I., Rodi, M., Kalpaxis, D. L. (2014). Conjugation with polyamines enhances the antibacterial and anticancer activity of chloramphenicol. *Nucleic Acids Res*, 42(13), 8621-8634. doi: 10.1093/nar/gku539
- Liu, S., Yang, F., Li, J., Zhang, C., Ji, H., & Hong, P. (2008). Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China. *International journal of food sciences and nutrition*, 59(7-8), 706-715.
- Llorent-Martínez, E. J., Spínola, V., Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2015). HPLC-ESI-MS n characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. *Industrial Crops and Products*, 69, 80-90.
- Lopes Neto, J. J., de Almeida, T. S., de Medeiros, J. L., Vieira, L. R., Moreira, T. B., Maia, A. I. V., Carvalho, A. F. U. (2017). Impact of bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in biological systems upon the antioxidant

- activity of the ethanolic extract of *Triplaris gardneriana* seeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 999-1007.
- Lopez-Alarcon, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*, 763, 1-10. doi: 10.1016/j.aca.2012.11.051
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (2002). Unexpected rearrangement of pyranoanthocyanidins to furoanthocyanidins. *Tetrahedron letters*, 43(4), 715-718.
- Min, B., Nguyen, T., Kim, J., & Lee, J. (2014). Phenolic compounds from the stem bark of *Passiflora foetida* and their anti-inflammatory activity. *Planta Medica*, 80(10), PD48.
- Morais, D. R., Rotta, E. M., Sargi, S. C., Schmidt, E. M., Bonafe, E. G., Eberlin, M. N., Visentainer, J. V. (2015). Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI (–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. *Food Research International*, 77, 392-399.
- Negri, G., Santi, D. d., & Tabach, R. (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), 1024-1034.
- Noratto, G. D., Bertoldi, M. C., Krenek, K., Talcott, S. T., Stringheta, P. C., & Mertens-Talcott, S. U. (2010). Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties. *J Agric Food Chem*, 58(7), 4104-4112. doi: 10.1021/jf903161g
- Oliveira, D. A., Angonese, M., Gomes, C., & Ferreira, S. R. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 55-62.
- Patil, A. S. (2013). Exploring *Passiflora incarnata* (L.): A medicinal plants secondary metabolites as antibacterial agent. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(14), 1496-1501.
- Pinazo, A., Manresa, M., Marques, A., Bustelo, M., Espuny, M., & Perez, L. (2016). Amino acid-based surfactants: new antimicrobial agents. *Advances in colloid and interface science*, 228, 17-39.
- Pineli, L. L. O., Rodrigues, J. d. S., Costa, A. M., de Lima, H. C., Chiarello, M. D., & Melo, L. (2015). Antioxidants and sensory properties of the infusions of wild passiflora from Brazilian savannah: potential as functional beverages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1500-1506.
- Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J., & Reed, J. (2010). Multi - laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1473-1478.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Roowi, S., & Crozier, A. (2011). Flavonoids in tropical citrus species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(22), 12217-12225.
- Rufino, M. d. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chemistry*, 121(4), 996-1002.
- Santana, F. C. d. (2015). *Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de Passiflora spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica*. PhD, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Santiago-Silva, P., Labanca, R. A., & Gloria, M. B. A. (2011). Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food research international*, 44(5), 1264-1268.
- Saravanan, S., & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food science and human wellness*, 3(2), 56-64.
- Siebra, A. L. A., Oliveira, L. R., Martins, A. O., Siebra, D. C., Albuquerque, R. S., Lemos, I. C. S., da Costa, J. G. M. (2016). Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Silva, L. M., Hill, L. E., Figueiredo, E., & Gomes, C. L. (2014). Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles: synthesis, characterization, and antimicrobial activity. *Food chemistry*, 165, 362-370.
- Singleton, V., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Siqueira, E. M., Rosa, F. R., Fustinoni, A. M., de Sant'Ana, L. P., & Arruda, S. F. (2013). Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PLoS One*, 8(8), e72826. doi: 10.1371/journal.pone.0072826
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. *Food chemistry*, 173, 14-30.
- Vallverdú-Queralt, A., Regueiro, J., Alvarenga, J. F. R., Martinez-Huelamo, M., Leal, L. N., & Lamuela-Raventos, R. M. (2015). Characterization of the phenolic and antioxidant profiles of selected culinary herbs and spices: caraway, turmeric, dill, marjoram and nutmeg. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(1), 189-195.
- WatersAccQ. (1993). Instruction Manual. In W. Corp (Ed.). Milford, MA, USA.
- Xu, F., Wang, C., Yang, L., Luo, H., Fan, W., Zi, C., . . . Zhou, J. (2013). C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. [Article]. *Food Chemistry*, 136(1), 94-99. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.101
- Yilmaz, Y., Göksel, Z., Erdoğan, S. S., Öztürk, A., Atak, A., & Özer, C. (2015). Antioxidant activity and phenolic content of seed, skin and pulp parts of 22 grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars (4 common and 18 registered or candidate for registration). *Journal of food processing and preservation*, 39(6), 1682-1691.
- Zhao, Y., Li, X., Zeng, X., Huang, S., Hou, S., & Lai, X. (2014). Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*. *Analytical Methods*, 6(5), 1359-1363.
- Zucolotto, S. M., Fagundes, C., Reginatto, F. H., Ramos, F. A., Castellanos, L., Duque, C., & Schenkel, E. P. (2012). Analysis of C - glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC - DAD and HPLC - MS. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 232-239.

## CAPÍTULO 3

Artigo Original

**Estabilidade, atividades antioxidante e antimicrobiana de nanoemulsões e extratos de polpas e sementes de passifloras nativas do Cerrado**

Manuscrito que será submetido ao periódico *LWT – Food Science and Technology*

**Estabilidade, atividades antioxidante e antimicrobiana de nanoemulsões e extratos de polpas e sementes de passifloras nativas do Cerrado**

Gadioli, I.L.<sup>1\*</sup>; Oliveira, L.L.<sup>2</sup>; Santos, D. S. <sup>3</sup>, Longo, J. P. F.<sup>4</sup>; Gonçalves, R. M.<sup>2</sup>, Souza, P. E. N.<sup>5</sup>; Leandro, E. S.<sup>2</sup>, Costa, A.M.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Human Nutrition, Faculty of Health Sciences, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences; Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. PO Box 70910- 900.

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Genetics and Morphology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brazil.

<sup>5</sup> Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brazil.

<sup>6</sup> Laboratory of Food Science, Embrapa Cerrados, Brazil.

**\*Corresponding author:** e-mail: [Izabel.lucena.gadi@gmail.com](mailto:Izabel.lucena.gadi@gmail.com)

## 1. Introdução

A nanotecnologia é estratégica no cenário que busca sistemas para o aprimoramento de ações de compostos sintéticos e naturais em diversos campos de atuação, inclusive o biológico. Os avanços nessa área têm oferecido diversas oportunidades para a inovação nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética (Gupta, Eral, Hatton, & Doyle, 2016). Para a área de alimentos e nutrição, busca-se o desenvolvimento de novos ingredientes, de origem natural, que atuem como alimentos funcionais ou conservantes e tornem o alimento mais saudável, com boas características sensoriais, alta biodisponibilidade e estabilidade (Shanthilal & Bhattacharya, 2014).

Entre os diversos tipos de sistemas nanoestruturados existem as nanoemulsões, que são dispersões coloidais compostas por uma fase oleosa e uma fase aquosa, estabilizadas por tensoativos, formando gotículas com diâmetro menor que 200 nm e sistemas translúcidos (Anton & Vandamme, 2011; O'Hanlon, Amede, O'Hear, & Janjic, 2012). Dentre as principais vantagens das nanoemulsões estão a solubilidade de compostos lipofílicos, estabilidade cinética, melhora dos sistemas de entrega e aumento da biodisponibilidade, o que confere ampla aplicabilidade a elas (Chen H., Khemtong C., Yang X, Chang .X, & J., 2011; McClements & Rao, 2011).

Estudos recentes revelaram a viabilidade técnica para nanoemulsificar produtos naturais hidrofóbicos como óleos essenciais e extratos (Lou *et al.*, 2017; Quintão *et al.*, 2013; Zorzi *et al.*, 2016). Tais produtos apresentam estabilidade prolongada, além de terem suas atividades antioxidante e antimicrobiana, digestibilidade e biodisponibilidade aprimoradas quando nanoemulsificados.

A aplicação de extratos com compostos bioativos na preservação de alimentos é uma alternativa aos conservantes químicos, tal como o hidroxitolueno butilado (BHT), e contribui para a demanda dos consumidores que buscam produtos cada vez mais nutritivos e seguros, sem aditivos sintéticos. Ainda, a utilização de extratos brutos de plantas pode ser benéfica devido ao sinergismo dos compostos bioativos, que produz atividades biológicas benéficas à saúde (Silva, Hill, Figueiredo & Gomes, 2014).

Dentre as plantas que comumente atuam na medicina popular, evidenciam-se as passifloras, plantas pertencentes ao gênero *Passiflora*, família Passifloraceae e popularmente conhecidas como maracujá. Mais de 150 espécies são nativas do Brasil, das quais 70 possuem potencial para uso alimentar e terapêutico (Bellon et al.,

2007). No bioma Cerrado são encontradas mais de 40 espécies nativas, dentre as quais podem-se destacar a *P. alata* e a *P. setacea* (Faleiro et al., 2005; Gadioli et al., 2016).

As passifloras apresentam carotenoides, compostos fenólicos e amins bioativas em sua composição (Bomtempo, Costa, Lima, Engeseth, & Gloria, 2016; Gadioli, da Cunha, de Carvalho, Costa, & Pineli, 2016; Santana, Shinagawa, Araujo, Costa, & Mancini-Filho, 2015), compostos responsáveis pelo combate ao estresse oxidativo, com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antidiabéticas, neuro e psicoativas (Argentieri, Levi, Guzzo, & Avato, 2015; Colomeu et al., 2014; López-Vargas, Fernández-López, Pérez-Álvarez, & Viuda-Martos, 2013).

A indústria de processamento de frutas lida com uma grande quantidade de subprodutos obtidos nas diferentes etapas do processamento, que incluem cascas, sementes e polpas não utilizadas. Muitas vezes, os subprodutos desperdiçados apresentam conteúdo de compostos bioativos superior ao próprio produto final (Gadioli et al., 2016). Além disso, o aproveitamento integral de frutas contribui para minimizar o desperdício e agregar valor ao produto, levando a um menor impacto ambiental e maior diversidade para o consumo. As passifloras são economicamente importantes para o mercado brasileiro. Em especial, as nativas do Cerrado estão sendo estudadas para serem cada vez mais inseridas no mercado consumidor (Faleiro et al., 2005; Santana, Shinagawa, Araujo, Costa, & Mancini-Filho, 2015).

Nesse contexto, extratos com compostos bioativos podem ser obtidos de passifloras à base de diferentes partes da planta de passifloras, para o desenvolvimento de suplementos dietéticos, agentes antimicrobianos, ou conservantes. Entretanto, quando na forma livre, os extratos degradam com maior facilidade e suas ações ficam prejudicadas. Por isso, uma possível alternativa para a aplicação desses extratos de frutos ricos em compostos bioativos, na indústria alimentícia, é usando a nanotecnologia, com a nanoemulsificação (O'Hanlon et al., 2012; Gupta et al., 2016). Sendo assim, os compostos das passifloras que apresentam baixa solubilidade em água poderão exercer suas atividades com eficácia, em razão à melhora da entrega dos compostos ao sítio de ação (Silva, Hill, Figueiredo & Gomes, 2014).

Portanto, uma vez que as passifloras atuam como antioxidantes e antimicrobianos e que nanoemulsões aprimoram o desempenho de princípios ativos e melhoram a sua estabilidade, o objetivo do presente estudo foi avaliar a estabilidade, bem como as

atividades antioxidante e antimicrobiana de nanoemulsões de extratos de sementes e polpas de *P. alata* e *P. setacea*, nativas do Cerrado.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Obtenção das amostras e preparo dos extratos

Frutos maduros de *Passiflora alata* e *P. setacea* nativas do Cerrado foram colhidos na área experimental da Embrapa Cerrados, Brasília, Brasil. As cascas foram removidas e as polpas foram obtidas com o auxílio de uma despulpadeira. O subproduto do despulpamento foi considerado como sendo as amostras de sementes. Os extratos brutos foram obtidos, pesando-se 1 g da amostra liofilizada, homogeneizada com 10 mL de etanol 70%, em banho maria a 80°C por 30 minutos, seguida de centrifugação a 1.000 rpm por 15 minutos e posterior coleta do sobrenadante. O mesmo procedimento foi repetido, usando-se acetona 70%. Os solventes orgânicos foram evaporados a vácuo e, depois, os extratos foram liofilizados e armazenados a -80°C para realização dos ensaios posteriores (Santana, 2015).

### 2.2. Formulação das nanoemulsões

As nanoemulsões de polpa de *P. alata* (NEPA), polpa de *P. setacea* (NEPS), semente de *P. alata* (NESA) e semente de *P. setacea* (NESS) foram preparadas a partir do método de emulsificação de baixa energia, com inversão de fase por temperatura (PIT) (Shinoda & Hiroshi, 1969). As NESA e NESS foram obtidas na concentração de 4 mg de extrato liofilizado/mL em relação ao volume de água utilizado. A concentração das NEPA e NEPS foi de 8 mg de extrato liofilizado/mL. A proporção de tensoativo e fase oleosa foi de 3:1, respectivamente, sendo o Solutol® HS15 utilizado como tensoativo e o castor oil (óleo de rícino), juntamente com o óleo de girassol, formando a fase oleosa. Extrato com o surfactante e a fase oleosa foram pesados e submetidos a banho ultrassônico, seguido de agitação a 300 rpm por 5 minutos a 50°C. Sob agitação, foi adicionada água Milli-Q e aguardou-se o sistema atingir 70°C, para então completar o sistema para o volume final de 20 mL água Milli-Q, com posterior resfriamento imediato, até 40°C. Para obtenção da esterilidade do sistema, as nanoemulsões foram filtradas em filtro de seringa estéril de membrana PES e poro de 0,22 µm e armazenadas em frascos estéreis para utilização nos

ensaios de caracterização e estabilidade físico-química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

### 2.3. Caracterização física, química e estabilidade das nanoemulsões

#### 2.3.1. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o índice de polidispersão (PDI) (Liang et al., 2012) das nanoemulsões foram analisados por espalhamento de luz dinâmico (DLS). O potencial zeta (PZ) foi medido por mobilidade eletroforética. As análises foram realizadas por meio do equipamento Zetasizer Nano Series ZEN3690 (Malvern Instruments®, Reino Unido) em cubetas de poliestireno com ângulo de detecção de 90 graus, a 25°C e tempo de equilíbrio de 60 segundos. Para tanto, as nanoformulações foram diluídas 20 vezes em água Milli-Q. Os resultados de DH foram apresentados em nanômetros (nm) e os do PZ em milivolts (mV). As medidas foram realizadas ao longo de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias a partir do dia de preparo das nanoemulsões, com as amostras estocadas a 4 e a 25°C, para o estudo de estabilidade.

#### 2.3.2. Potencial hidrogeniônico

Para a aferição do potencial hidrogeniônico (pH), as amostras foram diluídas 10 vezes e a leitura realizada em triplicata a 25°C (Đorđević et al., 2013). As aferições foram realizadas ao longo de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias a partir do dia de preparo das nanoemulsões, para o estudo de estabilidade.

#### 2.3.3. Fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais foi realizada pelo ensaio colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* (Singleton & Rossi, 1965), com leitura da absorbância feita em comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram apresentados em microgramas de ácido gálico equivalente/mL de nanoemulsão ( $\mu\text{g AGE/mL}$ ). As dosagens foram realizadas durante 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias para o estudo de estabilidade.

#### 2.3.4. Estabilidade à força centrífuga

O teste de centrifugação foi realizado nas velocidades de rotação de 1.000, 2.500, 3.500 e 7.000 rpm, por 15 minutos a 25°C, utilizando-se uma Ultra centrífuga

(modelo Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Alemanha). Cada nanoemulsão foi distribuída em três microtubos com capacidade de 2 mL, que foram alocados na centrífuga e avaliados quanto à separação ou não de fases e cremação (Santos, 2015). Esse procedimento foi realizado durante 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias para o estudo de estabilidade.

#### 2.3.5. Estresse térmico

O ensaio de estabilidade acelerada foi realizado a partir do estresse térmico das nanoemulsões, no qual as amostras foram submetidas a ciclos de resfriamento a 4°C em geladeira (modelo RFCT 451, *frost free*, BSH Continental®, Brasil) por 24 horas, seguido de aquecimento da mesma amostra a 37°C por 24 horas em estufa (modelo DL-SE, De Leo Equipamentos, Brasil). Cada resfriamento e aquecimento totalizava um ciclo. Após o término de cada ciclo, foi realizada a leitura do DH, PDI e Zt. Cada amostra foi submetida a cinco ciclos (Bali, Ali, & Ali, 2010).

#### 2.4. Atividade antioxidante *in vitro*: capacidade do sequestro de radicais DPPH•

Para avaliar a atividade antioxidante pelo % de inibição de DPPH• 125 µM *in vitro*, foram realizadas cinco diluições das amostras (nanoemulsões e extratos livres) de polpas (D1: 250, D2: 500, D3: 1.000, D4: 2.000 e D5: 4.000 µg/mL, em que D = diluição) e cinco diluições das amostras de sementes (D1: 37,5, D2: 75, D3: 150, D4: 300 e D5: 600 µg/mL), a fim de verificar em qual delas era melhor visualizar diferenças da atividade antioxidante entre as nanoemulsões e seus extratos livres correspondentes. A reação entre as amostras e o DPPH• foi organizada de modo que a concentração final do DPPH• ficasse em 125 µM em todas as diluições avaliadas. As amostras na reação foram incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 60 min. Em seguida, 50 µL das amostras foram inseridos em capilares de vidro, selados com critoseal e congelados em nitrogênio líquido, permanecendo nesta condição até o momento da medição. Foi utilizada a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) para a detecção dos sinais de DPPH•. As medições EPR foram realizadas com um espectrômetro Bruker EMX plus EPR, com banda X, usando um ressonador de alta sensibilidade 4119HS, sob modulação de 10 G para melhorar a relação sinal/ruído, largura de varredura de 100 G e potência de microondas de 20 mW. Foram realizadas 10 varreduras de 10 segundos cada, com as amostras sob temperatura controlada de 25°C. A amplitude EPR usada foi a integral dupla do sinal detectado. Os resultados

foram apresentados em % de inibição (% I) de DPPH•, calculados a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ inibição DPPH} = \frac{(\text{integral dupla controle DPPH} - \text{integral dupla amostra})}{\text{integral dupla\_DPPH}} \times 100$$

## 2.5. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das nanoemulsões foi realizada pelo ensaio de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo NCCLS traduzido pela (ANVISA, 2003), com modificações descritas a seguir. As culturas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC® 25922™ (Gram negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ (Gram positiva) foram utilizadas para o ensaio de atividade antimicrobiana devido à sua patogenicidade.

### 2.5.1. Concentração inibitória mínima

As culturas foram cultivadas em caldo Müller Hinton (MH) a 37°C por 12 horas e padronizadas para 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, de modo que a concentração final de inóculo em cada poço da microplaca fosse 10<sup>3</sup> UFC/mL. Como controles positivos foram utilizados os solventes em que os extratos foram ressuspensos e o branco das nanoemulsões, para assegurar a ausência de efeitos desses materiais sobre a atividade antimicrobiana. Como controles negativos, foi utilizada ampicilina para os ensaios com *E. coli* e cloranfenicol para os ensaios com *S. aureus*. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizada em microplacas de poliestireno de 96 poços (Kasvi, Paraná, Brasil). NEPA, NEPS, NESA e NESS e seus respectivos extratos livres foram analisadas quanto à CIM. Utilizou-se caldo MH como meio de cultura dos ensaios e as amostras foram avaliadas em concentrações que variaram de 125 a 8.000 µg/mL. Os ensaios foram realizados com leituras da densidade óptica (DO) em comprimento de onda de 630 nm, em triplicata, a cada 20 minutos, a 37°C, em espectrofotômetro Spectramax M2 (Molecular devices, California, USA) nas primeiras 12 horas de experimento. Uma última leitura foi realizada com 24 horas de incubação para completar o tempo do experimento. A CIM foi declarada como sendo a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento do microrganismo, em todas as replicatas, após 24 horas de incubação.

### 2.5.2. Concentração bactericida mínima

Os poços que apresentaram diferenças  $\leq 0,05$  na DO lida entre os tempos 0 e 24 horas foram selecionados para realização dos ensaios de atividade antibactericida.

O conteúdo dos poços que inibiu os microrganismos foi misturado com o dobro de caldo MH para lavar os inóculos e remover os extratos. A mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido ao mesmo procedimento por mais uma vez. Ao final, o *pellet* foi reinoculado em 250  $\mu$ L de caldo MH por 24 horas, para verificar a existência de crescimento. A concentração bactericida mínima foi declarada como sendo a menor concentração da amostra avaliada capaz de inibir o crescimento do microrganismo após eliminação do extrato.

### 2.6. Delineamento experimental e análise estatística

Tratou-se de um ensaio inteiramente casualizado, proveniente do esquema fatorial 2 x 2 x 2 x 6, arranjos em duas partes da planta (polpas e sementes), duas espécies (*P. alata* e *P. setacea*), duas temperaturas de armazenamento (4 e 25°C) e 6 tempos de armazenamento (1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, três repetições. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos à Análise de variância (Anova), seguida do Teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa estatístico Assistat 7.7 (Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil).

## 3. Resultados e discussão

Compostos bioativos obtidos de produtos naturais podem ser preservados e melhorar suas atividades biológicas quando estruturados como nanoemulsões. Nesse contexto, extratos brutos, com compostos bioativos, de polpas e sementes de passifloras silvestres, nativas do Cerrado, foram nanoemulsificados. A caracterização e avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana das nanoemulsões de polpa de *P. alata* (NEPA), polpa de *P. setacea* (NEPS), semente de *P. alata* (NESA) e semente de *P. setacea* (NESS) foram realizadas e os resultados estão descritos a seguir.

### 3.1. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

Na Tabela 1 estão apresentadas as características físicas (diâmetro hidrodinâmico – DH –, índice de polidispersão – PDI –, e potencial zeta – PZ) das

nanoemulsões, armazenadas a 4 e a 25°C, analisadas após 24 horas de formuladas. Observa-se que todas apresentaram o DH inferior a 30 nm e PDI abaixo de 0,2. Com base nesses resultados, é possível afirmar que as nanoemulsões possuem características favoráveis à estabilidade, com tamanho pequeno da gotícula (<200 nm) e baixo PDI (<0,2), indicando gotículas estáveis e monodispersas, com baixa suscetibilidade à coalescência (O'Hanlon et al., 2012). Possivelmente, esta ocorrência se deu pela maior proporção de tensoativo (Solutol® HS15) na formulação, que contribuiu para reduzir o DH das nanogotículas e favorecer a monodispersão indicada pelo baixo PDI, pois altas concentrações de tensoativo na fase contínua reduzem a tensão superficial e aumentam a estabilidade das gotículas com tamanhos menores (Fryd & Mason, 2012). Além disso, métodos de baixa energia, como o PIT, que formulam nanoemulsões, também são responsáveis pela obtenção de gotículas com tamanho pequeno e PDI baixo (McClements, 2012).

**Tabela 1.** Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4 e a 25°C durante 90 dias

Amostra	Tempo de armazenamento (dias)	Temperatura de armazenamento	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
Nanoemulsão de sementes de <i>P. alata</i>	1	4°C	27,5 ± 0,4 <sup>aABC</sup>	0,151 ± 0,01 <sup>aABCD</sup>	-1,6 ± 0,4 <sup>aCDE</sup>
	1	25°C	26,9 ± 0,5 <sup>aABC</sup>	0,139 ± 0,01 <sup>aBCD</sup>	-1,7 ± 0,6 <sup>aBCDE</sup>
	7	4°C	28,1 ± 1,2 <sup>aABC</sup>	0,158 ± 0,02 <sup>aABC</sup>	-1,6 ± 0,3 <sup>aDE</sup>
	7	25°C	27,1 ± 0,4 <sup>aBC</sup>	0,128 ± 0,01 <sup>aCD</sup>	-1,4 ± 0,3 <sup>bE</sup>
	15	4°C	27,6 ± 1,1 <sup>aABC</sup>	0,161 ± 0,02 <sup>aABC</sup>	-1,5 ± 0,3 <sup>abDE</sup>
	15	25°C	27,2 ± 0,2 <sup>abABC</sup>	0,151 ± 0,02 <sup>bABCD</sup>	-2,1 ± 0,3 <sup>aBC</sup>
	30	4°C	28,3 ± 0,8 <sup>aAB</sup>	0,164 ± 0,02 <sup>aAB</sup>	-1,8 ± 0,4 <sup>bBCDE</sup>
	30	25°C	26,9 ± 0,4 <sup>aC</sup>	0,118 ± 0,01 <sup>aD</sup>	-1,7 ± 0,4 <sup>aBCDE</sup>
	60	4°C	27,4 ± 0,6 <sup>bABC</sup>	0,137 ± 0,02 <sup>cBCD</sup>	-1,3 ± 0,3 <sup>abE</sup>
	60	25°C	27,2 ± 0,3 <sup>aBC</sup>	0,121 ± 0,01 <sup>aD</sup>	-2,2 ± 0,5 <sup>aB</sup>
	90	4°C	28,6 ± 0,5 <sup>cA</sup>	0,176 ± 0,02 <sup>cA</sup>	-3,7 ± 0,9 <sup>aA</sup>
	90	25°C	27,1 ± 1,0 <sup>aBC</sup>	0,134 ± 0,01 <sup>aBCD</sup>	-2,0 ± 0,3 <sup>bBCD</sup>
Nanoemulsão de sementes de <i>P. setacea</i>	1	4°C	27,4 ± 0,5 <sup>aA</sup>	0,152 ± 0,02 <sup>aB</sup>	-1,5 ± 0,4 <sup>aDE</sup>
	1	25°C	27,2 ± 0,6 <sup>aA</sup>	0,140 ± 0,02 <sup>aB</sup>	-1,6 ± 0,4 <sup>aDE</sup>
	7	4°C	27,2 ± 0,4 <sup>aA</sup>	0,144 ± 0,02 <sup>aB</sup>	-1,8 ± 0,3 <sup>aCDE</sup>
	7	25°C	27,6 ± 0,3 <sup>aA</sup>	0,149 ± 0,02 <sup>aB</sup>	-1,9 ± 0,4 <sup>aBCD</sup>
	15	4°C	27,0 ± 0,5 <sup>abA</sup>	0,146 ± 0,03 <sup>aB</sup>	-1,7 ± 0,4 <sup>aCDE</sup>

Amostra	Tempo de armazenamento (dias)	Temperatura de armazenamento	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
Nanoemulsão de polpas de <i>P. alata</i>	15	25°C	27,5 ± 0,8 <sup>aA</sup>	0,196 ± 0,02 <sup>aA</sup>	-2,2 ± 0,3 <sup>aABC</sup>
	30	4°C	27,1 ± 0,5 <sup>bA</sup>	0,141 ± 0,03 <sup>aB</sup>	-1,7 ± 0,4 <sup>bDE</sup>
	30	25°C	27,1 ± 0,4 <sup>aA</sup>	0,137 ± 0,02 <sup>aB</sup>	-1,9 ± 0,4 <sup>aBCDE</sup>
	60	4°C	26,9 ± 0,4 <sup>bA</sup>	0,127 ± 0,02 <sup>cB</sup>	-1,4 ± 0,3 <sup>abE</sup>
	60	25°C	27,2 ± 0,4 <sup>aA</sup>	0,136 ± 0,03 <sup>aB</sup>	-1,9 ± 0,4 <sup>aBCDE</sup>
	90	4°C	27,7 ± 0,6 <sup>cA</sup>	0,157 ± 0,03 <sup>cB</sup>	-2,3 ± 0,4 <sup>bAB</sup>
	90	25°C	27,6 ± 0,5 <sup>aA</sup>	0,152 ± 0,03 <sup>aB</sup>	-2,6 ± 0,5 <sup>aA</sup>
	1	4°C	26,0 ± 0,5 <sup>bB</sup>	0,057 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-0,6 ± 0,1 <sup>bE</sup>
	1	25°C	25,8 ± 0,2 <sup>bB</sup>	0,046 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-0,8 ± 0,2 <sup>bDE</sup>
	7	4°C	25,8 ± 0,5 <sup>bB</sup>	0,051 ± 0,02 <sup>bC</sup>	-0,3 ± 0,1 <sup>bE</sup>
	7	25°C	25,8 ± 0,5 <sup>bB</sup>	0,068 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-0,5 ± 0,1 <sup>cE</sup>
	15	4°C	26,3 ± 0,4 <sup>bB</sup>	0,063 ± 0,00 <sup>bC</sup>	-1,4 ± 0,2 <sup>bC</sup>
	15	25°C	26,2 ± 0,4 <sup>bcB</sup>	0,057 ± 0,01 <sup>cC</sup>	-1,4 ± 0,3 <sup>bC</sup>
	30	4°C	26,8 ± 0,3 <sup>bcB</sup>	0,073 ± 0,00 <sup>bC</sup>	-2,3 ± 0,4 <sup>aA</sup>
30	25°C	26,2 ± 0,4 <sup>aB</sup>	0,065 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-2,0 ± 0,4 <sup>aAB</sup>	
60	4°C	29,0 ± 1,4 <sup>aA</sup>	0,202 ± 0,04 <sup>bB</sup>	-1,7 ± 0,3 <sup>aBC</sup>	
60	25°C	26,0 ± 0,5 <sup>bB</sup>	0,050 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-1,4 ± 0,3 <sup>bC</sup>	
90	4°C	29,9 ± 1,8 <sup>bA</sup>	0,269 ± 0,047 <sup>bA</sup>	-1,7 ± 0,4 <sup>cBC</sup>	

Amostra	Tempo de armazenamento (dias)	Temperatura de armazenamento	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
Nanoemulsão de polpas de <i>P. setacea</i>	90	25°C	25,9 ± 0,4 <sup>bB</sup>	0,060 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-1,2 ± 0,2 <sup>cCD</sup>
	1	4°C	25,7 ± 0,1 <sup>bC</sup>	0,061 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-0,7 ± 0,1 <sup>bB</sup>
	1	25°C	25,6 ± 0,2 <sup>bC</sup>	0,057 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-0,6 ± 0,1 <sup>bB</sup>
	7	4°C	25,7 ± 0,2 <sup>bC</sup>	0,044 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-0,6 ± 0,1 <sup>bB</sup>
	7	25°C	25,7 ± 0,5 <sup>bC</sup>	0,063 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-0,3 ± 0,1 <sup>cB</sup>
	15	4°C	26,0 ± 0,3 <sup>bC</sup>	0,062 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-0,3 ± 0,1 <sup>cB</sup>
	15	25°C	25,8 ± 0,2 <sup>cC</sup>	0,052 ± 0,01 <sup>cBC</sup>	-0,4 ± 0,1 <sup>cB</sup>
	30	4°C	25,9 ± 0,3 <sup>cC</sup>	0,072 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-0,5 ± 0,1 <sup>cB</sup>
	30	25°C	26,1 ± 0,4 <sup>aC</sup>	0,078 ± 0,01 <sup>bB</sup>	-0,8 ± 0,1 <sup>bB</sup>
	60	4°C	29,8 ± 3,4 <sup>aB</sup>	0,317 ± 0,04 <sup>aA</sup>	-1,3 ± 0,2 <sup>bA</sup>
	60	25°C	25,9 ± 0,5 <sup>bC</sup>	0,062 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-1,3 ± 0,2 <sup>bA</sup>
	90	4°C	32,0 ± 2,8 <sup>aA</sup>	0,312 ± 0,07 <sup>aA</sup>	-1,4 ± 0,3 <sup>cA</sup>
	90	25°C	25,7 ± 0,4 <sup>bC</sup>	0,045 ± 0,01 <sup>bBC</sup>	-0,5 ± 0,1 <sup>dB</sup>

Valores são apresentados como média ± desvio-padrão (n=3). Para a mesma amostra, em todas as temperaturas e tempos de armazenamento, na mesma coluna, médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ). Entre todas as amostras, com a mesma temperatura e tempo de armazenamento, na mesma coluna, médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O PZ de todas as nanoemulsões do presente estudo apresentou uma carga levemente negativa, que variou de -0,6 a -0,8 mV para as nanoemulsões de polpas e de -1.5 a -1.9 mV para as nanoemulsões das sementes, sem haver diferenças estatísticas significativas ( $p>0.05$ ) entre as mesmas partes da planta de ambas as espécies. Diversos fatores como fonte das partículas, tipo de surfactante, concentração de eletrólitos, morfologia da partícula, pH e estado de hidratação do nanossistema influenciam na carga do PZ (Silva, Cerqueira, & Vicente, 2012). A ocorrência do PZ levemente negativo das amostras do presente estudo pode ser atribuída ao fato do surfactante Solutol® HS15 e da fase oleosa castor oil serem não iônicos, o que acaba agregando pouca carga elétrica ao meio. Neste caso, como o PZ é próximo ao neutro, a estabilização da formulação ocorre principalmente pela camada de solvatação, visto que os tensoativos usados possuem grande afinidade com a água (Liu, Bi, Xiao, & McClements, 2016).

As nanoemulsões também foram analisadas ao longo do tempo, em 7, 15, 30, 60 e 90 dias, para verificar a estabilidade de suas características físicas e químicas. Na mesma Tabela 1 são apresentados os resultados de estabilidade das características físicas das nanoemulsões avaliadas ao longo do tempo, acondicionadas a 4 e a 25°C. O DH da NESA permaneceu estável ao armazenamento a 4 e 25°C ao longo dos 90 dias ( $p>0,05$ ), exceto no dia 90 para a amostra armazenada a 4°C, que teve o tamanho aumentado ( $p<0,05$ ) e para o dia 30 a 25°C, que teve o tamanho reduzido ( $p<0,05$ ). O DH da NESS se manteve estável ao longo de todo o período analisado para ambas as temperaturas.

A partir de 60 dias de armazenamento a 4°C, o DH das NEPA e NEPS aumentou levemente ( $p<0,05$ ); mesmo assim os tamanhos das gotículas ainda permaneceram pequenos até os 90 dias: 29.9 nm para NEPA e 32.0 nm para NEPS. Por outro lado, quando armazenadas a 25°C, o DH das nanoemulsões de polpas ficou estável durante os 90 dias ( $p>0,05$ ). Outras nanoemulsões, formuladas com surfactantes não iônicos, à base de óleo de semente de *P. edulis* e óleo essencial de lavanda (Rocha-Filho, Camargo, Ferrari, & Maruno, 2014), ou de óleos essenciais extraídos de *Ocimum basilicum* L. (Ghosh, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2013), ou de extrato Crajiru (*Arrabidaea chica*) (Rodrigues et al., 2015) foram comparáveis às nanoemulsões do presente estudo, tanto em relação ao DH quanto à estabilidade a diferentes temperaturas, indicando que as temperaturas avaliadas não prejudicam a estabilidade das nanoemulsões.

No entanto, essas variações do tamanho das gotículas durante os 90 dias não são consideradas um problema de estabilidade, por se tratar de um aumento pequeno e pontual, podendo ser atribuído, inclusive, a erro experimental.

Quanto ao PDI das nanoemulsões de sementes, houve estabilidade ao longo dos 90 dias em ambas as temperaturas. Apenas no armazenamento por 15 dias a 25°C o PDI aumentou (0,196), mas ainda assim se manteve abaixo de 0.2. Para as nanoemulsões de polpas, a partir de 60 dias de armazenamento a 4°C, o PDI aumentou para mais que o dobro do que havia sido medido até então. Porém, nas amostras armazenadas a 25°C, o PDI se manteve estável e abaixo de 0,08, o que é considerado muito positivo, pois indica monodispersão das gotículas.

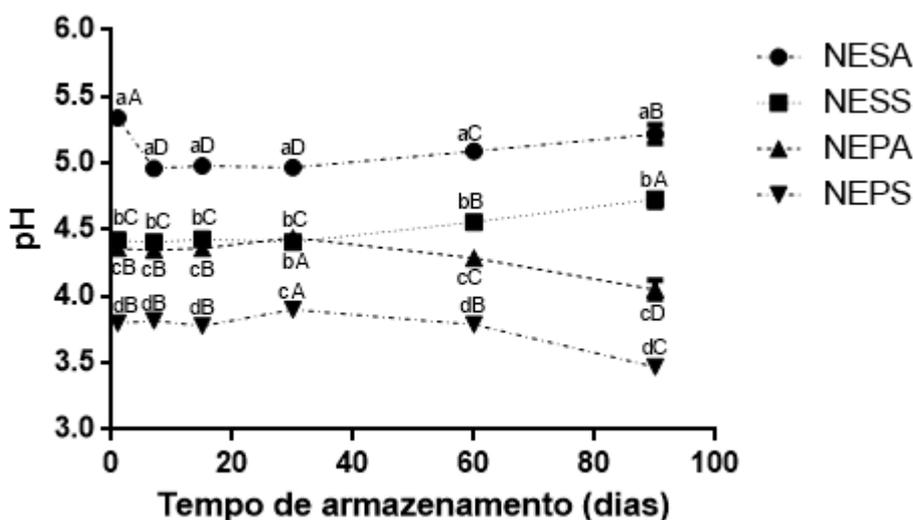
O PZ das nanoemulsões de sementes se manteve estável até os 60 dias de armazenamento a 4°C (-1,5 a -1,8 mV), porém foi com 90 dias que ele se distanciou levemente do zero (-3,7 mV para NESA e -2,3 mV para NESS). Na NEPA, o maior PZ ocorreu aos 30 dias de armazenamento em ambas as temperaturas (-2,0 a -2,3 mV). Nos primeiros 7 dias, os valores do PZ ficaram mais próximos ao 0 (-0,6 a -0,8 mV). A única diferença estatística observada para o PZ da NEPS foi no ponto 60 dias em ambas as temperaturas, em que o PZ foi -1,3. As demais medidas obtidas ao longo do teste de estabilidade não apresentaram diferenças estatísticas entre si, inclusive entre as temperaturas, e os valores ficaram entre -0,3 e -0,8. Durante todo o estudo de estabilidade, o PZ se apresentou levemente negativo. Embora o PZ que se encontra na faixa de 0 a  $\pm 30$  mV indique instabilidade do nanossistema, a partir de um conjunto de avaliações é que se deve garantir o comportamento da amostra em estudo.

Por fim, ao definir-se a forma de armazenamento de nanoemulsões, deve-se levar em consideração critérios importantes, tais como identificar a sensibilidade dos compostos nanoemulsificados, aplicabilidade da nanoemulsão, bem como o ponto de solidificação do sistema e também do perfil lipídico da fase oleosa e dos tensoativos (Silva et al., 2012).

### 3.2. Potencial hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico (pH) das nanoemulsões, avaliado ao longo dos 90 dias do teste de estabilidade está apresentado na Figura 1. A NESA apresentou o pH mais alto (5,3), 1,4 vez maior do que a NEPS (3,8), que foi a amostra com o pH mais baixo. Considerando o estudo de Tang et al. (2012), em que foi observado que quanto

maior o pH, maior o PZ no sentido da carga negativa, os baixos valores de pH encontrados no presente estudo também podem contribuir para explicar a carga levemente negativa das nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*.



**Figura 1.** Potencial hidrogeniônico (pH), durante 90 dias, de nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4°C

Valores são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3). Para a mesma amostra, ao longo do tempo, médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ). Entre todas as amostras, no mesmo tempo de armazenamento, médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

NEPA: nanoemulsão de polpa de *P. alata*. NESA: nanoemulsão de semente de *P. alata*. NEPS: nanoemulsão de polpa de *P. setacea*. NESS: nanoemulsão de semente de *P. setacea*.

O pH da NESA se manteve igual entre o 7º (5,0) e o 30º (5,0) dias de estabilidade, com o valor variando de 5,0 a 5,3 nos demais dias. O pH mais alto foi aferido no dia 1 (5,3) e isso pode ser atribuído à alta temperatura atingida no método de inversão de fases (70°C), evidenciando a necessidade de um tempo para o sistema da nanoformulação se estabilizar. Durante os 30 primeiros dias, a NESS apresentou pH mais baixo (4,4). A partir do 60º dia, ele aumentou, encerrando o estudo de estabilidade aos 90 dias, com o valor de pH mais alto do período (4,7).

O pH da NEPA se manteve estável nos 15 primeiros dias de estabilidade (4,4) e terminou o estudo de estabilidade com o pH mais baixo do período (4,1). O mesmo comportamento ocorreu com a NEPS, que apresentou um pH de 3,8 no 1º dia e de 3,5 no último.

A aferição do pH ao longo do tempo de estocagem consiste num método importante para verificar a estabilidade e a qualidade da formulação, pois alterações

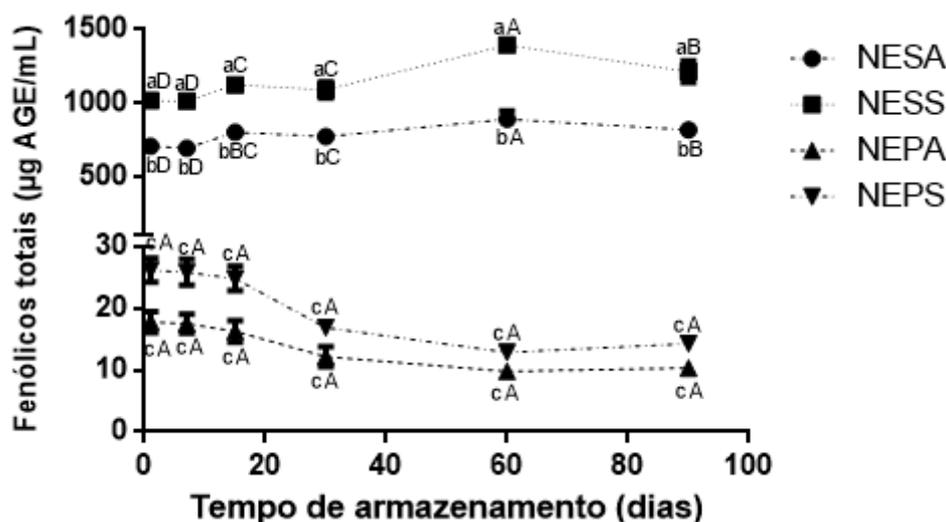
no pH podem indicar a presença de ácidos graxos livres provenientes da hidrólise de ácidos graxos dos tensoativos e dos triglicerídeos da formulação, bem como o crescimento de microrganismos (Bruxel et al., 2012).

### 3.3. Fenólicos totais

Uma das principais aplicabilidades das nanoemulsões é a incorporação de compostos instáveis, lipofílicos ou altamente degradáveis, aumentando sua biodisponibilidade e tempo de conservação (Silva et al., 2012). Os fenólicos totais foram analisados nas nanoemulsões ao longo do tempo como um marcador da composição química dos extratos nanoemulsificados (Figura 2). A concentração de fenólicos totais na NESS foi mais de 35 vezes maior do que nas nanoemulsões de polpas (17.8 – 26.2  $\mu\text{g AGE/mL}$ ) e quase 1,5 vez maior do que na NESA, comprovando-se que as sementes de frutos apresentam maior teor de compostos fenólicos do que as polpas. Isso pode ser atribuído a fatores como clima, estágio de maturação do fruto, tamanho da planta e variedade do fruto (Yilmaz et al., 2015).

No estudo de estabilidade, as nanoemulsões de polpas não apresentaram diferenças significativas de fenólicos totais ao longo do tempo e nem entre si. Já nas nanoemulsões de sementes houve um aumento no teor de fenólicos totais a partir do 15º dia (NESA – 803,7  $\mu\text{g AGE/mL}$ ; NESS – 1.125,0  $\mu\text{g AGE/mL}$ ) do teste de estabilidade, indo até o 60º dia (NESA – 892,3  $\mu\text{g AGE/mL}$ ; NESS – 1.395,1  $\mu\text{g AGE/mL}$ ). Ocorrência similar aconteceu no estudo de vida de prateleira de geleia de morango (Pineli, Moretti, Chiarello, & Melo, 2015), no qual a concentração de fenólicos totais aumentou ao longo do tempo. Os autores sugeriram que a quebra de monômeros de compostos fenólicos poliméricos durante o período de armazenamento da geleia, levou a um aumento dos valores de fenólicos totais dosados pela técnica de Folin-Ciocalteu, fator que pode explicar o aparente aumento no teor de fenólicos totais durante o período de estocagem do produto.

Considerando que no tempo 90 dias é possível aceitar uma degradação de até 10% do composto incorporado na nanoformulação, é possível considerar que as nanoemulsões tanto das polpas quanto das sementes das passifloras silvestres avaliadas, são estáveis.



**Figura 2.** Fenólicos totais, durante 90 dias, de nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* armazenadas a 4°C

Valores são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3). Para a mesma amostra, ao longo do tempo, médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ). Entre todas as amostras, no mesmo tempo de armazenamento, médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

NEPA: nanoemulsão de polpa de *P. alata*. NESA: nanoemulsão de semente de *P. alata*. NEPS: nanoemulsão de polpa de *P. setacea*. NESS: nanoemulsão de semente de *P. setacea*.

### 3.4. Estabilidade à força centrífuga

De acordo com os resultados da estabilidade à força centrífuga das nanoemulsões (dados não apresentados em tabelas ou figuras), durante todo o tempo de avaliação da estabilidade as nanoemulsões de sementes se mantiveram estáveis em todas as velocidades de rotação. A baixa suscetibilidade à sedimentação e cremeação pode ser atribuída principalmente ao diâmetro das gotículas, uma vez que o tamanho reduzido mantém o sistema monodisperso (Solans, Izquierdo, Nolla, Azemar, & Garcia-Celma, 2005). Já as nanoemulsões de polpas indicaram instabilidade à força centrífuga para as velocidades de rotação de 3.500 e 7.000 rpm, em 60 dias de armazenamento; e em todas as velocidades de rotação testadas em 90 dias de armazenamento, levando a uma sedimentação e leve cremeação das nanoemulsões. A coalescência das nanogotículas oleosas pode ocorrer devido à tensão superficial e às atrações intermoleculares (Mishra, Soni, & Mishra, 2014).

### 3.5. Estresse térmico

O teste de estabilidade ao estresse térmico, realizado através de ciclos de variação de temperatura, é capaz de indicar estabilidade das nanoemulsões diante de severas alterações de temperaturas ao longo do tempo. Os resultados dispostos na Tabela 2, indicam que a NESA não apresentou sinais de coalescência durante todos os ciclos de estresse térmico. As demais amostras se mostraram mais susceptíveis à coalescência. A NESS começou com o DH de 26,0 nm no primeiro ciclo e finalizou o quinto ciclo a 37°C com 29,7 nm. A partir do segundo ciclo de estresse térmico, o DH da NEPA aumentou (27,0 nm), mas se manteve estável até o final. Comportamento semelhante foi observado para a NEPA a partir do terceiro ciclo, que teve seu tamanho aumentado de 26,8 nm para 27,4 nm, em função das severas oscilações de temperatura.

A progressão do tamanho pode ser explicada pelo aumento da energia cinética causada pelo aquecimento, que é capaz de diminuir a tensão superficial entre os tensoativos, facilitando sua aglomeração (Rao & McClements, 2011). Ainda assim, todas as nanoemulsões mantiveram os seus DH ainda baixos, com valores abaixo de 30 nm. Mesmo com essas leves oscilações do DH das amostras, os PDI de todas elas se mantiveram abaixo de 0,2 ao longo dos cinco ciclos de estresse térmico e sofreram baixas variações nesse período. Em relação às cargas das nanoemulsões, descritas pelo PZ, verificou-se uma oscilação ao longo de todos os ciclos, para todas as amostras, o que demonstrou uma interferência direta da temperatura sobre a atração ou repulsão eletrostática das nanoemulsões.

Nanoemulsões com óleo de maracujá e óleo de lavanda se mantiveram estáveis ao estresse térmico (Rocha- Filho et al., 2014) e nanoemulsões de vitamina D tiveram o seu DH alterado com o aquecimento do estresse térmico, indicando que pode ter sido influência do uso de surfactantes não iônicos, já que sua porção hidrofílica pode contribuir para uma desidratação e alterar a solubilidade do sistema (Guttoff, Saberi, & McClements, 2015).

**Tabela 2.** Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*, do teste de estabilidade acelerada, estresse térmico, nas temperaturas de 4 e 37°C, totalizando 5 ciclos

Amostra	Ciclo	Temperatura	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (pdi)	Potencial zeta (mV)
Nanoemulsão de sementes de <i>P. alata</i>	1	4°C	28,0 ± 0,9 <sup>aA</sup>	0,171 ± 0,02 <sup>aA</sup>	-1,4 ± 0,3 <sup>aDE</sup>
	1	37°C	28,2 ± 0,8 <sup>aA</sup>	0,148 ± 0,02 <sup>aBC</sup>	-1,6 ± 0,2 <sup>aCD</sup>
	2	4°C	28,2 ± 1,0 <sup>aA</sup>	0,161 ± 0,03 <sup>aABC</sup>	-1,9 ± 0,5 <sup>aBC</sup>
	2	37°C	28,5 ± 0,9 <sup>aA</sup>	0,168 ± 0,04 <sup>aABC</sup>	-2,1 ± 0,4 <sup>abB</sup>
	3	4°C	28,6 ± 1,2 <sup>aA</sup>	0,158 ± 0,02 <sup>aABC</sup>	-1,5 ± 0,3 <sup>aDE</sup>
	3	37°C	28,3 ± 0,6 <sup>aA</sup>	0,168 ± 0,01 <sup>aABC</sup>	-2,6 ± 0,2 <sup>aA</sup>
	4	4°C	28,3 ± 0,7 <sup>bA</sup>	0,169 ± 0,01 <sup>aAB</sup>	-1,4 ± 0,1 <sup>bDE</sup>
	4	37°C	28,4 ± 0,7 <sup>bA</sup>	0,153 ± 0,02 <sup>aABC</sup>	-1,4 ± 0,2 <sup>aDE</sup>
	5	4°C	28,6 ± 0,7 <sup>aA</sup>	0,146 ± 0,02 <sup>aC</sup>	-1,2 ± 0,2 <sup>bE</sup>
	5	37°C	28,8 ± 0,8 <sup>bA</sup>	0,151 ± 0,02 <sup>aABC</sup>	-1,4 ± 0,2 <sup>bDE</sup>
Nanoemulsão de sementes de <i>P. setacea</i>	1	4°C	26,6 ± 0,2 <sup>bE</sup>	0,128 ± 0,03 <sup>bA</sup>	-1,3 ± 0,3 <sup>aD</sup>
	1	37°C	28,3 ± 0,3 <sup>aD</sup>	0,104 ± 0,02 <sup>bBC</sup>	-1,5 ± 0,4 <sup>aCD</sup>
	2	4°C	28,3 ± 0,1 <sup>aCD</sup>	0,120 ± 0,02 <sup>bABC</sup>	-1,6 ± 0,2 <sup>aCD</sup>
	2	37°C	28,6 ± 0,2 <sup>aBCD</sup>	0,115 ± 0,02 <sup>bABC</sup>	-2,1 ± 0,5 <sup>aB</sup>
	3	4°C	28,8 ± 0,1 <sup>aBCD</sup>	0,120 ± 0,01 <sup>bABC</sup>	-1,7 ± 0,4 <sup>aC</sup>
	3	37°C	28,8 ± 0,2 <sup>aABCD</sup>	0,124 ± 0,01 <sup>bAB</sup>	-2,6 ± 0,2 <sup>aA</sup>
	4	4°C	29,2 ± 0,1 <sup>aABCD</sup>	0,130 ± 0,01 <sup>bA</sup>	-2,2 ± 0,2 <sup>aB</sup>

Amostra	Ciclo	Temperatura	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (pdi)	Potencial zeta (mV)
	4	37°C	29,4 ± 0,3 <sup>aAB</sup>	0,112 ± 0,02 <sup>bABC</sup>	-1,5 ± 0,2 <sup>aCD</sup>
	5	4°C	29,2 ± 0,3 <sup>aABC</sup>	0,098 ± 0,01 <sup>bC</sup>	-1,6 ± 0,1 <sup>aCD</sup>
	5	37°C	29,7 ± 0,3 <sup>aA</sup>	0,133 ± 0,02 <sup>aA</sup>	-2,3 ± 0,3 <sup>aB</sup>
Nanoemulsão de polpas de <i>P. alata</i>	1	4°C	26,0 ± 0,5 <sup>bcB</sup>	0,053 ± 0,01 <sup>cB</sup>	-0,6 ± 0,1 <sup>bCD</sup>
	1	37°C	26,3 ± 0,4 <sup>bAB</sup>	0,058 ± 0,01 <sup>cAB</sup>	-0,6 ± 0,1 <sup>bCDE</sup>
	2	4°C	26,7 ± 0,4 <sup>bAB</sup>	0,057 ± 0,01 <sup>cAB</sup>	-1,2 ± 0,1 <sup>bB</sup>
	2	37°C	27,0 ± 0,7 <sup>bA</sup>	0,071 ± 0,01 <sup>cAB</sup>	-1,8 ± 0,5 <sup>bA</sup>
	3	4°C	27,1 ± 1,4 <sup>bA</sup>	0,073 ± 0,02 <sup>cAB</sup>	-0,3 ± 0,1 <sup>bDE</sup>
	3	37°C	27,1 ± 0,2 <sup>bA</sup>	0,080 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-0,7 ± 0,1 <sup>bC</sup>
	4	4°C	26,5 ± 0,4 <sup>cAB</sup>	0,068 ± 0,01 <sup>cAB</sup>	-0,7 ± 0,1 <sup>cCD</sup>
	4	37°C	26,9 ± 0,3 <sup>cAB</sup>	0,070 ± 0,01 <sup>cAB</sup>	-1,5 ± 0,2 <sup>aB</sup>
	5	4°C	26,5 ± 0,2 <sup>bAB</sup>	0,063 ± 0,00 <sup>cAB</sup>	-0,8 ± 0,1 <sup>cC</sup>
	5	37°C	26,6 ± 0,3 <sup>dAB</sup>	0,068 ± 0,01 <sup>bAB</sup>	-0,3 ± 0,0 <sup>dE</sup>
Nanoemulsão de polpas de <i>P. setacea</i>	1	4°C	25,7 ± 0,1 <sup>cE</sup>	0,061 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-0,8 ± 0,1 <sup>bBC</sup>
	1	37°C	25,9 ± 0,4 <sup>bDE</sup>	0,061 ± 0,00 <sup>cA</sup>	-0,8 ± 0,1 <sup>bBCD</sup>
	2	4°C	26,4 ± 0,3 <sup>bCDE</sup>	0,068 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-0,5 ± 0,1 <sup>cCDE</sup>
	2	37°C	26,1 ± 0,2 <sup>cCDE</sup>	0,070 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-0,4 ± 0,1 <sup>cDE</sup>
	3	4°C	26,0 ± 0,1 <sup>cDE</sup>	0,062 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-0,4 ± 0,1 <sup>bCDE</sup>

Amostra	Ciclo	Temperatura	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (pdi)	Potencial zeta (mV)
	3	37°C	26,8 ± 0,5 <sup>bABCD</sup>	0,058 ± 0,00 <sup>dA</sup>	-0,9 ± 0,1 <sup>bB</sup>
	4	4°C	27,0 ± 1,1 <sup>cABC</sup>	0,069 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-0,9 ± 0,1 <sup>cB</sup>
	4	37°C	27,1 ± 0,9 <sup>cAB</sup>	0,063 ± 0,00 <sup>cA</sup>	-0,4 ± 0,1 <sup>bE</sup>
	5	4°C	27,2 ± 0,9 <sup>bAB</sup>	0,066 ± 0,01 <sup>cA</sup>	-1,3 ± 0,2 <sup>bA</sup>
	5	37°C	27,4 ± 1,1 <sup>cA</sup>	0,068 ± 0,01 <sup>bA</sup>	-0,7 ± 0,1 <sup>cBCDE</sup>

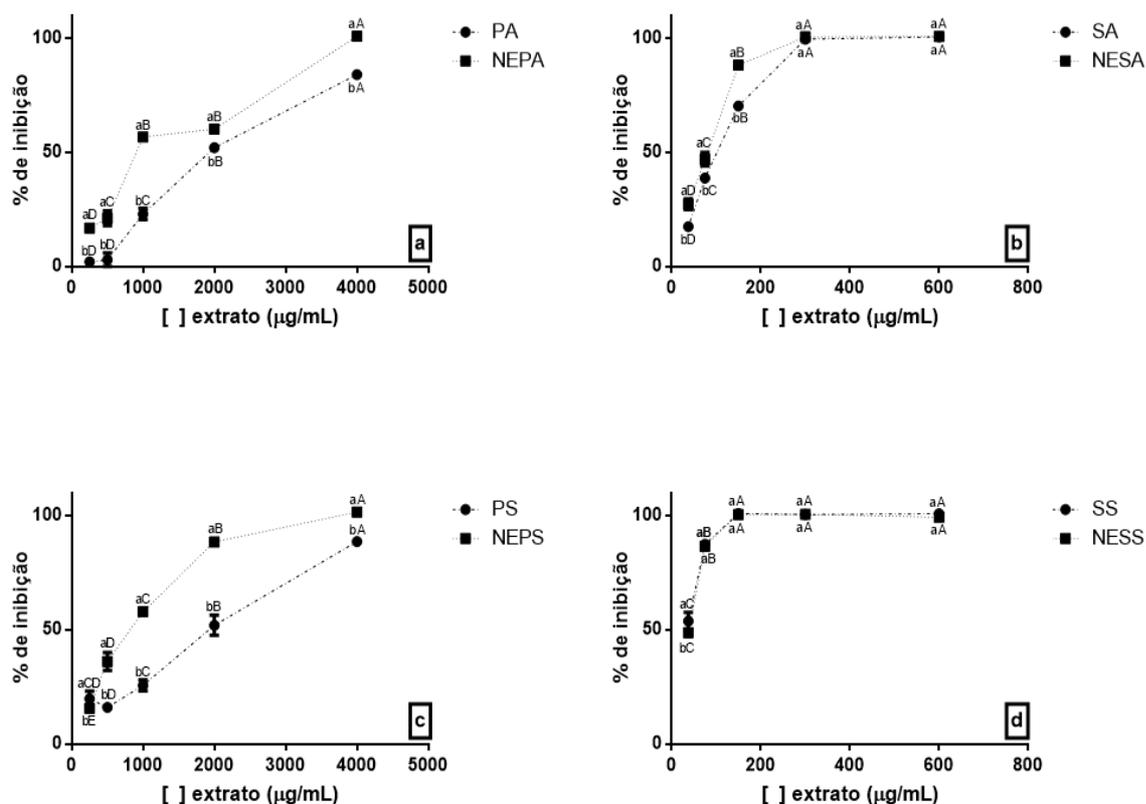
Valores são apresentados como média ± desvio-padrão (n=3). Para a mesma amostra, em todos os ciclos e temperaturas do estresse térmico, na mesma coluna, médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ). Entre todas as amostras, no mesmo ciclo e na mesma temperatura, numa mesma coluna, médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.6. Atividade antioxidante

Um ensaio de atividade antioxidante *in vitro* foi realizado para entender a influência da nanoestruturação na atividade antioxidante contra o radical DPPH•, desempenhada pelas nanoemulsões de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* em comparação aos seus extratos livres (Figura 3).

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi a técnica escolhida para realizar esse ensaio, por ser o padrão ouro na identificação de sinais de radicais livres como o DPPH•, uma vez que ele tem um comportamento paramagnético, com capacidade de gerar sinal de ressonância de spin eletrônico. A EPR, portanto, é a técnica ideal para a detecção de espécies com elétrons desemparelhados, já que as moléculas ou átomos precisam estar nessa condição para liberarem o sinal desejado (Morales, Sirijaroonwong, Yamanont, & Phisalaphong, 2015; Naik, Meda, & Lele, 2014). Sendo assim, o mesmo espectro apresentado pelo radical DPPH• 125 µM puro, também foi observado nas amostras analisadas, porém, em menores proporções, dada a reação de captura do DPPH• pelos antioxidantes presentes nas amostras (dados não mostrados em figuras). As 5 linhas EPR observadas no espectro podem ser explicadas pela interação do elétron desemparelhado com dois núcleos de nitrogênio (Krzystek, Sienkiewicz, Pardi, & Brunel, 1997).

As diluições utilizadas para avaliar a atividade antioxidante das amostras diferiram entre polpas e sementes em razão da expressiva quantidade de fenólicos totais ser aumentada nas sementes, marcador que interfere diretamente na atividade antioxidante da amostra.



**Figura 3.** Atividade antioxidante dos extratos livres e nanoemulsificados de polpas e sementes de passifloras silvestres. (a): nanoemulsão (NEPA) e extrato livre (PA) de polpa de *P. alata*. (b): nanoemulsão (NESA) e extrato livre (SA) de semente de *P. alata*. (c): nanoemulsão (NEPS) e extrato livre (PS) de polpa de *P. setacea*. (d): nanoemulsão (NESS) e extrato livre (SS) de semente de *P. setacea*

Valores são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ). Para a mesma amostra, entre as diferentes concentrações testadas, médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p<0,05$ ). Entre a nanoemulsão e seu extrato livre correspondente, na mesma concentração, médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes são significativamente diferentes de acordo com a Anova, seguida de teste de comparação de médias de Tukey ( $p<0,05$ ).

A NEPA apresentou melhor atividade antioxidante do que o seu extrato livre em todas as diluições avaliadas, porém foi a partir da diluição 1.000  $\mu\text{g/mL}$  que foi possível verificar melhor a potencialização da ação da nanoemulsão, pois o % de inibição de DPPH da NEPA-D3 dobrou em relação ao seu extrato livre. Com 500  $\mu\text{g/mL}$ , o % de inibição foi 7 vezes maior e 250  $\mu\text{g/mL}$ , 8 vezes maior do que os extratos livres de polpa de *P. alata*. Comportamento semelhante ocorreu com a NEPS, que apresentou % de inibição maior do que os seus extratos livres nas diluições correspondentes. A NEPS a 2.000  $\mu\text{g/mL}$  inibiu o mesmo (88,5%) que 4.000  $\mu\text{g/mL}$  do extrato livre. Ou seja, quando nanoemulsificado, o extrato de polpa de *P. setacea* precisa de metade da concentração para ter a mesma ação antioxidante que o seu

extrato na forma livre. A partir da diluição de 150 µg/mL, a NESA já era capaz de inibir 100% o DPPH, enquanto que o mesmo extrato na forma livre, apresentou inibição de 88,1%. Quando nanoestruturado, observou-se nas diluições 37,5 e 75 µg/mL que a capacidade antioxidante do extrato aumentou em 97 e 86%, respectivamente. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os % de inibição de DPPH da NESA e de seu extrato livre. Como a semente de *P. setacea* é um alimento rico em compostos bioativos e apresenta elevada atividade antioxidante, uma possibilidade para explicar a indiferença entre as ações antioxidantes da NESA e de seu extrato livre é o fato da concentração desse extrato ainda estar alta para conseguir visualizar a ação potencializada da nanoemulsão.

Embora as concentrações mais baixas sejam melhores para se observar as diferenças entre as ações antioxidantes das nanoemulsões e de seus extratos livres correspondentes, melhor capacidade em capturar os radicais livres de DPPH pelos antioxidantes aconteceu conforme as concentrações das amostras aumentaram.

Similarmente ao encontrado no presente estudo, pesquisas com óleo de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Lou et al., 2017), extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (Zorzi, Caregnato, Moreira, Teixeira, & Carvalho, 2016) e de *Vellozia squamata* (Quintão, Tavares, Vieira-Filho, Souza, & Santos, 2013) também verificaram o aprimoramento da capacidade antioxidante de seus compostos quando em sistemas nanoemulsificados.

Em razão da diminuição do tamanho das gotículas para a escala nanométrica e conseqüente aumento da superfície de contato, as nanoemulsões aprimoram a solubilidade de compostos lipofílicos, a biodisponibilidade, os sistemas de entrega de compostos ativos e sua liberação controlada (Lou et al., 2017; McClements & Rao, 2011; Vinardell & Mitjans, 2015). Parte dos componentes dos extratos de sementes e polpas de *P. alata* e de *P. setacea* são hidrofóbicos, o que pode diminuir a sua capacidade antioxidante. As nanoemulsões do presente estudo, portanto, favoreceram a solubilidade dos extratos, tornando a entrega dos compostos bioativos ao sítio de ação mais eficiente. Sendo assim, as nanoemulsões dos extratos das passifloras estudadas podem capturar melhor os radicais livres DPPH, potencializando a ação antioxidante dos extratos.

Dada a preservação dos compostos fenólicos totais e a melhora ou estabilidade da atividade antioxidante dos extratos de passifloras nanoemulsificados, utilizá-los como ingredientes funcionais em suplementos alimentares pode ser uma alternativa

viável. Isso contribuirá para melhorar a qualidade das fórmulas e a entrega dos compostos ao organismo. Para tanto, sugere-se que sejam realizados futuros estudos com o objetivo de avaliar a digestibilidade e a biodisponibilidade das nanoemulsões dos extratos de passifloras silvestres. Com isso, também será possível valorizar a biodiversidade do bioma Cerrado, ampliando os seus frutos no contexto da alimentação saudável e visando à minimização dos efeitos causados pelo estresse oxidativo. Por fim, a nanoemulsificação dos extratos das sementes das passifloras, ricos em compostos bioativos e com elevada atividade antioxidante, contribuirá para agregar valor a esse subproduto que na maioria das vezes é desperdiçado, mas apresenta tantos potenciais benefícios para a saúde.

Além disso, a possibilidade de substituir conservantes químicos, tal como o hidroxitolueno butilado (BHT), por extratos de compostos bioativos também é uma alternativa, uma vez que a busca dos consumidores por produtos cada vez mais nutritivos e seguros, sem aditivos sintéticos, é uma realidade. Além disso, a utilização de extratos brutos de plantas nanoestruturados pode contribuir para melhorar suas atividades biológicas devido ao sinergismo dos seus compostos bioativos (Silva, Hill, Figueiredo & Gomes, 2014).

### 3.7. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*, livres ou nanoemulsificados, foi testada contra *E. coli* e *S. aureus*, com os resultados apresentados na Tabela 3. Todos os extratos livres apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) contra ambas as bactérias, que variou de 4.000 a 8.000 µg/mL para *E. coli* e de 500 a 4.000 µg/mL para *S. aureus*, demonstrando que a ação dos extratos foi melhor contra bactérias Gram-positivas. Porém, quando na escala nanométrica, apenas a NEPS foi capaz de inibir as mesmas bactérias. Para a *E. coli*, foi necessária metade da concentração de extrato para realizar a mesma inibição e para *S. aureus*, foi necessário o dobro de extrato. Atividade bactericida foi identificada apenas para os extratos livres das sementes. Estudo que comparou a atividade antimicrobiana de timol nanomulsificado e na forma livre também identificou que a nanoemulsão prejudicou a ação antimicrobiana do composto (Li, Chang, Saenger, & Deering, 2017). O mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas há evidências de que os surfactantes possam atuar como antagonistas da atividade antimicrobiana de nanoemulsões: quanto mais alta a concentração de

tensoativo no sistema, maiores são as chances de a atividade antimicrobiana ser inibida (Li et al., 2017). Certos experimentos também sugerem que pode haver uma relação entre a resistência do microrganismo com a carga de surfactantes não iônicos (Hamouda & Baker, 2000), que é o caso do Solutol® HS15. Ademais, a fase oleosa também pode agir como uma barreira para a ação da substância. Na literatura, é possível encontrar evidência de que os lipídios atuam na redução da eficiência de compostos como timol e eugenol (Chang, McLandsborough, & McClements, 2012). Ainda no estudo de Li et al. (2017) foi sugerido que as regiões hidrofóbicas dos surfactantes podem ter afinidades diferenciadas em relação ao composto aprisionado, causando um efeito de sequestro de suas moléculas.

A escolha dos tensoativos e da fase oleosa para a formulação de nanoemulsões interfere diretamente na ação que o sistema desempenhará. Majeed et al. (2016) não encontraram diferenças na ação antimicrobiana entre o óleo de cravo e sua nanoemulsão. Por outro lado, contrariamente ao observado no presente estudo, Lou et al. (2017) observaram redução da atividade antioxidante e aumento da atividade antimicrobiana das nanoemulsões de óleo essencial de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* quando comparadas ao óleo livre.

Como o tipo de surfactante adotado nas formulações pode ter influenciado negativamente a atividade antimicrobiana dos extratos de passifloras quando nanoemulsificados, sugere-se que sejam realizados novos estudos para avaliar a influência de diferentes tensoativos em diferentes concentrações na atividade antimicrobiana das nanoemulsões de extratos de passifloras, contra o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*. Sugere-se também que seja testada atividade antimicrobiana com outros microrganismos patogênicos de interesse alimentar, incluindo os fungos, pois compostos naturais têm apresentado alta atividade antifúngica.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de nanoemulsões e extratos livres de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea*

Amostra	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Escherichia coli</i>		
<i>P. alata</i> polpa - extrato livre	8.000	>8.000
<i>P. alata</i> polpa - extrato nanoemulsificado	nd <sup>1</sup>	nd
<i>P. alata</i> semente - extrato livre	4.000	8.000
<i>P. alata</i> semente - extrato nanoemulsificado	nd	nd
<i>P. setacea</i> polpa - extrato livre	8.000	>8.000
<i>P. setacea</i> polpa - extrato nanoemulsificado	4.000	>4.000
<i>P. setacea</i> semente - extrato livre	4.000	4.000
<i>P. setacea</i> semente - extrato nanoemulsificado	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>P. alata</i> polpa - extrato livre	4.000	>8.000
<i>P. alata</i> polpa - extrato nanoemulsificado	nd	nd
<i>P. alata</i> semente - extrato livre	500	>8.000
<i>P. alata</i> semente - extrato nanoemulsificado	nd	nd
<i>P. setacea</i> polpa - extrato livre	2.000	>8.000
<i>P. setacea</i> polpa - extrato nanoemulsificado	4.000	>4.000
<i>P. setacea</i> semente - extrato livre	500	>8.000
<i>P. setacea</i> semente - extrato nanoemulsificado	nd	nd

<sup>1</sup>nd: não determinado.

#### 4. Conclusão

Foi possível obter nanoemulsões estáveis, com tamanho pequeno e baixo PDI. Sua carga levemente negativa pode ter contribuído para as pequenas instabilidades observadas no estudo de estabilidade ao longo do tempo. As NESS apresentaram a melhor atividade antioxidante entre todas as amostras avaliadas. Foi possível observar que em sistemas nanoestruturados a atividade antioxidante dos

extratos melhora. Então, pelo menos metade da concentração de extrato de *Passiflora* é capaz de ter a mesma atividade antioxidante quando em nanoemulsão, do que a quantidade avaliada em extrato livre. Já a atividade antimicrobiana das nanoemulsões, para as estirpes estudadas, não demonstraram um bom desempenho, exceto a NEPS, que potencializou o MIC em duas vezes contra o crescimento de *E. coli*. As nanoemulsões de extratos hidroalcoólicos de polpas e sementes de *P. alata* e *P. setacea* demonstraram ser promissoras para futuras aplicações na indústria de alimentos.

## Referências

- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. [journal article]. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978-985. doi: 10.1007/s11095-010-0309-1
- Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada (2003).
- Argentieri, M. P., Levi, M., Guzzo, F., & Avato, P. (2015). Phytochemical analysis of *Passiflora loefgrenii* Vitta, a rich source of luteolin-derived flavonoids with antioxidant properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(11), 1603-1612. doi: 10.1111/jphp.12454
- Bali, V., Ali, M., & Ali, J. (2010). Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(2), 410-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.021>
- Bellon, G., Faleiro, F. G., Junqueira, K. P., Junqueira, N. T. V., Santos, E. C. d., Braga, M. F., & Guimarães, C. T. (2007). Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29, 124-127.
- Bomtempo, L. L., Costa, A. M., Lima, H., Engeseth, N., & Gloria, M. B. A. (2016). Bioactive amines in *Passiflora* are affected by species and fruit development. *Food Res Int*, 89(Pt 1), 733-738. doi: 10.1016/j.foodres.2016.09.028
- Bruxel, F., Laux, M., Wild, L. B., Fraga, M., Koester, L. S., & Teixeira, H. F. (2012). Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, 35, 1827-1840.
- Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2012). Physical Properties and Antimicrobial Efficacy of Thyme Oil Nanoemulsions: Influence of Ripening Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 12056-12063. doi: 10.1021/jf304045a
- Chen H., Khemtong C., Yang X, Chang .X, & J., G. (2011). Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug discovery today*, 16(7), 354-360.
- Colomeu, T. C., Figueiredo, D., Cazarin, C. B. B., Schumacher, N. S. G., Maróstica, M. R., Meletti, L. M. M., & Zollner, R. L. (2014). Antioxidant and anti-diabetic

- potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *International Immunopharmacology*, 18(1), 106-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.005>
- Dorđević, S. M., Radulović, T. S., Cekić, N. D., Randelović, D. V., Savić, M. M., Krajišnik, D. R., Savić, S. D (2013). Experimental Design in Formulation of Diazepam Nanoemulsions: Physicochemical and Pharmacokinetic Performances. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(11), 4159-4172. doi: 10.1002/jps.23734
- Fernandez, P., André, V., Rieger, J., & Kühnle, A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 251(1), 53-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.09.029>
- Fryd, M. M., & Mason, T. G. (2012). Advanced nanoemulsions. *Annual review of physical chemistry*, 63, 493-518.
- Gadioli, I. L., da Cunha, M. d. S. B., de Carvalho, M. V. O., Costa, A. M., & Pineli, L. d. L. d. O. (2016). A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-23. doi: 10.1080/10408398.2016.1224805
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 338-344. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.08.010>
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12(11), 2826-2841.
- Guttoff, M., Saberi, A. H., & McClements, D. J. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chemistry*, 171, 117-122. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.087>
- Hamouda, T., & Baker, J. R. (2000). Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 397-403. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01127.x

- Krzystek, J., Sienkiewicz, A., Pardi, L., & Brunel, L. C. (1997). DPPH as a Standard for High-Field EPR. *Journal of Magnetic Resonance*, 1(125), 207-211.
- Li, J., Chang, J. W., Saenger, M., & Deering, A. (2017). Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 232, 191-197. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.147>
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., & Huang, Q. (2012). Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7548-7555. doi: 10.1021/jf301129k
- Liu, X., Bi, J., Xiao, H., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of Nutraceutical Bioavailability using Excipient Nanoemulsions: Role of Lipid Digestion Products on Bioaccessibility of Carotenoids and Phenolics from Mangoes. *Journal of Food Science*, 81(3), N754-N761. doi: 10.1111/1750-3841.13227
- López-Vargas, J. H., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, 51(2), 756-763. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.055>
- Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. (2017). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 371-377. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037>
- Majeed, H., Liu, F., Hategekimana, J., Sharif, H. R., Qi, J., Ali, B., . . . Zhong, F. (2016). Bactericidal action mechanism of negatively charged food grade clove oil nanoemulsions. *Food Chemistry*, 197, 75-83. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.015>
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. [10.1039/C2SM06903B]. *Soft Matter*, 8(6), 1719-1729. doi: 10.1039/C2SM06903B
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330. doi: 10.1080/10408398.2011.559558
- Mishra, R. K., Soni, G. C., & Mishra, R. P. (2014). A review article: On nanoemulsion. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3(9), 258-274.
- Morales, N. P., Sirijaroonwong, S., Yamanont, P., & Phisalaphong, C. (2015). Electron Paramagnetic Resonance Study of the Free Radical Scavenging Capacity of Curcumin and Its Demethoxy and Hydrogenated Derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(10), 1478-1483. doi: 10.1248/bpb.b15-00209
- Naik, A., Meda, V., & Lele, S. S. (2014). Application of EPR Spectroscopy and DSC for Oxidative Stability Studies of Nigella sativa and Lepidium sativum Seed Oil. [journal article]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 935-941. doi: 10.1007/s11746-014-2430-5
- O'Hanlon, C. E., Amede, K. G., O'Hear, M. R., & Janjic, J. M. (2012). NIR-labeled perfluoropolyether nanoemulsions for drug delivery and imaging. *Journal of Fluorine Chemistry*, 137, 27-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfluchem.2012.02.004>
- Pineli, L. d. L. d. O., Moretti, C. L., Chiarello, M., & Melo, L. (2015). Influence of strawberry jam color and phenolic compounds on acceptance during storage. *Revista Ceres*, 62, 233-240.
- Quintão, F. J. O., Tavares, R. S. N., Vieira-Filho, S. A., Souza, G. H. B., & Santos, O. D. H. (2013). Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), 101-107. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000001>
- Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1413-1423. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.004>
- Rocha-Filho, P. A., Camargo, M. F. P., Ferrari, M., & Maruno, M. (2014). Influence of Lavender Essential Oil Addition on Passion Fruit Oil Nanoemulsions: Stability and in vivo Stud. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5(2).

- Rodrigues, M. C., Muehlmann, L. A., Longo, J. P. F., Silva, R. C., Graebner, I. B., Degterev, I. A., Garcia, M. P. (2015). Photodynamic therapy based on *Arrabidaea chica* (Crajiuru) extract nanoemulsion: in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(3), 1.
- Santana, F. C. (2015). *Avaliação dos compostos bioativos presentes na semente de Passiflora spp. e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica*. PhD, Universidade de São Paulo.
- Santana, F. C., Shinagawa, F. B., Araujo, E. D. S., Costa, A. M., & Mancini-Filho, J. (2015). Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian *Passiflora* seed oils. *Journal of food science*, 80(12), C2647-C2654.
- Santos, D. S. (2015). *Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante in vitro de nanoformulações contendo óleo do fruto Orbignya phalerata Martius*. Master, Universidade de Brasília.
- Shanthilal, J., & Bhattacharya, S. (2014). Nanoparticles and Nanotechnology in Food *Conventional and Advanced Food Processing Technologies* (pp. 567-594): John Wiley & Sons, Ltd.
- Shinoda, K., & Hiroshi, S. (1969). The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 30(2), 258-263.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. [journal article]. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 854-867. doi: 10.1007/s11947-011-0683-7.
- Silva, L. M., Hill, L. E., Figueiredo, E., & Gomes, C. L. (2014). Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles: synthesis, characterization, and antimicrobial activity. *Food chemistry*, 165, 362-370.
- Singleton, V., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3), 102-110. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>
- Tang, S. Y., Manickam, S., Wei, T. K., & Nashiru, B. (2012). Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 330-345. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.07.001>
- Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2015). Nanocarriers for Delivery of Antioxidants on the Skin. *Cosmetics*, 2(4), 342.
- Yilmaz, Y., Göksel, Z., Erdoğan, S. S., Öztürk, A., Atak, A., & Özer, C. (2015). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Seed, Skin and Pulp Parts of 22 Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivars (4 Common and 18 Registered or Candidate for Registration). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1682-1691. doi: 10.1111/jfpp.12399
- Zorzi, G. K., Caregnato, F., Moreira, J. C. F., Teixeira, H. F., & Carvalho, E. L. S. (2016). Antioxidant Effect of Nanoemulsions Containing Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C.—Asteraceae. [journal article]. *AAPS PharmSciTech*, 17(4), 844-850. doi: 10.1208/s12249-015-0408-8

## CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa sobre composição de compostos bioativos e propriedades biológicas de extratos e nanoemulsões de passifloras silvestres, nativas do Cerrado, contribui com informações que ajudam a relacionar a biodiversidade com os benefícios que seus frutos podem gerar à saúde.

Os resultados encontrados foram favoráveis quanto à qualidade das passifloras. Observou-se que elas apresentam quantidades importantes de compostos fenólicos, certos aminoácidos e aminas bioativas. Muitos desses compostos contribuem para as atividades antioxidantes e antimicrobianas desempenhadas pelas passifloras. Atenção especial deve ser dada às sementes, pois são um subproduto, com alto índice de desperdício, mas que apresentam elevada atividade antioxidante e também atividade antimicrobiana contra o crescimento de microrganismos de alta relevância para a segurança dos alimentos.

Devido aos benefícios biológicos apresentados pelas as passifloras silvestres, seus extratos foram nanoemulsificados, o que se mostrou um processo viável e que contribuiu para manter a estabilidade dos compostos bioativos ao longo do tempo. Além disso, houve uma potencialização ou estabilidade da atividade antioxidante dos extratos. Entretanto, a atividade antimicrobiana foi perdida, quando os extratos passaram a atuar na escala nanométrica. Isso pode ter sido atribuído ao tipo de surfactante utilizado. Por isso, outros estudos, que avaliem diferentes tipos de surfactantes e sua atuação na atividade antimicrobiana de nanoemulsões de extratos de passifloras, podem ser realizados.

A partir desses resultados, sugere-se que tais nanoemulsões possam ser utilizadas como ingredientes funcionais de suplementos nutricionais, com o intuito de tornar esses produtos mais saudáveis e com melhor entrega dos compostos bioativos. Para tanto, estudos complementares, que avaliem a digestibilidade e a biodisponibilidade dos extratos nanoemulsificados, são indicados.

Nesse contexto, será possível valorizar a biodiversidade do bioma Cerrado, ampliando o consumo dos seus frutos no cenário da alimentação saudável. Por fim, a nanoemulsificação dos extratos das sementes de passifloras contribuirá para agregar

valor às sementes, um subproduto que apresenta tantos potenciais benefícios para a saúde.