

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA BEATRIZ KLOSOWSKI

BAGAÇO DE MALTE: VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO EM APLICAÇÕES
COSMÉTICAS SUSTENTÁVEIS

PONTA GROSSA
2025

ANA BEATRIZ KLOSOWSKI

BAGAÇO DE MALTE: VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO EM APLICAÇÕES
COSMÉTICAS SUSTENTÁVEIS

Tese apresentada para a obtenção do título de doutora em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Bonametti Olivato

Coorientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Mazureki Campos

PONTA GROSSA

2025

K66 Klosowski, Ana Beatriz

 Bagaço de malte: valorização do subproduto em aplicações cosméticas sustentáveis / Ana Beatriz Klosowski. Ponta Grossa, 2025.
 165 f.

 Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profa. Dra. Juliana Bonametti Olivato.
 Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Mazureki Campos.

 1. Compostos fenólicos. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade prebiótica. 4. Amido/pva filmes. 5. Emulsão pickering. I. Olivato, Juliana Bonametti. II. Campos, Patrícia Mazureki. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

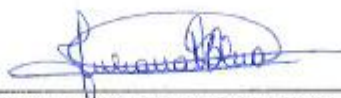
CDD: 615

ANA BEATRIZ KLOSOWSKI

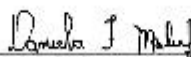
**BAGAÇO DE MALTE: VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO EM
APLICAÇÕES COSMÉTICAS SUSTENTÁVEIS**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, nível Doutorado,
Associação Ampla entre a Universidade Estadual
de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do
Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 28 de maio de 2025.



Profa. Dra. JULIANA BONAMETTI OLIVATO – UEPG – Presidente



Profa. Dra. DANIELA FLORÊNCIO MALUF – UFPR – Membro titular externo



Doc. assinado eletronicamente
GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO
Data: 20/05/2025 14:49:07-0000
Verifique em: <https://portal.trf.gov.br>

Prof. Dr. GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO – UFPR – Membro titular externo



Profa. Dra. PATRÍCIA DÖLL BOSCARDIN – UEPG – Membro titular interno



Profa. Dra. PRISCILEILA COLERATOQ FERRARI – UEPG – Membro titular interno

Dedico esse trabalho aos meus pais Adelmo Luiz Klosowski e Beatriz Aparecida Klosowski, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse necessário durante esse período de doutorado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve ao meu lado e nunca me desamparou nos momentos de dificuldade. Eu sei que só consegui chegar até aqui graças à Ele, que me capacitou e me iluminou em todos os momentos, desde a aprovação no processo seletivo do doutorado, até no planejamento e execução dos experimentos, como também na escrita dessa tese e dos artigos científicos. Eu agradeço por ter escutado todas as minhas súplicas e orações, para que eu conseguisse finalizar esse doutorado.

Aos meus pais, Beatriz e Adelmo, e minhas irmãs, Ana Bárbara e Ana Cláudia, que sempre me apoiaram e me deram o suporte necessário para que eu pudesse seguir nesse caminho da pós-graduação. Obrigada por terem compreendido que muitas vezes eu precisei me ausentar, ficar longe de vocês, para poder me dedicar ao doutorado. Vocês são meu alicerce, a minha força!

Às minhas amigas Camila, Taynara, Julia e Raphaela, que tornaram essa jornada muito mais leve. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos e por sempre me incentivarem nos meus sonhos e projetos.

À minha orientadora, prof^a Dr^a Juliana Bonametti Olivato, que sempre foi muito atenciosa e disposta a me ajudar em tudo que precisei. A professora Juliana foi uma grande mestra, com quem eu aprendi muito durante esse período de doutorado, muito desse trabalho eu devo a ela, por toda a sua ajuda, paciência, empatia, compreensão, conselhos, orientação e correções. Obrigada professora, por ter aceitado me orientar e ter confiado a mim esse trabalho, e por ter me guiado tão bem!

À minha coorientadora, prof^a Dr^a Patrícia Mazureki Campos, por ter aceitado a continuar me coorientando e por todas as suas contribuições valiosas no meu trabalho, com seu vasto conhecimento. Eu também agradeço por todos os seus conselhos, por acreditar em mim e por sempre me ajudar a evoluir profissionalmente.

Aos meus colegas de laboratório, Aline Lopes, Aline Justo, Giovani e Mateus, que me ajudaram muito na execução de alguns experimentos. No doutorado foi a primeira vez que tive contato com a área de produtos naturais e com certeza a ajuda de vocês foi primordial para eu adquirir novos conhecimentos, trocar experiências e poder repassar tudo o que aprendi às outras pessoas que também necessitam.

Aos membros da banca de defesa do doutorado, prof^{as} Dr^{as} Daniela Florêncio Maluf, Priscileila Colerato Ferrari e Patrícia Mathias Döll Boscardin e ao prof Dr

Guilherme dos Anjos Camargo, por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora, por todas as correções e contribuições realizadas para o aprimoramento do meu trabalho.

Aos laboratoristas, Denise (Tecnologia de alimentos), Marcelo (Biologia), Maria Aparecida, Luciane, Josemira e Eli (Farmácia), por toda a disposição em me ajudar, seja através de suas experiências, empréstimo de vidrarias, equipamentos e reagentes, ou mesmo pela amizade, pelas conversas, tornando a rotina no laboratório mais leve e agradável.

Às prof^{as} Dr^{as} Patrícia Mathias Döll Boscardin e Carla Cristine Kanunfre, por terem fornecido as estruturas dos laboratórios, bem como os reagentes, materiais e equipamentos necessários para a execução dos ensaios de citotoxicidade e à prof^a Dr^a Michele Dietrich Moura Costa, pelo fornecimento da linhagem celular 3T3 de fibroblastos.

Ao prof. Dr. Luís Antônio Esmerino, por toda a ajuda nos ensaios microbiológicos, sempre pronto a auxiliar e a colocar o laboratório de microbiologia à disposição dos alunos para a execução dos experimentos. Eu também agradeço ao professor pelo fornecimento das cepas de bactérias e materiais necessários para os ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana e formação de biofilme.

Ao prof. Dr. Marcos Pileggi e a mestranda Brenda, pelo fornecimento da bactéria *Lactobacillus acidophilus* e pelo auxílio na elaboração de protocolo e execução do teste de avaliação de atividade prebiótica.

À prof^a Dr^a Lorena Rigo Gaspar Cordeiro, da Universidade de São Paulo, por ter aceitado a parceria para a realização do ensaio de *HET-CAM* e, por fornecer toda a estrutura laboratorial e materiais necessários para a execução desse teste. Eu já aproveito para agradecer também ao meu amigo Bruno, doutorando na USP, e à laboratorista e mestranda Karina, por terem me acolhido durante o período em que fiquei em Ribeirão Preto e terem me ajudado em tudo que eu precisei enquanto estive lá.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Associação ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela oportunidade de realizar tanto o mestrado, quanto o doutorado neste programa e agradeço aos professores vinculados ao programa, por todo o conhecimento transmitido nas disciplinas durante esses anos de pós-graduação.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (CLABMU) Geral, CLABMU-SEBISA e a todos os técnicos vinculados à ambos, que contribuíram muito com o meu trabalho através da realização de diversas análises de caracterização das minhas amostras.

À Koch Cervejaria, pelo fornecimento dos diferentes tipos de bagaços de malte, que foram essenciais ao meu trabalho.

Ao Recursos Hídricos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo fornecimento de água purificada usada nas formulações e em diversos testes.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, que é a universidade que eu tenho tanto carinho e que tenho frequentado por 10 anos, em que fiz a minha graduação em Farmácia, meu mestrado e agora doutorado em Ciências Farmacêuticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, código de financiamento 001, pela bolsa contemplada durante o período do doutorado.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso. Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O bagaço de malte é o principal resíduo sólido gerado na indústria cervejeira e apresenta em sua composição os compostos fenólicos, com potencial antioxidante. Como há uma crescente busca por formulações cosméticas com ingredientes naturais e biodegradáveis, o presente trabalho teve como objetivo obter e caracterizar o extrato de bagaço de malte, além de desenvolver e caracterizar filmes de amido e poli (vinil álcool), nanopartículas de amido e emulsão *pickering*, com a finalidade de obter formulações cosméticas sustentáveis. O extrato foi obtido por maceração e extração em Soxhlet, caracterizado por teor de fenólicos e flavonoides totais e avaliado pelas atividades antioxidante e prebiótica, além da citotoxicidade em fibroblastos. Os filmes foram desenvolvidos por *solvent casting* e caracterizados quanto suas propriedades mecânicas, estruturais e de barreira, além da liberação de compostos fenólicos. Já para as nanopartículas e emulsão *pickering*, foram avaliados o diâmetro médio, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta por espectroscopia da correlação de fótons, acrescentando a eficiência de encapsulação (EE) para as nanopartículas. A emulsão *pickering* foi estabilizada pelas nanopartículas de amido e a segurança avaliada através do teste da membrana corioalantoide (*HET-CAM*). Os extratos compostos por bagaços de malte Pilsen e Centeio (EBMP e EBMC, respectivamente) foram os que apresentaram os maiores valores para teor de fenólicos totais, sendo $2,82 \pm 0,03$ e $4,28 \pm 0,14$ mg EAG.g⁻¹, respectivamente, e consequentemente a maior inibição dos radicais ABTS, com valores de IC₅₀ de $240,10 \pm 1,60$ e $174,80 \pm 4,90$ µg.mL⁻¹ respectivamente. O teor de flavonoides foi superior no extrato EBMP ($1,00 \pm 0,11$ mg.g⁻¹ extrato) quando comparado ao EBMC ($0,11 \pm 0,01$ mg.g⁻¹ de extrato). Além da atividade antioxidante, o extrato EBMP demonstrou ação prebiótica para *Lactobacillus acidophilus*. Nos dois métodos de citotoxicidade (MTT e vermelho neutro), houve redução da viabilidade celular < 50% em concentração ≥ 10 mg.mL⁻¹ para EBMC e em concentração ≥ 5 mg.mL⁻¹ para EBMP. O aumento da concentração do extrato para 10% (% m.m⁻¹) nos filmes, quando comparado ao filme com 5% de extrato, influenciou significativamente no aumento da opacidade aparente ($53,98 \pm 6,73$ %·µm⁻¹), na redução da permeabilidade ao vapor d'água ($1,41 \times 10^{-11}$ g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹), no aumento da tensão máxima na ruptura ($14,71 \pm 3,70$ MPa) e módulo elástico ($256,27 \pm 99,97$ MPa) e na redução da elongação ($7,05 \pm 1,97$ %). No ensaio de liberação em meio tampão pH 5,5, foi possível observar que todo o extrato foi liberado durante as 4 horas de teste nos filmes com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de extrato. As nanopartículas apresentaram a faixa de diâmetro entre 181-200 nm, foram consideradas monodispersas (IPD=0,26-0,36) e o aumento da concentração do extrato para 10% ocasionou a redução do potencial zeta ($-12,00 \pm 1,10$ mV). A EE de 90,34% para nanopartícula com 5% (% m.m⁻¹) e 6,67% para nanopartícula com 10% (% m.m⁻¹) de extrato demonstrou que o aumento da concentração do extrato ocasionou redução na EE. Não foi observado nenhum sinal vascular no teste *HET-CAM* nas emulsões testadas. Tanto os filmes, quanto as nanopartículas com a concentração de 5% (% m.m⁻¹) de extrato foram as que se mostraram mais promissoras para aplicação, considerando principalmente os aspectos mecânicos, de permeabilidade ao vapor d'água e de encapsulação. Portanto, os resultados fornecem uma base experimental para considerar as formulações como sendo estratégias viáveis e seguras para aplicação tópica do extrato de bagaço de malte com ação antioxidante e prebiótica.

Palavras-chave: Ação antioxidante. Biodegradável. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Brewers' spent grain (BSG) is the main solid waste generated in the beer industry and contains phenolic compounds with antioxidant potential. As there is a growing demand for cosmetic formulations with natural and biodegradable ingredients, this study aimed to obtain and characterize BSG extract, in addition to developing and characterizing starch and poly(vinyl alcohol) films, starch nanoparticles, and a Pickering emulsion, to achieve sustainable cosmetic formulations. The extract was obtained through maceration and Soxhlet extraction, characterized by its total phenolic and flavonoid content, and evaluated for antioxidant and prebiotic activities, as well as cytotoxicity in fibroblasts. The films were developed using solvent casting and characterized by their mechanical, structural, and barrier properties, as well as the release of phenolic compounds. For the nanoparticles and Pickering emulsion, the mean diameter, polydispersity index (PDI), and zeta potential were evaluated using photon correlation spectroscopy, along with the encapsulation efficiency (EE) for the nanoparticles. The Pickering emulsion was stabilized by starch nanoparticles, and the safety was evaluated by the chorioallantoic membrane test (HET-CAM). The extracts composed of Pilsen and Rye BSG (EBMP and EBMC, respectively) were those that presented the highest values for total phenolic content, being 2.82 ± 0.03 and 4.28 ± 0.14 mg EAG.g⁻¹, respectively, and consequently, the most significant inhibition of ABTS radicals, with IC₅₀ values of 240.10 ± 1.60 and 174.80 ± 4.90 µg.mL⁻¹, respectively. The flavonoid content was higher in the EBMP extract (1.00 ± 0.11 mg.g⁻¹ extract) when compared to EBMC (0.11 ± 0.01 mg.g⁻¹ extract). In addition to the antioxidant activity, the EBMP extract demonstrated prebiotic action for *Lactobacillus acidophilus*. In both cytotoxicity methods (MTT and neutral red), there was a reduction in cell viability of < 50% at a concentration ≥ 10 mg.mL⁻¹ for EBMC and at a concentration ≥ 5 mg.mL⁻¹ for EBMP. Increasing the extract concentration to 10% (% w.w⁻¹) in the films, when compared to the film with 5% (% w.w⁻¹) extract, significantly influenced the increase in apparent opacity (53.98 ± 6.73 %µm⁻¹), the reduction in water vapor permeability (1.41×10^{-11} g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹), the increase in tensile strength (14.71 ± 3.70 MPa) and elastic modulus (256.27 ± 99.97 MPa) and the reduction in elongation (7.05 ± 1.97 %). In the release test in a pH 5.5 buffer medium, it was observed that all the extract was released during the 4-hour testing period in films with 5% and 10% (w.w⁻¹) extract. The nanoparticles presented a diameter range between 181-200 nm, were considered monodisperse (PDI = 0.26-0.36), and the increase in the extract concentration to 10% (w.w⁻¹) caused a reduction in the zeta potential (-12.00 ± 1.10 mV). The EE of 90.34% for nanoparticles with 5% (w.w⁻¹) of extract and 6.67% for nanoparticles with 10% (w.w⁻¹) of extract demonstrated that the increase in extract concentration caused a reduction in the EE. No vascular signal was observed in the HET-CAM test in the tested emulsions. Both the films and the nanoparticles with a concentration of 5% (w.w⁻¹) of the extract showed the most promise for application, considering mainly the mechanical aspects, permeability to water vapor, and encapsulation. Therefore, the results provide an experimental basis for evaluating the formulations as viable and safe strategies for the topical application of BSG extract, which exhibits antioxidant and prebiotic actions.

Keywords: Antioxidant action. Biodegradable. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da estruturação da tese, com o conteúdo de cada capítulo	26
FIGURA 2 - Processo de fabricação da cerveja e etapa de obtenção do bagaço de malte	28
FIGURA 3 - Estruturas químicas do ácido gálico (A) e ácido ferúlico (B)	32
FIGURA 4 - Camadas da pele e suas respectivas células e proteínas	36
FIGURA 5 - Principais fatores que levam ao processo de oxidação na pele	37
FIGURA 6 - Principais diferenças entre a pele jovem e a pele envelhecida	38
FIGURA 7 - Estruturas químicas do amido (A) e poli (vinil álcool) (B)	41
FIGURA 8 - Principais diferenças entre a emulsão convencional e emulsão pickering	46
FIGURA 9 - Representação esquemática do ensaio de <i>HET-CAM</i>	49
FIGURA 10 - Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular por MTT	51
FIGURA 11 - Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro	52
FIGURA 12 - Representação esquemática dos processos de obtenção do extrato de bagaço de malte	59
FIGURA 13 - Bagaço de malte úmido (A), seco (B) e triturado e tamisado (C)	70
FIGURA 14 - Processos de extração: maceração demonstrada em (A) com o macerado e (B) com o filtrado após os 7 dias, e extração em Soxhlet em (C) juntamente com a evaporação rotativa dos extratos em (D)	72
FIGURA 15 - Curvas de <i>TGA</i> (A) e <i>dTG</i> (B) dos diferentes extratos testados	73
FIGURA 16 - Curvas de <i>DSC</i> dos diferentes extratos testados	74
FIGURA 17 - Espectros de <i>FTIR</i> dos diferentes extratos testados	75
FIGURA 18 - Curvas padrões do ácido gálico (A) e quercetina (B)	76
FIGURA 19 - Viabilidade celular frente à exposição ao EBMC, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do MTT	80
FIGURA 20 - Viabilidade celular frente à exposição ao EBMP, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do MTT	80
FIGURA 21 - Viabilidade celular frente à exposição ao EBMC, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do vermelho neutro	81
FIGURA 22 - Viabilidade celular frente à exposição ao EBMP, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do vermelho neutro	81
FIGURA 23 - Foto da placa contendo o biofilme formado, após a aplicação de EBMP e EBMC	86
FIGURA 24 - Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , quando exposto a meio MRS com glicose (controle positivo) e meios MRS (sem glicose) com EBMP nas concentrações 1; 1,5% e 2% (% , m.v ⁻¹)	87
FIGURA 25 - Cromatograma do EBMP (40 µL.mL ⁻¹) obtido em UHPLC com as condições testadas	88
FIGURA 26 - Cromatogramas dos padrões de ácido gálico (A) e ácido ferúlico (B) na concentração 50 µg.mL ⁻¹ e seus respectivos tempos de retenção	89

FIGURA 27 - Representação gráfica das curvas analíticas padrões (n=3) do ácido gálico obtidas por UHPLC na faixa de concentração de 2 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	91
FIGURA 28 - Processo de formação (<i>solvent casting</i>) dos filmes contendo extrato de bagaço de malte	98
FIGURA 29 - Foto do Filme com 5% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	104
FIGURA 30 - Fotomicrografias das criofraturas dos filmes Controle (A), com 5% (% , m.m ⁻¹) de EBMP (B) e com 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP (C), aumento de 1000x	107
FIGURA 31 - Curvas de <i>TGA</i> (A) e <i>dTG</i> (B) dos polímeros amido e PVA, do EBMP e dos filmes Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	108
FIGURA 32 - Curvas de <i>DSC</i> dos polímeros amido e PVA, do EBMP e dos filmes Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	109
FIGURA 33 - Espectros de <i>FTIR</i> dos polímeros amido e PVA, do EBMP e dos filmes Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	110
FIGURA 34 - Valores de tensão máxima na ruptura (A), elongação (B) e módulo elástico (C) para os filmes Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	112
FIGURA 35 - Representação gráfica do grau de intumescimento dos filmes Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP nos tempos 30 min, 1 h, 2 h e 4 h	116
FIGURA 36 - Curva analítica padrão do ácido gálico na faixa de concentração de 1 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	117
FIGURA 37 - Perfil de liberação dos compostos fenólicos totais dos filmes com 5% e com 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP no meio tampão pH 5,5 e na temperatura de 32°C	117
FIGURA 38 - Representação esquemática do método de obtenção das nanopartículas de amido	122
FIGURA 39 - Foto das formulações de nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	126
FIGURA 40 - Fotomicrografias das partículas de amido de mandioca (A) com aumento de 3000x, lactose (B) com aumento de 5000x, nanopartículas de amido aglomeradas (C) com o aumento de 30000x e nanopartículas de amido individuais (D) com aumento de 48000x	130
FIGURA 41 - Espectros de <i>FTIR</i> do polímero amido, crioprotetor lactose, de EBMP e das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	131
FIGURA 42 - Curvas de <i>TGA</i> (A) e <i>dTG</i> (B) do polímero amido, crioprotetor lactose, de EBMP e das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	132
FIGURA 43 - Curvas de <i>DSC</i> do polímero amido, crioprotetor lactose, de EBMP e das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	133
FIGURA 44 - Difractogramas do polímero amido, EBMP e nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	134
FIGURA 45 - Processo de obtenção das emulsões <i>pickering</i>	141
FIGURA 46 - Superfície de resposta para diâmetro médio de partícula em função das variáveis concentração de nanopartículas e tempo de agitação (A) e proporção O/A e tempo de agitação (B)	146
FIGURA 47 - Superfície de resposta para índice de polidispersão em função das variáveis concentração de nanopartículas e tempo de agitação (A) e proporção O/A e tempo de agitação (B)	146
FIGURA 48 - Superfície de resposta para potencial zeta em função das variáveis concentração de nanopartículas e tempo de agitação (A) e proporção O/A e tempo de agitação (B)	147

FIGURA 49 - Representação esquemática do planejamento fatorial 2^3	147
FIGURA 50 - Fotos das onze formulações de emulsão <i>pickering</i> desenvolvidas durante o planejamento fatorial.....	148
FIGURA 51 - Fotomicrografia das partículas, em tamanho nanométrico, presentes na emulsão <i>pickering</i> , em aumento de 41000x	151
FIGURA 52 - Imagens obtidas durante o teste <i>HET-CAM</i> para controle positivo – SDS 1% (% , m.v ⁻¹) (A), controle negativo – salina (B), EP Controle (C), EP com 5% (% , m.m ⁻¹) de EBMP (D) e EP com 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP (E).....	152

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros cromatográficos usados para avaliação do perfil de compostos fenólicos no extrato de bagaço de malte.....	66
TABELA 2 - Composição centesimal dos diferentes tipos de bagaços de malte avaliados	71
TABELA 3 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, e inibição dos radicais ABTS•+ e DPPH• pelos extratos.....	77
TABELA 4 -Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo <i>Candida albicans</i> quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações	83
TABELA 5 - Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo <i>Escherichia coli</i> quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações	83
TABELA 6 - Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i> quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações.....	84
TABELA 7 - Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo <i>Staphylococcus epidermidis</i> quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações	84
TABELA 8 - Principais compostos fenólicos encontrados em diferentes estudos com extratos de bagaço de malte.....	90
TABELA 9 - Resultados de ANOVA para linearidade do método	91
TABELA 10 - Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.....	92
TABELA 11 - Valores experimentais obtidos nos ensaios de exatidão.....	92
TABELA 12 - Valores experimentais obtidos nos ensaios de robustez (n=3).....	93
TABELA 13 - Valores de concentração da solução de ácido gálico, armazenada em frasco âmbar, obtidos durante estudo de estabilidade	93
TABELA 14 - Formulações dos filmes de amido/PVA, com e sem o extrato de bagaço de malte.....	98
TABELA 15 - Valores de espessura, densidade e opacidade aparente dos filmes obtidos.....	106
TABELA 16 - Valores da solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP.....	113
TABELA 17 - Valores obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% , m.m ⁻¹) de EBMP	126
TABELA 18 - Concentração de compostos fenólicos do extrato incorporado nas nanopartículas de amido (mg EAG.g ⁻¹ de extrato) e eficiência de encapsulação - EE (%).....	135
TABELA 19 - Planejamento fatorial 2 ³ – número de experimentos e combinação dos níveis nos fatores	139
TABELA 20 - Planejamento fatorial 2 ³ – fatores em seus níveis baixo, médio e alto	140
TABELA 21 - Escore de irritação considerando o tempo de ocorrência de cada evento vascular	143

TABELA 22 - Classificação da intensidade dos eventos vasculares, de acordo com escore cumulativo	144
TABELA 23 - Emulsões e as variáveis diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta utilizadas no planejamento fatorial 2^3	144
TABELA 24 - Coeficientes de regressão fatorial para as variáveis resposta	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	[(2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]
ANOVA	Análise de variância
ASTM	<i>American Society for Testing and Material</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BM	Bagaço de malte
DM	Diâmetro médio
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DRX	Difração de raios X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
dTG	<i>Derivate Thermogravimetry</i>
EBM	Extrato de bagaço de malte
EBMC	Extrato de bagaço de malte Centeio + Golden + Pale Ale + Caraaroma
EBMP	Extrato de bagaço de malte Pilsen
EBMP + PA	Extrato de bagaço de malte Pilsen + Pale Ale
EBMP + C	Extrato de bagaço de malte Pilsen + Caraamber + Carared + Caramunich
EE	Eficiência de encapsulação
EP	Emulsão <i>pickering</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test - Chorioallantoic membrane</i>
IPD	Índice de polidispersão
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NP	Nanopartícula
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVA	Poli (vinil álcool)
PZ	Potencial zeta
R	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
UR	Umidade relativa

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

min	minuto
h	hora
s	segundo
x	vezes
g	gramas
kg	quilogramas (10^3 g)
mg	miligramas (10^{-3} g)
μ g	microgramas (10^{-6} g)
L	litro
mL	mililitro (10^{-3} L)
μ L	microlitro (10^{-6} L)
%	porcentagem
°	grau
°C	grau Celsius
cm ²	centímetros (10^{-2} m) quadrados
cm ³	centímetros (10^{-2} m) cúbicos
mm	milímetro (10^{-3} m)
μ m	micrômetro (10^{-6} m)
nm	nanômetro (10^{-9} m)
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
λ	lambda – comprimento de onda
θ	theta
mV	milivolts (10^{-3} volts)
MPa	megapascal (10^6 Pa)
kV	quilovolts (10^3 volts)
↓ endo	representação do pico endotérmico para baixo
UFC	unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	27
1.1 BAGAÇO DE MALTE	27
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	31
1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA EM EXTRATO COM COMPOSTOS FENÓLICOS	34
1.4 OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DA PELE E ENVELHECIMENTO CUTÂNEO	35
1.5 DIFERENTES FORMULAÇÕES PARA INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE: FILMES, NANOPARTÍCULAS E EMULSÃO PICKERING	40
1.5.1 Filmes Poliméricos	40
1.5.2 Nanopartículas de Amido	42
1.5.3 Emulsão <i>Pickering</i>	44
1.6 TESTES DE AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA IN VITRO PARA COSMÉTICOS	47
1.6.1 Ensaio da Membrana Corioalantoide de Ovo Embrionado de Galinha ou Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (<i>HET-CAM</i>)	48
1.6.2 Ensaios de Citotoxicidade pela Avaliação da Viabilidade Celular – MTT e Vermelho Neutro	49
CAPÍTULO 2 – PREPARO, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE DIFERENTES TIPOS DE BAGAÇOS DE MALTE E OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DOS BAGAÇOS DE MALTE	53
2.1 INTRODUÇÃO	53
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.2.1 Material	54
2.2.2 Métodos	56
2.2.2.1 Preparo dos diferentes tipos de bagaços de malte	56
2.2.2.2 Composição centesimal dos bagaços de malte	56
2.2.2.2.1 Determinação do teor de umidade	56
2.2.2.2.2 Determinação do teor de resíduo mineral fixo ou teor de cinzas	57
2.2.2.2.3 Determinação do teor de lipídeos	57
2.2.2.2.4 Determinação do teor de proteínas	57
2.2.2.2.5 Determinação do teor de fibras brutas	58
2.2.2.3 Obtenção dos extratos a partir dos bagaços de malte	59

2.2.2.4 Caracterização dos extratos	60
2.2.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	60
2.2.2.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais	61
2.2.2.4.3 Análise térmica dos extratos	61
2.2.2.4.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) dos extratos	62
2.2.2.5 Testes para avaliação <i>in vitro</i> de atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica e análises de citotoxicidade em linhagem de fibroblastos 3T3	62
2.2.2.5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos	62
2.2.2.5.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos	63
2.2.2.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos	64
2.2.2.5.4 Avaliação da inibição da formação de biofilme	64
2.2.2.5.5 Avaliação da atividade prebiótica do extrato Pilsen (EBMP)	65
2.2.2.6 Desenvolvimento e validação de método analítico para identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato de bagaço de malte por UHPLC-DAD	66
2.2.2.7 Análise estatística	69
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
2.3.1 Preparo dos Diferentes Tipos de Bagaços de Malte	69
2.3.2 Composição Centesimal dos Bagaços de Malte	70
2.3.3 Obtenção dos Extratos a partir dos Bagaços de Malte	72
2.3.4 Caracterização dos Extratos	73
2.3.4.1 Análise térmica dos extratos	73
2.3.4.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) dos extratos	75
2.3.5 Testes para Avaliação <i>In Vitro</i> de Atividade Antioxidante, Antimicrobiana e Prebiótica e Análises de Citotoxicidade em Linhagem de Fibroblastos 3T3	76
2.3.5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, e avaliação da atividade antioxidante por ABTS•+ e DPPH•	76
2.3.5.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos	79
2.3.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos	82
2.3.5.4 Avaliação da inibição da formação de biofilme	86
2.3.5.5 Avaliação da atividade prebiótica	86
2.3.6 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos no Extrato de Bagaço de Malte por UHPLC-DAD	88
2.4 CONCLUSÃO	94

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE AMIDO DE MANDIOCA E POLI (VINIL ÁLCOOL) CONTENDO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN.....	95
3.1 INTRODUÇÃO	95
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	96
3.2.1 Material.....	96
3.2.2 Métodos.....	97
3.2.2.1 Desenvolvimento dos filmes de amido/PVA com e sem extrato de bagaço de malte.....	97
3.2.2.2 Caracterização dos filmes de amido/PVA com e sem extrato de bagaço de malte.....	99
3.2.2.2.1 <i>Determinação da espessura dos filmes</i>	99
3.2.2.2.2 <i>Determinação da densidade dos filmes</i>	99
3.2.2.2.3 <i>Determinação da opacidade aparente dos filmes</i>	99
3.2.2.2.4 <i>Avaliação da microestrutura dos filmes</i>	100
3.2.2.2.5 <i>Análise térmica dos filmes</i>	100
3.2.2.2.6 <i>Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) dos filmes</i>	100
3.2.2.2.7 <i>Avaliação das propriedades mecânicas dos filmes</i>	101
3.2.2.2.8 <i>Perda de peso ou solubilidade em água dos filmes</i>	101
3.2.2.2.9 <i>Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes</i>	102
3.2.2.2.10 <i>Determinação do grau de intumescimento dos filmes</i>	103
3.2.2.3 Avaliação da dissolução <i>in vitro</i> dos compostos fenólicos totais presentes no extrato de bagaço de malte liberado dos filmes poliméricos	103
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.3.1 Desenvolvimento dos Filmes de Amido/PVA com e sem Extrato de Bagaço de Malte.....	104
3.3.2 Caracterização dos Filmes de Amido/PVA com e sem Extrato de Bagaço de Malte.....	105
3.3.2.1 Determinação da espessura, densidade e opacidade aparente dos filmes.....	105
3.3.2.2 Avaliação da microestrutura dos filmes	106
3.3.2.3 Análise térmica dos filmes.....	107
3.3.2.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (<i>FTIR</i>) dos filmes	110
3.3.2.5 Avaliação das propriedades mecânicas dos filmes	111
3.3.2.6 Solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes	113
3.3.2.7 Determinação do grau de intumescimento dos filmes.....	115
3.3.3 Avaliação da Dissolução <i>In Vitro</i> dos Compostos Fenólicos Totais presentes no Extrato de Bagaço de Malte liberado dos Filmes Poliméricos	116

3.4 CONCLUSÃO.....	118
CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DE MANDIOCA CONTENDO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN.....	119
4.1 INTRODUÇÃO	119
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	121
4.2.1 Material.....	121
4.2.2 Métodos.....	121
4.2.2.1 Desenvolvimento de nanopartículas de amido com e sem extrato de bagaço de malte.....	121
4.2.2.2 Caracterização das nanopartículas de amido com e sem extrato de bagaço de malte.....	123
4.2.2.2.1 <i>Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	123
4.2.2.2.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)</i>	123
4.2.2.2.3 <i>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) das nanopartículas</i> ...	124
4.2.2.2.4 <i>Análise térmica das nanopartículas</i>	124
4.2.2.2.5 <i>Difração de raios X (DRX) das nanopartículas</i>	124
4.2.2.2.6 <i>Eficiência de encapsulação das nanopartículas</i>	125
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	125
4.3.1 Desenvolvimento de Nanopartículas de Amido com e sem Extrato de Bagaço de Malte.....	125
4.3.2 Caracterização das Nanopartículas de Amido com e sem Extrato de Bagaço de Malte.....	126
4.3.2.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.....	126
4.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG).....	129
4.3.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho (<i>FTIR</i>) das nanopartículas	130
4.3.2.4 Análise térmica das nanopartículas	131
4.3.2.5 Difração de raios X (DRX) das nanopartículas.....	133
4.3.2.6 Eficiência de encapsulação das nanopartículas.....	134
4.4 CONCLUSÃO.....	135
CAPÍTULO 5 – DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA <i>IN VITRO</i> DE EMULSÃO <i>PICKERING</i> COMPOSTA POR NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN.....	137
5.1 INTRODUÇÃO	137
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	138

5.2.1 Material.....	138
5.2.2 Métodos.....	139
5.2.2.1 Planejamento fatorial das formulações de emulsão <i>pickering</i>	139
5.2.2.2 Desenvolvimento da emulsão <i>pickering</i>	140
5.2.2.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de amido, estabilizantes das emulsões <i>pickering</i>	141
5.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura da emulsão <i>pickering</i> desenvolvida ...	142
5.2.2.5 Avaliação da irritação ocular da emulsão <i>pickering</i> com e sem extrato de bagaço de malte por <i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)</i>	142
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	144
5.3.1 Planejamento Fatorial das Formulações de Emulsão <i>Pickering</i> , Desenvolvimento da Emulsão <i>Pickering</i> e Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta.....	144
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura da Emulsão <i>Pickering</i> desenvolvida.....	150
5.3.4 Avaliação <i>In Vitro</i> da Irritação Ocular da Emulsão <i>Pickering</i> com e sem Extrato de Bagaço de Malte por <i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)</i>	151
5.4 CONCLUSÃO.....	152
CONCLUSÃO	154
REFERÊNCIAS	156

INTRODUÇÃO

Atualmente, há cada vez mais o incentivo para a redução da poluição resultante de processos industriais. Devido a isso, muitos resíduos e subprodutos gerados nas indústrias têm sido reaproveitados, sendo utilizados como matérias-primas na fabricação de outros materiais. Na indústria cervejeira, o principal subproduto sólido gerado é o bagaço de malte, que corresponde a 85% dos subprodutos totais produzidos, com produção global estimada em 180 milhões de toneladas por ano. Além disso, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, com um volume estimado de 13,3 bilhões de litros/ano, ficando atrás apenas da China (46 bilhões de litros/ano) e Estados Unidos (22,1 bilhões de litros/ano) (Abeynayake *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2019; Mussatto; Dragone; Roberto, 2006; Pabbathi *et al.*, 2022).

O bagaço de malte ainda tem sido pouco explorado, sendo a maior parte destinada a ração animal e o restante depositado em aterros sanitários. Essa subutilização deve-se a complexidade da sua composição, além da alta umidade, que pode dificultar o armazenamento e transporte. Porém, com a secagem, é possível obter um material estável, com diversas aplicações devido a rica composição e baixo custo (Ikram *et al.*, 2017).

Em relação a composição do bagaço de malte, a sua estrutura consiste nas porções casca, pericarpo e semente, que fazem parte da estrutura original da cevada, sendo ricos em macromoléculas, principalmente celulose e lignina, além de proteínas e lipídeos. Na casca, é onde são encontrados a maioria dos compostos fenólicos, especialmente os ácidos hidroxicinâmicos, que se acumulam nas paredes celulares e apresentam ação antioxidante, podendo ser encontrados na forma livre ou ligada (Chetrariu; Dabija, 2020; Zuorro; Iannone; Lavecchia, 2019).

A procura por ingredientes cosméticos de origem natural tem crescido cada vez mais, uma vez que muitas matérias-primas sintéticas, incluindo conservantes, tensoativos, antioxidantes, corantes e fragrâncias, têm ocasionado rejeição entre os consumidores devido a problemas relacionados a sustentabilidade e a irritações e alergias que podem ocasionar na pele (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020).

Além de ativos sustentáveis, tem-se buscado também o uso de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que permitam a permeação dos ativos através da pele. Um exemplo de polímero com essas características é o amido, que é abundante

na natureza, considerado seguro para aplicações cosméticas e apresenta baixo custo, viabilizando sua aplicação em diversas formulações. Porém, em filmes poliméricos destinados a aplicações como máscaras faciais, devido às limitações relacionadas a resistência mecânica (alta fragilidade e rigidez), há a necessidade da mistura com outros polímeros, que possam solucionar os problemas apresentados pelo uso do amido isoladamente. Uma alternativa é associá-lo ao poli (vinil álcool) ou PVA, que também é biodegradável e apresenta maior resistência mecânica quando comparado ao amido (Patil *et al.*, 2021).

A incorporação dos compostos bioativos de extratos de bagaço de malte já tem sido bem explorada em formulações nutracêuticas, porém em preparações cosméticas ainda tem sido pouco investigado (Macias-Garbett *et al.*, 2021). Devido a isso e a procura crescente por formulações cosméticas naturais, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o extrato de bagaço de malte principalmente quanto a presença e quantificação dos compostos fenólicos totais, e as suas ações antioxidante e prebiótica, além de desenvolver e caracterizar diferentes tipos de formulações cosméticas (filmes, nanopartículas e emulsão *pickering*) constituídas por amido de mandioca e pelo extrato de bagaço de malte.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar o extrato de bagaço de malte, bem como as formas cosméticas, incluindo os filmes, as nanopartículas e a emulsão *pickering* contendo o extrato do bagaço de malte.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA

- Realizar a contextualização do presente trabalho por meio de artigos científicos e outras fontes atuais, que abordem sobre os seguintes tópicos: bagaço de malte, compostos fenólicos e processos de extração (maceração e extração por Soxhlet), ação antioxidante, principais características da pele, filmes poliméricos (especialmente de amido), nanopartículas de amido, emulsão *pickering* e testes de avaliação de segurança *in vitro* (HET-CAM e ensaios de citotoxicidade).

CAPÍTULO 2 – PREPARO, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE DIFERENTES TIPOS DE BAGAÇOS DE MALTE E OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE MALTE

- Avaliar a composição centesimal de quatro diferentes tipos de bagaços de malte (Pilsen, mistura Centeio + Golden + Pale Ale + Caraaroma, mistura Pilsen + Pale Ale, mistura Pilsen + Caraamber + Carared + Caramunich+ Carapils);
- Obter os extratos dos bagaços de malte, através da maceração associada a extração com Soxhlet, e caracterizá-los através da análise térmica, espectroscopia na região do infravermelho, teor de fenólicos e flavonoides totais;
- Avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e prebiótica através dos métodos diluição em caldo, de captura dos radicais ABTS•+ e DPPH• e da curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, respectivamente;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de bagaço de malte pelos métodos MTT e vermelho neutro, utilizando a linhagem celular 3T3, nos períodos de exposição de 24 horas e 48 horas;

- Desenvolver e validar método de quantificação de compostos fenólicos no extrato de bagaço de malte em equipamento de UHPLC-DAD, utilizando ácido gálico como padrão.

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE AMIDO DE MANDIOCA E POLI (VINIL ÁLCOOL) CONTENDO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN PARA APLICAÇÃO FACIAL, NA FORMA DE MÁSCARAS

- Desenvolver os filmes de amido Controle e com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de extrato de bagaço de malte pelo método de *solvent casting* e caracterizá-los através da análise térmica, espectroscopia na região do infravermelho, propriedades mecânicas, microscopia eletrônica de varredura, grau de intumescimento, permeabilidade ao vapor d'água, perda de peso em água, opacidade aparente e análises de espessura e densidade;
- Avaliar o perfil de liberação dos compostos fenólicos totais dos filmes contendo extrato de bagaço de malte, pelo método de Folin-Ciocalteu.

CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DE MANDIOCA CONTENDO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN

- Desenvolver nanopartículas de amido Controle e com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de extrato de bagaço de malte por nanoprecipitação e caracterizá-las através do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, análise térmica, espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e eficiência de encapsulação.

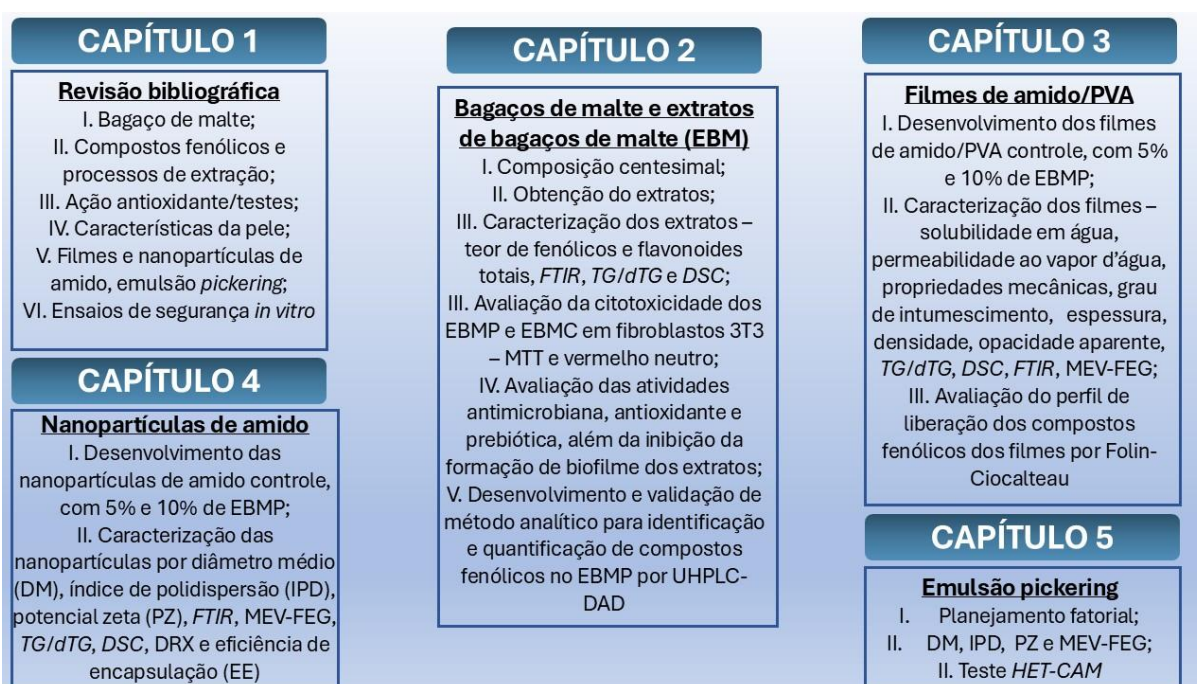
CAPÍTULO 5 – DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *IN VITRO* DE EMULSÃO *PICKERING* COMPOSTA POR NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN

- Realizar o planejamento fatorial 2³ para a escolha de emulsão *pickering*, para posterior caracterização por meio da avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta, e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a segurança *in vitro* da emulsão *pickering* pelo método *HET-CAM*.

APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA TESE

Para fins de organização e melhor exposição dos resultados, a tese foi dividida em 5 capítulos, conforme o esquema apresentado na Figura 1.

FIGURA 1 - Representação esquemática da estruturação da tese, com o conteúdo de cada capítulo



Fonte: A autora

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 BAGAÇO DE MALTE

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. Estima-se que a produção mundial anual de cerveja é em torno de 1,8 bilhão de hectolitros, sendo que a fonte é geralmente obtida pela fermentação do malte de cevada, embora outros tipos de cereais, como trigo, arroz, milho e aveia, também sejam adequados a produção da cerveja (Zuorro; Iannone; Lavecchia, 2019).

A cerveja pode ser classificada quanto ao tipo de fermentação: as *Lagers* são produzidas por fermentação baixa, em que a levedura utilizada é *Saccharomyces calshbergensis* e a temperatura que o processo ocorre seria entre 6-15 °C, são cervejas de coloração mais clara e com menor teor de fenólicos totais, quando comparadas às cervejas do tipo *Ale*. Como exemplo de cerveja tipo *Lager*, pode-se citar a *Pilsen* ou *Pilsner*, que é a mais conhecida em todo o mundo, e *American Lager*. Já as cervejas tipo *Ale*, como a *Dark* e *Bock*, são produzidas por fermentação alta, apresentam cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e a temperatura do processo fica na faixa de 16 a 24 °C, apresentam coloração mais escura (Piazzon; Forte; Nardini, 2010).

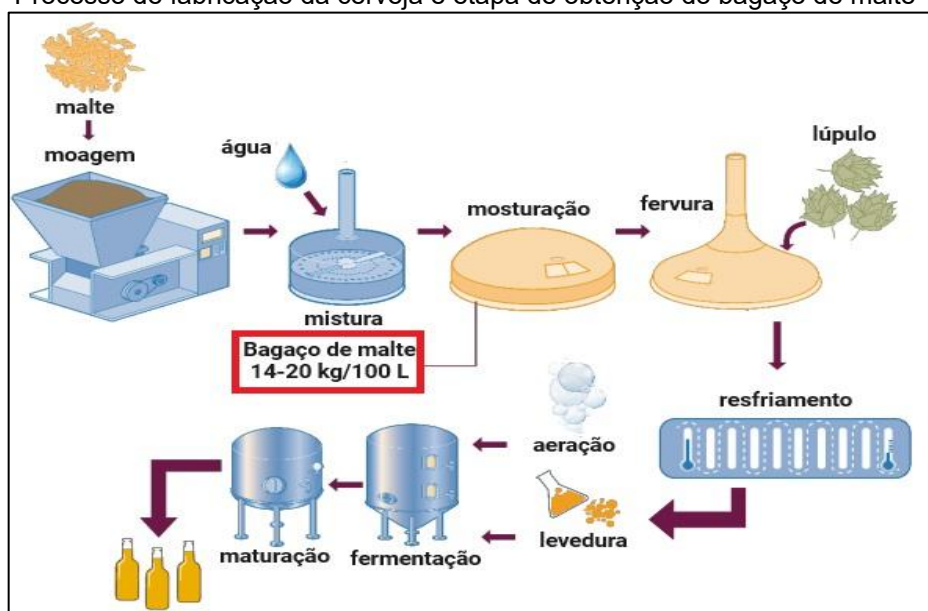
Nas cervejas do tipo *Ale*, a concentração de compostos fenólicos pode ser maior devido ao malte ser mais torrado, fazendo que durante o processo de maltagem e torrefação haja um aumento na liberação de compostos fenólicos. Quanto aos compostos fenólicos encontrados nas cervejas do tipo *Lager*, os mais comuns são o ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 5-cafeoilquímico e ácido vanílico. Já nas cervejas no tipo *Ale* são o ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 5-cafeoilquímico e ácido cafeico. Em estudo conduzido por Piazzon; Forte e Nardini (2010), observou-se que o teor de compostos fenólicos e consequentemente a atividade antioxidante variaram de acordo com os estilos, aumentando na seguinte ordem: cerveja sem álcool < Lager < Pilsner < Wheat < Ale < Abbey < Bock (Piazzon; Forte; Nardini, 2010; Silva; Dias; Koblitz, 2021).

Os grãos de cevada são constituídos principalmente por amido e proteínas, e são divididos em 3 partes: o germe ou embrião, endosperma (onde se situa a aleurona e endosperma amiláceo) e a cobertura, que é constituída pelo tegumento, pericarpo e casca (Mussatto; Dragone; Roberto, 2006).

No período de 4-6 semanas após a colheita da cevada, denominado de período de dormência, ocorre o processo de maltagem, que consiste em uma germinação controlada para aumentar o conteúdo enzimático (amilase, protease e β -glucanase) na cevada. Após a etapa de maltagem, a cevada é moída e misturada com água, com aquecimento gradativo de 37 a 78 °C, para que ocorra a hidrólise enzimática (α -amilase e β -amilase) principalmente do amido e proteínas, gerando produtos de decomposição solúveis e produzindo um líquido de sabor adocicado, denominado de mosto (Mussatto; Dragone; Roberto, 2006).

O mosto é então filtrado para ser utilizado na etapa de fermentação durante a fabricação da cerveja, que está ilustrada na Figura 2, e o resíduo sólido insolúvel, decorrente da filtração, é denominado de bagaço de malte. Na etapa da fervura, ocorre a evaporação de compostos voláteis com sabor desagradável, esterilização do mosto, inativação das enzimas e a formação de corantes e aromatizantes. Já na fermentação, os açúcares são convertidos, pela ação de leveduras, principalmente em etanol e dióxido de carbono. Após a fermentação, ainda existem as etapas de maturação e purificação para a posterior comercialização da cerveja (Bachmann; Calvete; Féris, 2022; Mussatto; Dragone; Roberto, 2006).

FIGURA 2 - Processo de fabricação da cerveja e etapa de obtenção do bagaço de malte



Fonte: A autora

O bagaço de malte é um subproduto obtido da indústria cervejeira, de baixo custo, cuja estrutura é composta por casca, pericarpo e sementes dos grãos de cevada, com quantidades residuais de endosperma e aleurona. É um material

lignocelulósico, que possui 80% de umidade, sabor adocicado e cheiro de malte. É composto de hemicelulose (19-60%), celulose (26-60%), lignina (13-56%), amido (0,28-8%), proteínas (20-24%), lipídeos (2,5-6%) e resíduos de cinzas (1-4%). Esse resíduo também é composto por compostos fenólicos. A composição química do bagaço de malte depende de alguns fatores, como espécie de cevada, período de colheita e de mistura e maltagem (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2022; Pabbathi *et al.*, 2022).

Devido à alta umidade e a presença de açúcares fermentáveis na sua composição, estes fatores podem levar a contaminação microbiana do bagaço de malte, fazendo com que o período máximo de armazenamento deste seja de apenas 7-10 dias em regiões de clima quente. A secagem é considerada o método mais eficaz para aumentar a estabilidade do bagaço de malte, quando comparados três métodos para aumentar o tempo de preservação do subproduto, incluindo o congelamento, liofilização e secagem em estufa. Tanto a liofilização, quanto a secagem em estufa mostraram a redução da umidade, sem alterar a composição química. Porém, o congelamento e liofilização não são considerados viáveis, pois há a necessidade de uma grande quantidade de subproduto (Ikram *et al.*, 2017; Mussatto; Dragone; Roberto, 2006).

Entre as proteínas, as mais abundantes são hordeína, glutelina, globulina e albumina, e dentro do teor de 20% de proteínas, 30% correspondem aos aminoácidos essenciais, sendo a lisina o principal exemplo. Dos lipídeos, 55% correspondem aos triglicerídeos e 30% aos ácidos graxos. Os principais minerais encontrados no bagaço de malte são fósforo (6000 mg.kg^{-1}), cálcio (3600 mg.kg^{-1}), magnésio (1900 mg.kg^{-1}), ferro, cobre e potássio. As vitaminas correspondem a biotina (0,1 ppm), niacina (44 ppm), colina (1800 ppm), ácido fólico (0,2 ppm), ácido pantotênico (8,5 ppm), riboflavina (1,5 ppm), tiamina (0,7 ppm) e piridoxina (0,7 ppm) (Chetrariu; Dabija, 2020).

Devido ao alto teor de fibras e proteínas, o bagaço de malte é utilizado principalmente na ração animal para bovinos, suínos, peixes e aves. Em humanos, o bagaço de malte pode ser utilizado como nutracêutico, principalmente em indivíduos com problemas gastrointestinais, devido ao alto teor de fibras e proteínas. Como o bagaço de malte também é composto por polipeptídeos, outra aplicação deste subproduto seria no tratamento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Além dos benefícios para a saúde humana e animal, o bagaço de malte ainda pode ser utilizado na composição de embalagens de alimentos devido à presença de

compostos fenólicos, que podem contribuir com a ação antioxidante, como também de biopolímeros, como a celulose, que podem atuar como material de reforço (Lech; Labus, 2022; Pabbathi *et al.*, 2022).

Os carboidratos estão presentes em grandes quantidades no bagaço de malte, e, portanto, pode ser utilizado em processos microbiológicos, incluindo produção de etanol, biogás, ácidos orgânicos, enzimas, bacteriocinas. Este subproduto também é usado na produção de carvão, na estrutura de tijolos, na fabricação de papel e como adsorvente de poluentes e/ou componentes tóxicos. Além disso, o bagaço de malte contém alta concentração de ácidos graxos, podendo ser um substrato barato para a produção de polímeros, como do polihidroxialcanoato (PHA). Através do processo de pirólise, o bagaço de malte pode ser convertido em biochar, o qual possui alta concentração de carbono (com estrutura aromática estável), melhorando as propriedades do solo (Bachmann; Calvete; Féris, 2022; Lech; Labus, 2022).

Na área de alimentos, pode ser utilizado em bebidas fermentadas, sucos e *smoothies* para aumento do conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, indústria de panificação, em produtos cárneos (15% em salsichas com baixo teor de gordura). O bagaço de malte pode ser classificado como simbiótico, uma vez que contém bifidobactérias probióticas e oligossacarídeos prebióticos, o que ocasiona a melhora das propriedades físico-químicas dos alimentos, além de trazer benefícios a saúde (Chetrariu; Dabija, 2020).

Nas aplicações biomédicas, os componentes do bagaço de malte mais explorados são as fibras (arabinoxilanos e β -glucanos) e os compostos fenólicos, principalmente ácidos hidroxicinâmicos. Por meio de testes *in vitro*, foi observado que a ação antioxidante destes compostos se apresentou similar à atividade do α -tocoferol e ácido ascórbico. Além disso, outras propriedades podem ser atribuídas a outros componentes presentes no bagaço de malte, como anti-inflamatória, antiapoptótica, antimutagênica e anti-hipertensiva. Outros compostos fenólicos que podem estar presentes no bagaço de malte incluem os flavonoides, lignanas, alquifenóis e procianidinas, que fazem com que esse subproduto seja um material com potencial antioxidante para aplicação em formulações para prevenção e redução de rugas (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020; Bonifácio-Lopes *et al.*, 2022; Chetrariu; Dabija, 2020).

Apesar das inúmeras aplicações listadas, a grande produção mundial diária de bagaço de malte ainda direciona as pesquisas no sentido de promover uma utilização sustentável, favorecendo uma economia circular e ainda valorizando o subproduto.

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

O processo de simbiose industrial, em que os compostos são extraídos de matérias-primas secundárias em vez de substratos puros, tem sido cada vez mais comum. Esta abordagem permite reduzir a quantidade de plantas usadas, além de valorizar o potencial biológico de resíduos obtidos na indústria de alimentos, como o bagaço de malte (Lech; Labus, 2022).

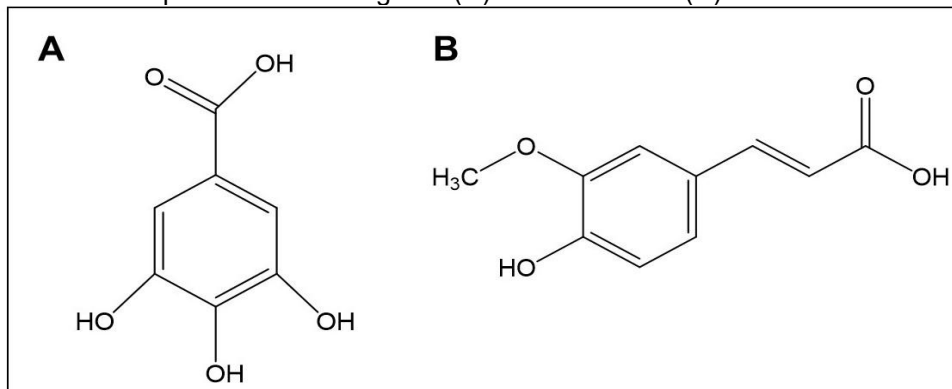
Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, usados como mecanismos de defesa, além de serem importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Quimicamente, os compostos fenólicos são classificados por apresentarem anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos (Silva; Dias; Koblitz, 2021).

De acordo com a estrutura molecular, a classificação dos compostos fenólicos pode ser em ácidos fenólicos (ácido hidroxicinâmico e hidroxibenzoico), flavonoides (flavonas, flavonois e antocianidinas) e taninos. A maioria dos compostos fenólicos presentes em cereais são ácidos fenólicos. O ácido ferúlico, cuja estrutura química está representada na Figura 3, é o principal ácido fenólico encontrado no bagaço de malte, porém apenas 10% está na forma livre, sendo a maioria complexada com polímeros arabinoxilados, formando ésteres, o que impede a ação antioxidante deste ácido, sendo necessária a etapa de hidrólise para isolá-lo (Rahman *et al.*, 2021; Siqueira; Bolini; Macedo, 2008).

No bagaço de malte, a variação dos compostos fenólicos pode ocorrer de acordo com o tipo de malte usado no processo. Os ácidos hidroxicinâmicos se acumulam nas paredes celulares e apresentam ação antioxidante, podendo ser encontrados na forma livre ou conjugada. Um exemplo de ácido hidroxicinâmico é o ácido gálico, o qual é um ácido tri-hidroxibenzoico, cuja estrutura química está representada na Figura 3. Além do ácido gálico e ferúlico, outros compostos fenólicos comuns de serem encontrados são os ácidos *p*-cumárico, séríngico, vanílico, vanilina

e catequina (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2022; Chetrariu; Dabija, 2020; Oliveira *et al.*, 2018).

FIGURA 3 - Estruturas químicas do ácido gálico (A) e ácido ferúlico (B)



Fonte: A autora

Há uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos na amostra e a atividade antioxidante; adicionalmente, quanto maior a concentração destes compostos, maior também a inibição da enzima tirosinase. A maior atividade antioxidante no bagaço de malte escuro pode ser explicada pelo sinergismo entre os polifenóis e as melanoidinas. Além disso, o potencial antioxidante está diretamente relacionado com a massa molecular dos compostos fenólicos, ou seja, quanto menor a massa, maior a ação antioxidante. Isso ocorre porque ácidos fenólicos com menor massa molecular estão mais biodisponíveis e livres, sem conjugação com outras moléculas e além disso, podem penetrar mais facilmente na pele pelo processo de difusão passiva devido a maior solubilidade quando comparados aos compostos de maior massa molecular (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020).

Além da ação antioxidante, os compostos fenólicos e flavonoides apresentam anéis aromáticos em sua estrutura química, se assemelhando a estrutura do aminoácido tirosina, o qual é substrato da enzima tirosinase durante a melanogênese. Portanto, esses compostos presentes no bagaço de malte podem competir com a tirosina pelo sítio de ligação na tirosinase, inibindo todo o processo de síntese de melanina, apresentando ação clareadora em melasmas e também ação fotoprotetora (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020).

Dependendo do local no cereal, as quantidades dos ácidos fenólicos podem ser distintas. Na parte mais interna dos cereais, que corresponde ao endosperma amiláceo, são encontrados níveis baixos, enquanto as camadas externas (pericarpo, camada de aleurona e germe) apresentam os níveis mais elevados. Geralmente, os

ácidos fenólicos se encontram na forma ligada quando presentes nas camadas externas dos grãos e os flavonóis se encontram na forma livre, podendo ser solúveis ou insolúveis (Almeida *et al.*, 2017).

Para a obtenção de compostos fenólicos livres, além da utilização de solventes orgânicos, uma segunda etapa é necessária, que corresponde a hidrólise alcalina, que rompe as ligações éster nas paredes celulares, promovendo a liberação dos compostos. Isso foi aplicado especialmente aos ácidos ferúlico e *p*-cumárico, cujas concentrações aumentaram de 50 a 100x mais após o processo de hidrólise alcalina quando comparado ao uso de solventes somente. O ácido ferúlico geralmente é encontrado na forma de oligômeros no bagaço de malte (Becker; Stegmüller; Richling, 2022).

Uma alternativa além da hidrólise alcalina, usada como pré-tratamento na extração, são os procedimentos mecânicos, incluindo a maceração, moagem e homogeneização. Estes auxiliam na quebra da porção lignocelulósica, facilitando a passagem do solvente aos vacúolos e outras estruturas em que os compostos fenólicos ficam armazenados no bagaço de malte (Macias-Garbett *et al.*, 2021).

Entre os métodos convencionais para a extração de compostos fenólicos, pode-se citar a maceração, fervura, imersão, hidrodestilação e extração em Soxhlet. O uso do extrator Soxhlet apresenta algumas vantagens, como menor custo de processamento, fácil execução, recupera completamente os extratos e consome menos tempo e solvente, quando comparado aos métodos de maceração e percolação, por exemplo (Alara; Abdurahman; Ukaegbu, 2018).

Além disso, pode-se citar outros métodos de extração, como extração sólido-líquido, extração líquido-líquido, microondas, líquido pressurizado, ultrassom, reações de hidrólise alcalina e enzimática e extração de fluido supercrítico (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2022).

A extração sólido-líquido é muito utilizada para a recuperação de compostos bioativos de materiais não tratados ou pré-tratados. Tanto o rendimento de extração, quanto as propriedades dos compostos recuperados dependem das características estruturais e de composição da matriz vegetal, do tipo de composto que deseja extrair e da força com que esses compostos estão ligados à matriz. Além disso, as condições de processamento devem ser bem controladas, como temperatura, velocidade de agitação, tempo de extração, tamanho das partículas na amostra, pH e proporção líquido/sólido, para poder maximizar a recuperação dos compostos, além de preservar

as suas propriedades funcionais. A escolha do solvente está diretamente relacionada com o rendimento da extração, sendo que os mais recomendados nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmética são as misturas acetona:água ou etanol:água, não sendo indicado o metanol devido a sua toxicidade (Andres *et al.*, 2020; Chetrariu; Dabija, 2020; Zuorro; Iannone; Lavecchia, 2019).

A vantagem da extração sólido-líquido em relação aos demais métodos é que é a mais barata e é possível a utilização de solventes “verdes”, como o etanol e suas misturas com a água (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2020). Os solventes como a acetona ou etanol, podem levar a desnaturação das proteínas e como 25% do bagaço de malte é constituído por proteínas, isto pode levar ao afrouxamento da parede celular, facilitando a entrada de solventes e a consequente recuperação dos compostos fenólicos. A água também é um solvente importante na extração de compostos fenólicos, uma vez que devido ao pequeno volume molar e alta capacidade de formação de ligações de hidrogênio, ocorre intumescimento da estrutura do bagaço, levando a uma maior recuperação de compostos fenólicos (Zuorro; Iannone; Lavecchia, 2019).

1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA EM EXTRATO COM COMPOSTOS FENÓLICOS

A superfície da pele humana é composta por cerca de 10^6 microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, sendo que o número exato e a composição variam de acordo com as condições específicas das diferentes regiões da pele. Os gêneros bacterianos predominantes na pele correspondem ao *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Cutibacterium* (Rademacher *et al.*, 2022).

A bactéria *Staphylococcus aureus* pode ser encontrada na pele e na região de mucosas, como nas narinas, garganta, axila e virilha, sem ocasionar patologias. Porém, quando o sistema imunológico do hospedeiro está comprometido, isto pode ocasionar um desequilíbrio na microbiota e consequentemente o excesso desta bactéria pode ocasionar doenças cutâneas, como a dermatite atópica. Já o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* exerce uma ação benéfica e antagônica ao *S. aureus* por meio de mecanismos biológicos, o que contribui para melhora de problemas cutâneos (Petrov Ivanković *et al.*, 2023).

Os polifenóis podem exercer a ação prebiótica, aumentando o número de microrganismos que podem trazer benefícios a pele e ao mesmo tempo reduzindo os que ocasionam patologias. A atividade antibacteriana de polifenóis está associada aos mecanismos de inativação enzimática, danos à parede celular bacteriana ou ainda, inibição da formação de biofilmes. No estudo conduzido por Gong *et al.* (2019), foi observado que o aumento da ingestão de ácidos fenólicos do trigo integral foi relacionado ao crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e à redução de *Escherichia coli*, *Clostridiaceae* e *Clostridium perfringens* (Gong *et al.*, 2019). Porém, alguns fatores influenciam na atividade antimicrobiana de polifenóis, como a estrutura química e a espécie microbiana que está sendo avaliada (Petrov Ivanković *et al.*, 2023).

Os mecanismos de ação pelos quais os polifenóis exercem a ação prebiótica, descritos por Rodríguez-Daza, *et al.* (2021), incluem a atuação como fontes de carbono, após a desglicosilação microbiana, além de serem aceptores de elétrons (ácidos hidroxicinâmicos) ou ainda, podem gerar forças motrizes de prótons durante a metabolização (ácido gálico), contribuindo no metabolismo e consequentemente no crescimento dos microrganismos.

1.4 OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DA PELE E ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

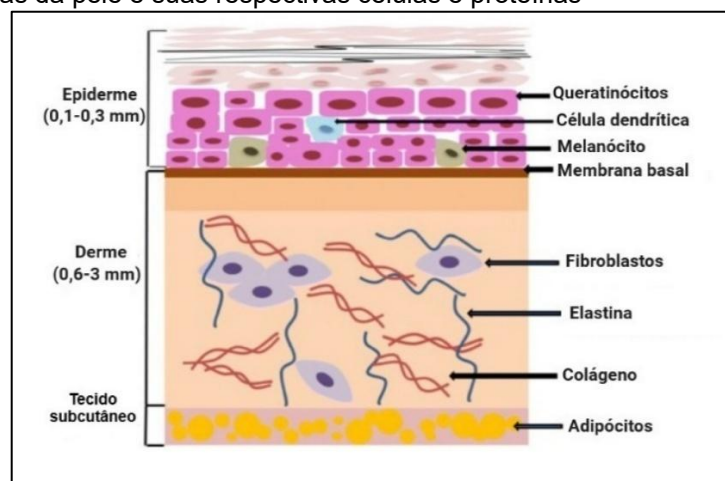
A pele é o maior órgão do corpo humano, que é dividida em três camadas, sendo a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, conforme o esquema representado na Figura 4. A epiderme é a camada mais externa, que tem a função de barreira e é subdividida em camadas córnea, granulosa, espinhosa e basal. Os queratinócitos, que são as principais células presentes na epiderme, regeneram-se na camada basal e à medida que ocorre replicação dessas células em direção ao estrato córneo, os queratinócitos amadurecem, transformando-se em células achatadas e anucleadas, que são denominadas de corneócitos. Este processo é denominado de *turnover* celular, cujo tempo pode variar de acordo com a idade, sendo que para peles mais jovens, esse período de renovação celular pode ocorrer de 15-30 dias e em peles mais envelhecidas de 30-50 dias. Além dos queratinócitos, outros tipos celulares importantes encontrados na epiderme são os melanócitos (camada basal), os quais secretam melanina, que é uma substância fundamental para proteção contra os raios

ultravioleta (UV) e células do tipo dendrítica, denominadas de células apresentadoras de antígenos, localizadas principalmente na camada espinhosa (Abdo; Sopko; Milner, 2020; Ansaf *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2019)

Já a derme contém a matriz extracelular composta por colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Os fibroblastos constituem o principal tipo celular encontrado na derme, os quais são responsáveis pela produção de colágeno, que é responsável por dar firmeza à pele (Ansaf *et al.*, 2023). A derme pode ser dividida em derme papilar, que é mais superficial e a mais fina, onde tem a presença das papilas dérmicas e vasos sanguíneos que nutrem a epiderme, e derme reticular, que é mais profunda, e é onde estão dispostas as fibras elásticas e colágenas na posição horizontal e os anexos cutâneos (Arnal-Forné *et al.*, 2024). A região papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo e que está em contato com a epiderme, a sua estrutura é constituída pela matriz extracelular e é onde estão os fibroblastos. Os fibroblastos são células que secretam fibronectina e ácido hialurônico, que são componentes essenciais na matriz e que estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas. Além disso, os vasos sanguíneos e linfáticos, e células epiteliais são encontrados na derme papilar. Já a derme reticular, além do colágeno, também possui vasos sanguíneos em sua estrutura (Lotfollahi, 2024).

O tecido subcutâneo corresponde à camada mais profunda da pele, constituída por células de gordura (adipócitos), cujas funções incluem a proteção do calor e frio, amortecimento de choques, além do armazenamento de energia (Benítez; Montáns, 2017).

FIGURA 4 - Camadas da pele e suas respectivas células e proteínas

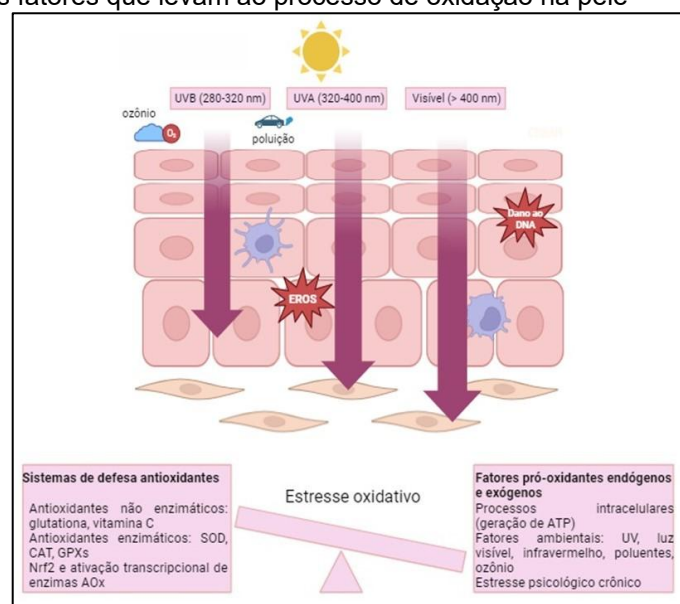


Fonte: **Adaptado de** ZHANG, R. A. *et al.* Dielectric and Double Debye Parameters of Artificial Normal Skin and Melanoma. **Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 657–672, 2019.

A pele apresenta a principal função de proteção contra a entrada de agentes físicos, químicos e biológicos. Diversos fatores ambientais podem levar a doenças (dermatite atópica, acne e psoríase) e ao envelhecimento de pele, como a radiação solar, que abrange a região do UV, visível e infravermelho, além de poluentes, como fumaça e a liberação de hidrocarbonetos aromáticos, compostos orgânicos voláteis, materiais particulados e ozônio (Adamczyk-Grochala *et al.*, 2020).

O envelhecimento da pele é um processo biológico que pode apresentar como origem tanto fatores intrínsecos, como fatores extrínsecos ou ambientais, como está demonstrado na Figura 5. Entre os intrínsecos, é possível citar a produção de radicais livres, danos ao DNA mitocondrial, acúmulo de células epiteliais senescentes e encurtamento dos telômeros. Já os fatores extrínsecos abrangem a radiação UV, poluição e o tabagismo. A pele envelhecida, além de apresentar alterações fenotípicas, também altera toda a estrutura de proteínas localizadas na derme e que são responsáveis por dar resistência, elasticidade e hidratação da pele, que correspondem ao colágeno, elastina e proteoglicanos, respectivamente. Além disso, a exposição excessiva a radiação UV pode levar ao estresse oxidativo, e resultar em alteração nos componentes da matriz extracelular, levando ao estímulo das metaloproteinases de matriz que promovem a degradação do colágeno, que leva a formação de rugas e manchas (Adamczyk-Grochala *et al.*, 2020; Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020; Carvalho *et al.*, 2024).

FIGURA 5 - Principais fatores que levam ao processo de oxidação na pele



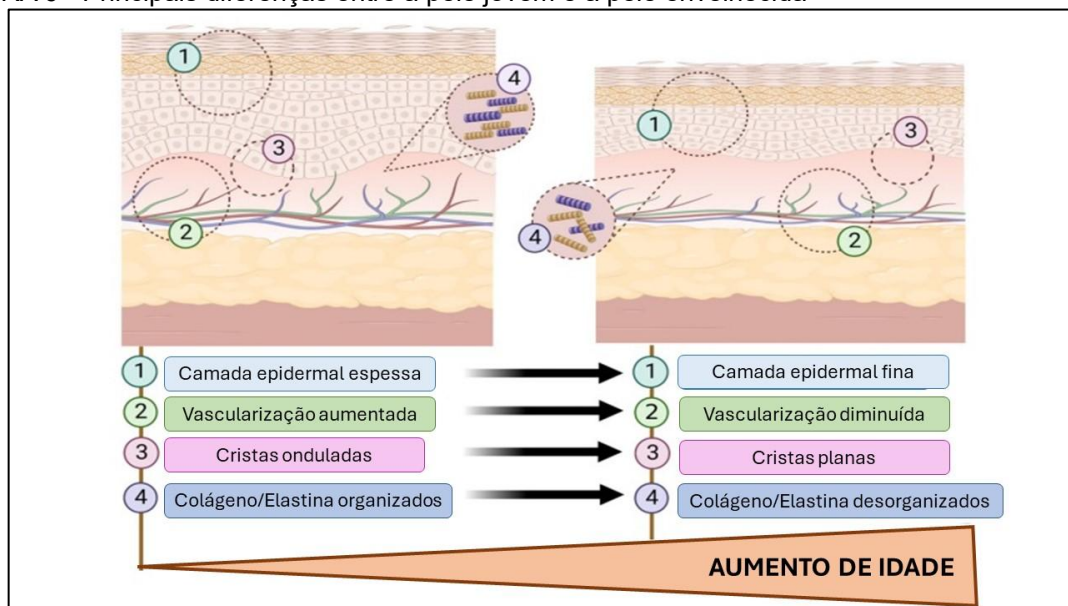
Fonte: A autora

Notas: UVA: Radiação ultravioleta do tipo A; UVB: Radiação ultravioleta do tipo B; SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; GPX: Glutathione Peroxidase; Nrf2: Fator nuclear E2 relacionado ao fator 2;

AOX: Oxidase alternativa; ATP: Adenosina Trifosfato; EROS: Espécies reativas de oxigênio; UV: Ultravioleta

Dentre as alterações observadas, pode-se citar as cristas epidérmicas que se apresentam mais onduladas na pele jovem e planas na pele envelhecida, como observado na Figura 6. Além disso, há redução de um terço na junção dermo-epidérmica (camada que une a epiderme e a derme) da pele envelhecida, quando comparada a pele jovem e consequentemente a pele de idosos acaba sendo mais fina e frágil, suscetível a formação de feridas e úlceras. Ainda há encurtamento dos telômeros e a senescência dos melanócitos, que pode levar a liberação de espécies reativas de oxigênio mitocondriais, ocasionando uma redução na proliferação de queratinócitos e consequentemente compromete a integridade cutânea, acarretando danos. Ocorre também redução das células apresentadoras de antígenos em peles envelhecidas, retardando a cicatrização de feridas, que resulta em feridas crônicas e infecções (ansaf *et al.*, 2023; Ginting *et al.*, 2021).

FIGURA 6 - Principais diferenças entre a pele jovem e a pele envelhecida



Fonte: **Adaptado de** ANSAF, R. B. *et al.* 3D bioprinting - a model for skin aging. **Regenerative Biomaterials**, [s. l.], v. 10, n. June, 2023.

Com o envelhecimento, há redução dos fibroblastos presentes na derme e isso leva a diminuição na produção de colágeno, além de comprometer a estrutura dessa proteína, que fica mais linear e solta, ocasionando a flacidez e o aparecimento de rugas. Além disso, alterações na matriz extracelular levam ao afinamento também da derme, assim como já foi citado para a epiderme. Toda a estrutura vascular também é comprometida em peles envelhecidas, ocorrendo uma redução dos vasos

sanguíneos e dificultando a regeneração da pele e cicatrização de feridas (Ansaf *et al.*, 2023).

No envelhecimento intrínseco, ocorre a diminuição do fator de crescimento transformador (TGF- β), o qual é um fator que estimula a produção de colágeno, além do aumento de espécies reativas de oxigênio. Além disso, há formação da proteína ativadora (AP-1), a qual estimula o processo de transcrição das metaloproteinases, que são enzimas responsáveis pela degradação do colágeno e pela inibição dos receptores tipo 2 de TGF- β , ocasionando a redução da produção de colágeno (Ginting *et al.*, 2021). Além disso, tanto no processo de envelhecimento intrínseco, quanto no fotoenvelhecimento, ocorre a redução de glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs), destacando-se o ácido hialurônico e biglican (Lee; Oh; Chung, 2016).

Existem antioxidantes naturais, que podem neutralizar as espécies reativas de oxigênio, como é o caso de vitaminas, minerais, enzimas e polifenóis. As limitações dos antioxidantes incluem principalmente a baixa solubilidade e a baixa estabilidade frente a luz e ao oxigênio. O encapsulamento dos ativos antioxidantes pode ser uma alternativa para solucionar ou minimizar as limitações apresentadas (Almeida *et al.*, 2017; Sivamaruthi *et al.*, 2022).

Os métodos *in vitro* mais comuns para análise do potencial antioxidante das substâncias são os métodos de ABTS e DPPH. No método de ABTS [(2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], ocorre a transferência de elétrons do composto antioxidante, ocorrendo a redução dos radicais, sendo indicada pela mudança de coloração da solução. Há a presença de um cromóforo azul-esverdeado durante a reação, produzido pela oxidação do ABTS com o persulfato de potássio. É possível ter a interferência de outras moléculas com hidroxilas em anel aromático, que também pode levar a redução dos radicais ABTS. Já no DPPH, ocorre a captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) através de reação de oxidorredução. A amostra, com ação antioxidante, doa hidrogênio ocasionando a redução do radical DPPH. A vantagem do método DPPH é que não há interferência de possíveis reações indesejáveis que os compostos fenólicos podem apresentar, como quelação de íons metálicos e inibição enzimática (Almeida *et al.*, 2017).

1.5 DIFERENTES FORMULAÇÕES PARA INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE: FILMES, NANOPARTÍCULAS E EMULSÃO PICKERING

1.5.1 Filmes Poliméricos

Devido a busca por formulações mais sustentáveis, os polímeros sintéticos têm sido substituídos por polímeros biodegradáveis e de fontes renováveis. Como exemplo, pode-se citar biopolímeros sintetizados quimicamente, como poli (ácido láctico), poli (vinil álcool) e poli (caprolactona), os de origem microbiana, como poli-hidroxi-butirato e os de origem natural, como amido, celulose, quitosana, gelatina, alginato e suas misturas (Patil *et al.*, 2021).

O amido, cuja estrutura química está representada na Figura 7, é um polissacarídeo abundante na natureza e de baixo custo constituído por unidades de amilose e amilopectina. O amido denominado nativo apresenta tamanhos de grânulos que variam de 2 a 100 μm e dependendo da fonte botânica, há variação na composição e morfologia desses grânulos. A amilose é uma cadeia polimérica linear, que apresenta mais de 500 unidades de glicose ligadas por ligações α -(1,4) glicosídicas. A fração de amilose é essencialmente linear e caracterizada por estrutura helicoidal. Já a amilopectina apresenta estrutura ramificada, contendo de 2000 a 200000 unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas α -(1,4) com ramificações de unidades de glicose ligadas por ligações α -(1,6). O tamanho da ramificação está diretamente relacionado com a classificação da estrutura em cristalina ou amorfa, ou seja, quando os ramos de amilopectina são longos, a estrutura se apresenta amorfa e quando curtos, a estrutura é de natureza cristalina. A proporção de amilose e amilopectina varia de acordo com a origem botânica do amido, em que o amido de mandioca, por exemplo, apresenta 17% de amilose e 83% de amilopectina na sua composição (Minakawa; Faria-Tischer, 2019).

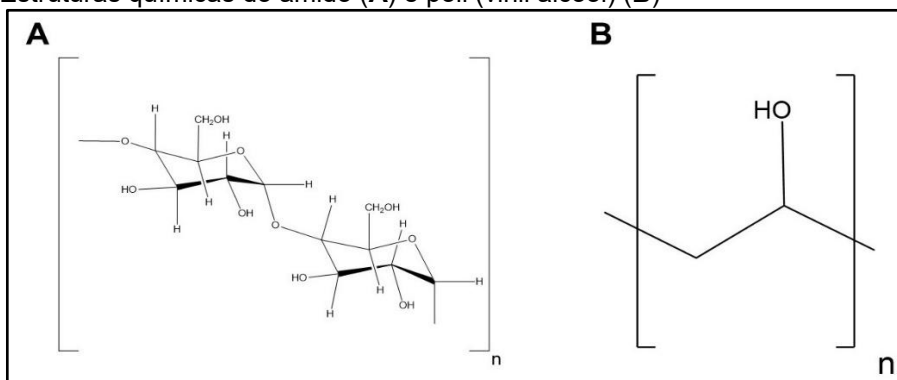
As estruturas α -glucanas do amido correspondem a 98-99% do seu peso seco, enquanto o restante é constituído por fragmentos de parede celular, componentes superficiais e internos. A presença de proteínas e lipídeos na superfície dos grânulos de amido pode influenciar nas propriedades físicas das pastas de amido (Sadeghi *et al.*, 2017).

O amido apresenta algumas limitações, como a baixa solubilidade em água fria, baixa capacidade emulsionante e alto grau de retrodegradação. Os grânulos de

amido nativo se hidratam, intumescem e rompem facilmente e além de perderem a viscosidade, produzem uma pasta. Para superar todas essas limitações há necessidade de modificação física, química ou enzimática da estrutura do amido (Chin; Pang; Tay, 2011).

Os filmes de amido são isotrópicos, inodoros, insípidos, transparentes, não apresentam toxicidade e são biodegradáveis, porém a desvantagem dos filmes constituídos apenas por amido está relacionada a fragilidade e a rigidez do material devido à região amorfa desse polímero, sendo facilmente fraturado e não sendo possível utilizar em embalagens para alimentos e máscaras faciais cosméticas. Já o poli (vinil álcool) ou PVA, cuja estrutura química está presente na Figura 7, é considerado um polímero biodegradável, biocompatível e com resistência mecânica maior quando comparado ao amido. As desvantagens do uso do poli (vinil álcool) consistem no alto custo e baixa taxa de biodegradação. Dessa forma, é interessante fazer a mistura do amido com poli (vinil álcool) para reduzir as limitações que cada um dos polímeros apresenta separadamente. O poli (vinil álcool) pode apresentar morfologias de matriz, microesferas e fibras, quando associado ao amido (Begum *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2017; Patil *et al.*, 2021).

FIGURA 7 - Estruturas químicas do amido (A) e poli (vinil álcool) (B)



Fonte: A autora

Além de possuírem baixa resistência mecânica, os filmes de amido possuem baixa resistência a água (alta permeabilidade ao vapor d'água). O poli (vinil álcool) é um polímero biodegradável, com baixa permeabilidade ao oxigênio e que em combinação com o amido, é possível de reduzir a hidrofiliidade e melhorar as propriedades mecânicas, tornando os filmes mais flexíveis. Há a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo hidroxila do poli (vinil álcool) e o grupo hidroxila do amido e essas ligações permitem com que haja a reorientação da porção hidrofóbica da

cadeia de PVA, causando a formação de uma região hidrofóbica na matriz, motivo pelo qual há a redução da hidrossolubilidade dos filmes de amido (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

Além do uso da mistura com o poli (vinil álcool), as propriedades mecânicas dos filmes, bem como a barreira ao vapor d'água e gás também podem ser aprimoradas com a adição de plastificantes nas formulações dos filmes, como o glicerol, sorbitol e ácido cítrico (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

Vários métodos podem ser usados para o desenvolvimento de filmes poliméricos, como *solvent casting*, *electrospinning*, extrusão e *spray drying*. Dentre essas, a técnica mais comum e barata é *solvent casting*, que consiste na evaporação do solvente e formação de filmes moldados em placas de Petri ou placas de acrílico. Diversas fontes de amido são utilizadas para formação de filmes pela técnica de *solvent casting* que incluem os amidos de mandioca, de milho, de jaca, milho oxidado e araruta (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

1.5.2 Nanopartículas de Amido

A estabilidade dos polifenóis pode ser reduzida com a variação de pH, presença de íons metálicos, bem como exposição à luz, alta temperatura, ao oxigênio e a enzimas. Devido a isso, há a necessidade de buscar por alternativas que visem a conservação dos polifenóis. Além disso, a maioria dos polifenóis são moléculas grandes que apresentam baixa solubilidade e baixa permeação na pele. Uma opção é a encapsulação em micro ou nanopartículas, em que o revestimento por polímeros reduz a exposição desses compostos às condições ambientais e permite que esses ativos atinjam a derme para exercerem a ação antioxidante (Spinelli; Conte; Del Nobile, 2016).

As nanopartículas de amido apresentam vantagens de serem formas farmacêuticas e cosméticas biodegradáveis, podendo serem usadas na encapsulação de ativos e na estabilização de emulsões óleo/água. Como o amido é um polímero semicristalino, isso justifica o seu uso em formulações de nanopartículas. A faixa de tamanho das nanopartículas compreende de 10-1000 nm e as propriedades físico-químicas de formulações com nanotecnologia são diferentes quando comparadas às formulações sem o envolvimento do tamanho reduzido de partículas. Dois exemplos

de benefícios que as nanopartículas proporcionam são a redução na dispersão da luz, alta solubilidade e alta taxa de penetração biológica (Chang *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2022; Ruan *et al.*, 2022).

Existem basicamente dois tipos de nanoestruturas já relatadas para o amido, que consistem em nanocristais formado pela hidrólise ácida de regiões amorfas, transformando-as em grânulos cristalinos ou ainda as nanopartículas de amido, que são nanopartículas, geralmente de formato esférico e com tamanhos variáveis, que podem ser obtidas de diferentes fontes de amido, e formadas a partir da gelatinização. Estas últimas apresentam podem apresentar regiões cristalinas ou serem completamente amorfas (Hassan *et al.*, 2022).

Quanto às aplicações, as nanopartículas de amido podem ser usadas para a estabilização de compostos bioativos, como extratos que contêm polifenóis, ou ainda na estabilização de emulsões *pickering* (Caldonazo *et al.*, 2021).

Diversos métodos podem ser usados para a obtenção de nanopartículas de amido, através da utilização de: forças mecânicas, homogeneização em alta pressão, ultrassom, extrusão reativa, irradiação gama, microemulsão reversa, gelificação iônica, moagem de bolas, nanoprecipitação, hidrólises químicas (ácida/alcalina) e enzimática e degradação física. Durante o processo de fabricação das nanopartículas, há modificação na relação entre porção amorfa e porção cristalina na estrutura do amido, fazendo com que novas estruturas com novos tamanhos e com maior área superficial sejam obtidas (Jiang *et al.*, 2022).

A hidrólise ácida com o uso de ácido sulfúrico ou hidrólise alcalina com o hidróxido de sódio são os métodos utilizados para a gelatinização química do amido. Este processo preserva a cristalinidade na estrutura do amido, eliminando apenas a região amorfa (Kumari; Yadav; Yadav, 2020).

O outro método bastante usado na formação de nanopartículas de amido é a nanoprecipitação e há necessidade de uma pré-etapa nesse processo, que corresponde a gelatinização do amido. Em seguida, a pasta de amido, formada durante a gelatinização, é gotejada em solução de não-solvente ou vice-versa, que pode ser o etanol, metanol, propanol, isopropanol, acetona e outros de natureza apolar. O etanol é responsável por ocasionar a redução da constante dielétrica e da polaridade das ligações glicosídicas da pasta de amido, reduzindo a sua solubilidade e conseqüentemente levando a precipitação do amido. Quando comparada às demais

técnicas, a nanoprecipitação é a que apresenta menor tamanho de partículas (100-200 nm) (Sadeghi *et al.*, 2017).

A nanoprecipitação foi descrita pela primeira vez por Fessi *et al.* (1989). Os parâmetros importantes para o controle do tamanho das partículas incluem o polímero e suas propriedades, concentrações do polímero e do ativo, a escolha dos solventes orgânicos, a temperatura do processo, a força iônica na fase aquosa e as proporções de solvente/não solvente (Liu *et al.*, 2020).

Na nanoprecipitação, ocorre a deposição do polímero na interface e o deslocamento do solvente da solução lipofílica. É possível associar outras técnicas a nanoprecipitação, como ultrassonicação, desramificação enzimática ou química ou ainda a homogeneização em alta velocidade ou alta pressão, para aumentar a eficácia e o rendimento do processo. Um homogeneizador de alta velocidade gera cisalhamento através da coordenação precisa do rotor e do estator no dispositivo de dispersão, garantindo que o amido seja submetido a vários cisalhamentos e esmagamentos por minuto (Dong *et al.*, 2021; Noor *et al.*, 2022; Ruan *et al.*, 2022).

As etapas envolvidas na nanoprecipitação são a supersaturação, nucleação e agregação. O teor de amilose no amido utilizado interfere significativamente na eficiência de nucleação do amido gelatinizado durante o processo de nanoprecipitação. Quanto maior o teor de amilose, mais completa é a etapa de nucleação (Jiang *et al.*, 2023).

Diversas fontes botânicas de amido já foram relatadas para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação, como milho, mandioca, batata doce, batata, ervilha, quinoa. As vantagens da nanoprecipitação são a maior homogeneidade no tamanho de partículas, a reprodutibilidade dos resultados obtidos, alto rendimento e redução de solventes considerados tóxicos, além do baixo custo e simplicidade do processo (Hassan *et al.*, 2022).

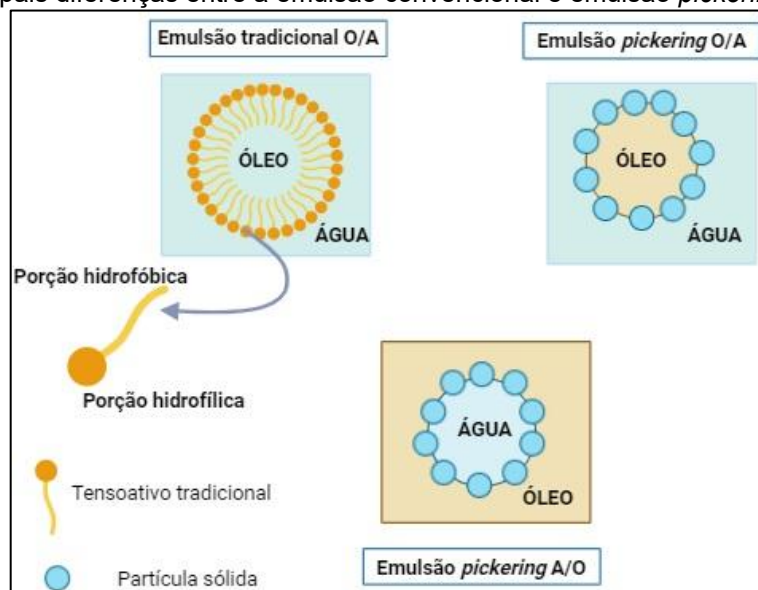
1.5.3 Emulsão *Pickering*

A penetração de muitos ativos na pele acaba sendo difícil e limitada e, devido a isso, há a necessidade de formulações que facilitem a permeação desses ativos na pele. As emulsões, que podem estar apresentadas na forma de loções, cremes ou espumas, são as formas cosméticas mais utilizadas (Marku *et al.*, 2012).

A emulsão é uma mistura de duas fases imiscíveis, sendo uma das fases dispersa em forma de gotícula em outra fase contínua. O contato entre as duas fases é termodinamicamente desfavorável, o que acaba levando a separação de fases. Os principais problemas relacionados a instabilidade de emulsões correspondem a floculação, cremeação, coalescência e amadurecimento de Ostwald. As emulsões tradicionais, devido a presença de tensoativos, que reduzem a tensão superficial, acabam levando a diminuição da coalescência devido a repulsão (Ye *et al.*, 2017). Os tensoativos podem apresentar algumas limitações como formação de espuma, que é indesejável em alguns casos, aprisionamento de ar, interações biológicas e irritação na pele e mucosas (Zhu, 2019).

Diferente das emulsões convencionais, que necessitam da presença de tensoativos, as emulsões *pickering* são estabilizadas por meio da presença de partículas sólidas (com diâmetro maior que 10 nm), evitando fenômenos de instabilidade em emulsões, como é o caso da coalescência, o amadurecimento de Ostwald e a oxidação lipídica. As partículas sólidas são adsorvidas na interface água-óleo da emulsão, como demonstrado na Figura 8. Como exemplo de partículas, pode-se citar as inorgânicas ou sintéticas, como sílica, bentonita, alumina, cera, látex, argila e óxidos de titânio, as quais se apresentam de diferentes formas e tamanhos. Porém, devido a constante busca por formulações naturais, tem-se optado em utilizar matérias-primas que sejam baratas, de origem natural, biodegradáveis e biocompatíveis, como é o caso dos biopolímeros celulose, quitosana, amido e proteínas (Ge *et al.*, 2017).

Diferentes fontes de amido têm sido utilizadas como emulsionantes em emulsão *pickering*, como arroz, milho ceroso, mandioca, trigo e batata, porém foi observado que os grânulos de amido, em seus tamanhos originais, levam a baixa estabilidade das emulsões. Portanto, há necessidade de modificar estruturalmente o amido, para garantir um maior tempo de estabilização das emulsões. Uma das formas mais comuns que tem sido usadas na alteração da estrutura do amido é a esterificação com o uso de anidrido octenil succínico, com a finalidade de aumentar a hidrofobicidade do amido e garantir que não haja separação de fases, uma vez que o amido isolado é altamente hidrofílico. Porém, tem-se evitado cada vez mais o uso de reagentes que possam ocasionar reações alérgicas ou irritação na pele, levando ao desenvolvimento de formulações mais minimalistas (Ge *et al.*, 2017).

FIGURA 8 - Principais diferenças entre a emulsão convencional e emulsão *pickering*

Fonte: A autora

Em 1903, Walter Ramsden observou pela primeira vez a estabilização de emulsões por partículas coloidais e em 1907, Pickering publicou pela primeira vez estudos realizados com esse tipo de formulação. Dois fatores importantes que podem garantir a estabilização das emulsões *pickering* são o tamanho e o ângulo de contato das partículas sólidas. O ângulo de contato adequado permite que a adsorção das partículas na interface óleo-água, já o tamanho influencia na energia de dessorção, sendo que tanto as micropartículas, quanto as nanopartículas permitem a estabilidade das emulsões *pickering* por meses. O amido pode ser utilizado na estabilização das emulsões *pickering*, pois pode ser parcialmente umedecido pelas fases aquosa e oleosa e não é completamente dissolvido em cada fase, permanecendo adsorvido na interface (Shao *et al.*, 2018).

Sem as modificações físicas ou químicas do amido nativo, há dificuldade em estabilizar emulsões a longo prazo devido ao tamanho muito grande, que não forma uma barreira coesa na interface água-óleo, além da alta hidrofiliabilidade do amido. Uma estratégia que é bastante utilizada é a redução do tamanho de partículas do amido, o que melhora a molhabilidade (Ruan *et al.*, 2022).

A diminuição no tamanho das partículas de amido acarreta a diminuição do tamanho das gotículas da emulsão *pickering*, ocasionando uma maior coesão das partículas na interface água-óleo e consequentemente leva a uma maior estabilidade da emulsão, reduzindo a cremação. A emulsão *pickering* também apresenta alta estabilidade frente a coalescência, uma vez que a energia cinética formada no

momento de colisão das gotículas acaba se tornando insuficiente para deslocar as partículas sólidas presentes na interface água-óleo. A maioria das emulsões *pickering* são estabilizadas com micropartículas de sílica, sendo poucas as que utilizam polímeros biodegradáveis (Zhu, 2019).

Vários fatores podem interferir na estabilidade de emulsões *pickering* com partículas de amido, como o tamanho das partículas, se há modificação química ou não do amido, a origem do amido, a concentração de amido, o tipo de óleo, proporção entre as fases aquosa e oleosa, pH, temperatura e força iônica. Em relação ao pH, a diminuição pode levar ao aumento do tamanho das gotículas e o aumento ocasiona a separação de fases, sendo a faixa de pH ideal entre 5,0 e 7,0. Quanto a força iônica, a presença de cloreto de sódio pode levar ao aumento do tamanho das gotículas e a consequente desestabilização da formulação. Já o aumento da temperatura aumenta a probabilidade de ocorrer a oxidação do óleo presente na emulsão (Guo *et al.*, 2022).

1.6 TESTES DE AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA *IN VITRO* PARA COSMÉTICOS

A exposição a substâncias que possam ocasionar irritação cutânea é a principal causa de inflamação da pele. Os problemas que essas substâncias podem ocasionar incluem a dermatite de contato, sensibilização, hiperpigmentação, acne e até mesmo câncer. A avaliação da segurança de produtos cosméticos engloba o conhecimento da toxicidade dos ingredientes e suas compatibilidades com a pele (Corrêa *et al.*, 2022).

Os testes em animais para produtos cosméticos e ingredientes cosméticos foram proibidos na Europa desde 2004 e 2009, respectivamente. Em seguida, surgiram o Regulamento Europeu de Cosméticos N°1223/2009 e o Regulamento específico N°655/2013, com os dados necessários para comprovar a segurança de produtos cosméticos. No Brasil, ainda não existe nenhuma legislação vigente a respeito de testes de segurança, apenas o Guia de Segurança para Produtos Cosméticos, desenvolvido em 2012 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que se baseia em documentos da legislação norte-americana e europeia. Mesmo não existindo nenhuma legislação, no Brasil os testes em animais também já foram substituídos por testes que cumpram o princípio dos 3 R's, que consistem em *Refinement* (reduzir a dor e o estresse em animais), *Reduce* (reduzir o número de

animais) e *Replacement* (substituição por outro método que não utilize animais, que são os métodos *in vitro*) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2012; Barthe *et al.*, 2021).

Porém, embora não exista legislação específica para segurança em cosméticos, no Brasil, para produtos cosméticos em que é empregada a nanotecnologia especificamente, deve-se seguir os critérios estabelecidos pelo Guia nº 63/2023, formulado pelo órgão regulamentador ANVISA. Este guia aborda como deve ser avaliada a segurança durante a caracterização físico-química e biológica do nanomaterial, bem como a avaliação da segurança biológica do produto acabado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2023).

1.6.1 Ensaio da Membrana Corioalantoide de Ovo Embrionado de Galinha ou *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)*

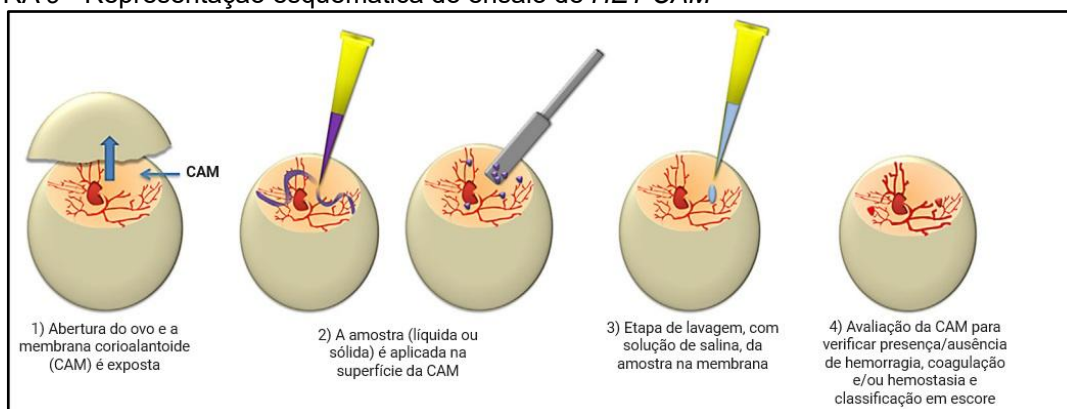
O ensaio vascular da membrana corioalantoide, também denominado de teste do ovo de galinha foi proposto pela primeira vez por Luepke; Kemper (1986). O nome do teste se deve a sigla *CAM* (*chorioallantoic membrane*) estar diretamente relacionada com a membrana vascular respiratória encontrada em ovos fertilizados de galinha, o qual substituiu o teste em que era realizado no tecido conjuntival dos olhos dos coelhos (teste de Draize) (Wilson; Ahearne; Hopkinson, 2015).

O *HET-CAM* é um teste qualitativo, que avalia possíveis danos vasculares na conjuntiva após a exposição a amostra, e que podem estar correlacionados com danos na córnea. O protocolo do ensaio envolve a aplicação da amostra (0,2-0,3 mL), com enxágue para a retirada do excesso, e a posterior observação de alterações que podem ocorrer na morfologia da membrana corioalantoide. Algumas variáveis podem interferir nos resultados, como o tempo de incubação dos ovos, a umidade relativa, número de replicatas, a raça da galinha (embora a raça Leghorn branca seja a mais usada), critérios para a seleção dos ovos (idade/peso), rotação dos ovos, método de abertura da casca do ovo, uso de controle positivo e negativo, tempo de exposição a substância teste e a concentração da amostra. Geralmente os eventos vasculares, como vasoconstrição, hemorragia e/ou coagulação são observados em segundos ou minutos e isto é pontuado e classificado de acordo com a intensidade (Wilson; Ahearne; Hopkinson, 2015).

Os efeitos observados nos pequenos vasos e proteínas do tecido mole da membrana corioalantoide podem ser comparáveis aos efeitos que antes eram realizados diretamente nos olhos de coelhos. A membrana corioalantoide é constituída por artérias, vasos e capilares e dependendo do potencial de irritação da substância teste, é possível observar lesões e/ou inflamações. As vantagens desse teste incluem a curta duração e baixo custo. Já as limitações são a impossibilidade de avaliação de efeitos a longo prazo e de sinais reversíveis e ausência de filme lacrimal, isso pode aumentar a possibilidade de resultados falsos positivos (Cazedey *et al.*, 2009).

Primeiramente, são necessários ovos fertilizados de galinha da raça Leghorn, livres de patógenos específicos (*SPF, specific pathogen free*) para o teste. Em seguida esses ovos devem ser incubados por 10 dias à temperatura de $38 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de 70%. As etapas do processo, ilustradas na Figura 9, consistem na remoção da casca do ovo ao redor da câmara de ar, evidenciando, assim, a membrana da casca. Em seguida, há aplicação da amostra e após 20 segundos de contato, é feita a lavagem da membrana corioalantoide com solução salina isotônica a 37 °C. Por um período de 5 minutos, é observada a presença/ausência de sinais vasculares e no caso da presença, é feita a medida da intensidade através de escore, com base no tempo de aparecimento (Oliveira *et al.*, 2012).

FIGURA 9 - Representação esquemática do ensaio de *HET-CAM*



Fonte: **Adaptado de** WILSON, S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*, [s. l.], v. 327, n. November, p. 32–46, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.003>. Acesso em: 26 fev. 2024.

1.6.2 Ensaios de Citotoxicidade pela Avaliação da Viabilidade Celular – MTT e Vermelho Neutro

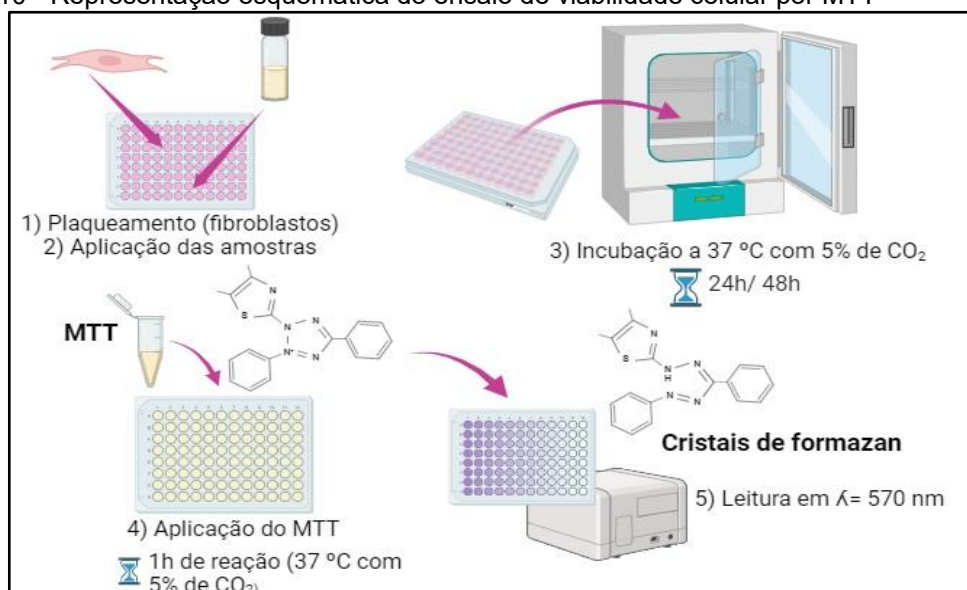
A maioria dos ensaios para avaliar a citotoxicidade *in vitro* consiste no cultivo de células em monocamada e avaliação de citotoxicidade em resposta a exposição a

uma amostra. Entre os métodos de avaliação da citotoxicidade estão a incorporação de timidina, proteína azul brilhante de Coomassie, violeta de cristal e reagente de Lowry, ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ensaios MTT), lactato desidrogenase (LDH), teste com fluoresceína (FL), exclusão com azul de tripan, coloração fluorescente com iodeto de propídio e testes de captação/liberação de vermelho neutro. Cada um desses métodos apresenta suas vantagens e limitações, sendo recomendada a combinação de dois métodos para avaliação da citotoxicidade (Wilson; Ahearne; Hopkinson, 2015).

O reagente MTT corresponde a um sal que apresenta em sua estrutura quatro átomos de nitrogênio cercados por três anéis aromáticos incluindo duas porções fenil e um anel tiazolil. Esse ensaio com a utilização do MTT foi realizado pela primeira vez por Mosmann *et al.* (1983). Na reação de redução do MTT (solúvel e com coloração amarela), ocorre a ruptura do anel tetrazol pela enzima succinato desidrogenase, presente na mitocôndria das células viáveis, e a consequente formação de uma molécula, de coloração azul-violeta, que é insolúvel em água, denominada de formazan, como demonstrado na Figura 10. O reagente MTT consegue penetrar através da membrana celular, bem como da membrana mitocondrial interna de células viáveis, devido a presença de carga positiva na sua estrutura, além da lipofilicidade que essa molécula apresenta (Corrêa *et al.*, 2022; Ghasemi *et al.*, 2021).

A medição é feita com base na característica cromogênica, que pode ser visualizada na reação de redução do MTT. O formazan, por ser insolúvel em água e se apresentar na forma de cristais, precisa ser solubilizado com o uso de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, é feita a medida da densidade óptica (DO) por um leitor de microplacas, em comprimento de onda de 570 nm, que corresponde ao comprimento de maior absorção do formazan. Os valores de densidade óptica podem ser considerados como uma representação da concentração de formazan e, consequentemente, da redução intracelular do MTT (Ghasemi *et al.*, 2021; (Pereira *et al.*, 2023).

FIGURA 10 - Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular por MTT

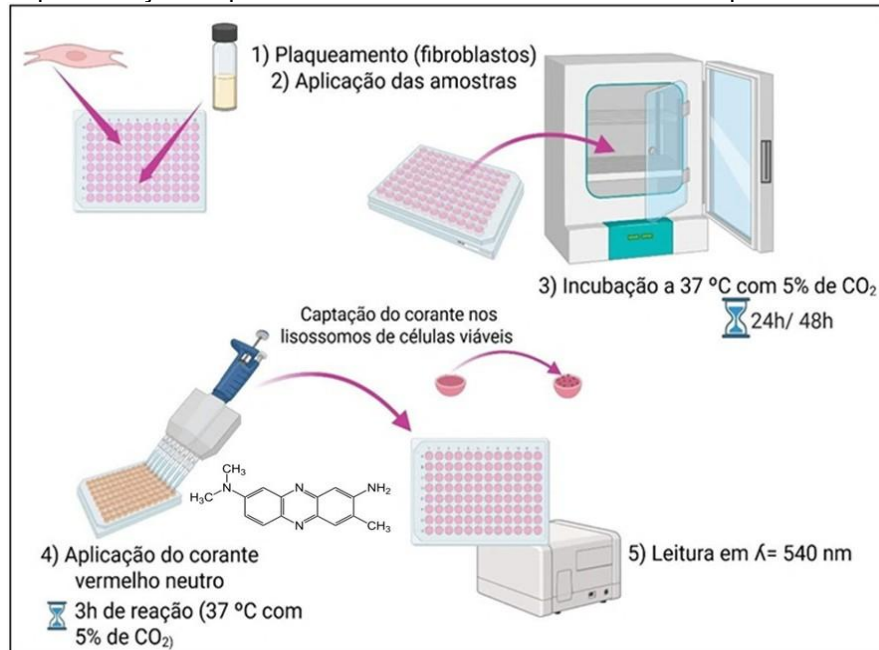


Fonte: A autora

Já o princípio da técnica de captação do corante vermelho neutro baseia-se na capacidade de células viáveis incorporarem o vermelho neutro. Por ser de natureza catiônica, esse corante se difunde através da membrana plasmática (difusão passiva) e se liga através de interações hidrofóbicas eletrostáticas à matriz lisossomal, de caráter aniônico, devido a presença de grupos fosfato. As substâncias que apresentam algum nível de toxicidade celular podem alterar a superfície celular ou as membranas dos lisossomos, e essas alterações podem gradualmente se tornarem irreversíveis. Isso ocasiona a morte celular e/ou inibição do crescimento celular, e com isso o vermelho neutro não é mais retido nos vacúolos citoplasmáticos e a membrana plasmática não atua mais como uma barreira para reter o corante no interior das células. A concentração de corante captada pelas células é diretamente proporcional ao número de células vivas, e devido a isso a citotoxicidade é expressa como a redução da concentração da absorção de vermelho neutro após exposição às amostras tóxicas (Corrêa *et al.*, 2022; Patrícia; da Rocha, 2015; Stokes *et al.*, 2008).

Para o teste do vermelho neutro, é utilizada uma placa de 96 poços e a leitura é realizada em espectrofotômetro, como demonstrado na Figura 11.

FIGURA 11 - Representação esquemática do ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro



Fonte: A autora

CAPÍTULO 2 – PREPARO, COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE DIFERENTES TIPOS DE BAGAÇOS DE MALTE E OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DOS BAGAÇOS DE MALTE

RESUMO: O bagaço de malte é o principal subproduto da indústria cervejeira, sendo seu uso destinado principalmente à suplementação em rações animais. Porém, este subproduto apresenta uma rica composição e alguns dos principais componentes correspondem aos compostos fenólicos, que podem estar associados a ações antioxidante e prebiótica. Como o bagaço de malte tem sido pouco explorado na área cosmética e considerando essas ações biológicas relevantes em ingredientes cosméticos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil e a quantidade total de compostos fenólicos nos extratos de bagaços de malte (EBMP e EBMC) por método cromatográfico (UHPLC-DAD) e espectrofotométrico por Folin-Ciocalteu, respectivamente, além das ações antioxidante pela captura dos radicais ABTS•+ e DPPH• e prebiótica pela curva de crescimento do microrganismo *Lactobacillus acidophilus*. Além disso, a citotoxicidade em fibroblastos 3T3 foi avaliada para EBMP e EBMC. O EBMC apresentou a maior concentração de compostos fenólicos e consequentemente a maior inibição dos radicais ABTS•+, seguido pelo EBMP. Porém como o EBMP é produzido em maior quantidade mundialmente, somente este foi selecionado para avaliação da atividade prebiótica e na avaliação do perfil de compostos fenólicos. O método para avaliação do perfil de fenólicos no extrato mostrou que o ácido gálico foi o composto majoritário. Além da atividade antioxidante, o EBMP apresentou atividade prebiótica para *Lactobacillus acidophilus*. O extrato apresentou viabilidade celular > 50% para fibroblastos 3T3 em concentrações inferiores a 5 mg.mL⁻¹, sendo indicado seu uso nessas concentrações em produtos cosméticos. Portanto, EBMP foi considerado uma opção viável e sustentável de ativo antioxidante e com ação prebiótica para cosméticos.

Palavras-chave: Pilsen. Antioxidantes. Compostos fenólicos. Subproduto. Cerveja.

2.1 INTRODUÇÃO

O bagaço de malte (BM) é o principal subproduto gerado na indústria cervejeira (20 kg.100 L⁻¹ de cerveja), correspondendo a 80% do total de resíduos gerados, e obtido na etapa de mosturação. A aplicação principal de BM tem sido na suplementação de rações animais. A subutilização do bagaço de malte deve-se ao alto teor de umidade, somado a presença de açúcares fermentáveis na sua composição, o que pode levar a contaminação microbiana caso o material não seja seco e tratado. Porém, esse subproduto é rico em carboidratos, proteínas, fibras e polifenóis e especialmente esses últimos são responsáveis pela atividade antioxidante do bagaço de malte. Os principais compostos fenólicos presentes em BM são os

ácidos *p*-hidroxicinâmicos, como os ácidos gálico, ferúlico e *p*-cumárico, e estes estão acumulados nas paredes celulares das cascas dos grãos de cevada (Alonso-Riaño *et al.*, 2020; Petrón *et al.*, 2021).

Há uma crescente busca por matérias-primas naturais e sustentáveis na fabricação de cosméticos (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020). O bagaço de malte já tem sido explorado em nutracêuticos, porém para aplicação em produtos cosméticos ainda tem sido pouco estudado (Macias-Garbett *et al.*, 2021). Por apresentar uma rica composição e ser um material barato e produzido em grande quantidade, o presente estudo teve o objetivo de obter o extrato fenólico de bagaço de malte pelos métodos de maceração e Soxhlet, bem como caracterizar este material através da quantificação do teor de fenólicos e flavonoides totais, e avaliar as atividades antioxidante por ABTS•+ e DPPH• e prebiótica pela curva de crescimento bacteriana, além de outras análises (*FTIR*, análise térmica e UHPLC) para potencial uso em produtos cosméticos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material

Os quatro tipos de bagaços de malte, que correspondem ao Pilsen (BMP), às misturas Centeio + Golden + Pale Ale + Caraaroma (BMC), Pilsen + Pale Ale (BMP + PA) e Pilsen + Caraamber + Carared + Caramunich + Carapils (BMP + C), foram doados pela Koch Cervejaria, localizada em Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Para a extração de lipídeos do bagaço de malte, foi usado o solvente éter de petróleo P.A (LabSynth – Diadema, São Paulo, Brasil). Para as demais análises da composição centesimal, foram usados ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, os quais pertencem a marca Êxodo Científica - Sumaré, São Paulo, Brasil. O álcool etílico absoluto P.A e a acetona P.A (Reatec – Colombo, Paraná, Brasil e Êxodo Científica - Sumaré, São Paulo, Brasil, respectivamente) foram usados no processo de extração. Os radicais ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico) e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda – Cotia, São Paulo, Brasil) foram usados para avaliação do potencial antioxidante dos extratos. Além dos radicais, os outros reagentes presentes no teste de avaliação antioxidante foram persulfato de potássio

P.A e fosfato de sódio monobásico anidro P.A (Reatec – Colombo, Paraná, Brasil), fosfato de sódio dibásico anidro P.A (Casa da Química Indústria e Comércio Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil). O reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio anidro P.A (Dinâmica Química Contemporânea Ltda – Indaiatuba, São Paulo, Brasil e Casa da Química Indústria e Comércio Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil, respectivamente) foram utilizados na quantificação do teor de fenólicos totais. Para a quantificação do teor de flavonoides totais, o acetato de potássio P.A e o cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) (Neon Reagentes Analíticos, Suzano, São Paulo, Brasil e LabSynth – Diadema, São Paulo, Brasil, respectivamente) foram usados.

Os padrões de ácido gálico, ácido ferúlico e quercetina (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Darmestádio, Alemanha) foram usados nos testes de quantificação do teor de fenólicos totais, flavonoides totais, ABTS e DPPH, e na validação de método analítico para quantificação de compostos fenólicos. Para o processo de desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação dos compostos fenólicos no extrato, os reagentes utilizados foram Acetonitrila grau HPLC (Neon Reagentes Analíticos, Suzano, São Paulo, Brasil), Metanol grau HPLC (Êxodo Científica - Sumaré, São Paulo, Brasil) e Ácido fórmico 98% P.A (Neon Reagentes Analíticos, Suzano, São Paulo, Brasil), já a coluna usada como fase estacionária foi uma coluna C_{18} (Phenomenex, Synergi 4u Polar-RP 80 A, tamanho 250 mm x 4,6 mm).

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, a linhagem celular 3T3 de fibroblastos de camundongos foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro e os reagentes MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e tripsina, e o corante vermelho neutro foram adquiridos através da empresa Sigma-Aldrich (Darmstadt, Darmestádio, Alemanha) e Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, São Paulo), respectivamente. Ainda nos ensaios de citotoxicidade, foram usados o soro fetal bovino, o antibiótico penicilina/estreptomicina 10000 UI.mL^{-1} e 10 mg.mL^{-1} respectivamente, e o meio Dulbecco MEM (DMEM) (Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil). Nos ensaios de atividade antimicrobiana, foram usadas as cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e o fungo *Candida albicans* ATCC 1023, e o meio de cultura Mueller-Hinton (Kasvi – São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Já para o teste de avaliação de atividade prebiótica, a bactéria *Lactobacillus acidophilus* foi doada pelo Prof. Dr. Marcos Pileggi e o meio usado para o cultivo desta bactéria foi o ágar MRS, da

HiMedia (Mumbai, Maharashtra, India). Para preparo do caldo MRS, os sais usados foram acetato de sódio P.A (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil), fosfato de potássio dibásico (Êxodo Científica - Sumaré, São Paulo, Brasil), sulfato de magnésio P.A e sulfato de manganês P.A adquiridos da empresa Reagen (Colombo, Paraná, Brasil), o tensoativo usado foi o Tween® 80 da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Darmestádio, Alemanha) e como fonte de carbono para o controle positivo foi usada a glicose anidra da marca Merck (Darmstadt, Darmestádio, Alemanha). Para suplementação do caldo MRS, foram usados o extrato de levedura, extrato de carne e peptona (HiMedia, Mumbai, Maharashtra, India).

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Preparo dos diferentes tipos de bagaços de malte

Os bagaços de malte BMP, BMC, BMP + PA e BMP + C foram coletados úmidos da cervejaria Koch, foram secos em estufa a 60 ± 2 °C por um período total de 72 horas, conforme descrito no trabalho de Ludka *et al.* (2023). Após esse tempo, os bagaços foram triturados em liquidificador e em seguida, foi feita a padronização do tamanho das partículas, com o uso de tamis granulométrico de 30 mesh (0,59 mm). Os bagaços de malte foram armazenados em sacos plásticos, sob refrigeração (temperatura de 8 ± 2 °C) para serem usados em análises posteriores.

2.2.2.2 Composição centesimal dos bagaços de malte

Todas as análises descritas nessa subseção estão presentes no Manual de Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (4ª edição) do Instituto Adolfo Lutz, com algumas adaptações, e foram realizadas em triplicata.

2.2.2.2.1 Determinação do teor de umidade

Os bagaços de malte, previamente preparados, foram pesados em pesa-filtros antes (2,5g) e após a secagem em estufa a 105 ± 2 °C, até peso constante. As massas

foram registradas e o cálculo do teor de umidade foi feito com base na diferença entre as massas inicial e final, considerando este valor em porcentagem.

2.2.2.2.2 Determinação do teor de resíduo mineral fixo ou teor de cinzas

Os bagaços de malte foram pesados em cadinhos de porcelana, pré-incinerados, antes (2,5g) e após a incineração em forno mufla a 600 ± 5 °C por 3 horas. Antes do procedimento na mufla, foi feita a pré-incineração em bico de Bunsen por 5 minutos, para evitar o extravasamento do material quando aquecido em temperaturas muito elevadas. As massas foram registradas e o cálculo do teor de cinzas foi feito com base na diferença entre as massas inicial e final, considerando este valor em porcentagem.

2.2.2.2.3 Determinação do teor de lipídeos

Para a avaliação do teor de lipídeos nos bagaços de malte foi optado pelo método a quente, com o uso de extrator Soxhlet. O solvente utilizado na extração foi o éter de petróleo e a quantidade de bagaço de malte pesada nos cartuchos foi 2,5g. O tempo total de extração foi de 3 h, e mais 1 h em estufa a 105 ± 2 °C, para garantir a completa evaporação do solvente, restando somente o lipídeo da amostra no fundo do balão de destilação. Foram registradas as massas do balão vazio e após a extração, sendo o teor de lipídeos calculado em porcentagem.

2.2.2.2.4 Determinação do teor de proteínas

O método de Kjeldahl modificado foi selecionado para a quantificação de proteínas nas amostras. Nesse método, a primeira etapa consistiu na digestão, em que a amostra (0,5g) foi colocada em contato com 5 mL ácido sulfúrico concentrado, e com o catalisador (1,5g) dessa reação (K_2SO_4 : $CuSO_4$, 3:1 m/m), e em seguida essa mistura foi aquecida em bloco digestor (QUIMIS, modelo Q327M, Diadema, São Paulo Brasil) gradativamente até temperatura de 350 °C. Nessa primeira etapa, a coloração foi alterada de verde-azulada para transparente (formação de sal amoniacal).

Na segunda etapa (destilação), após atingir temperatura ambiente, o produto, obtido da reação química anterior, foi diluído em 10 mL de água destilada e neutralizado, em destilador de nitrogênio (TECNAL, modelo TE-0363, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com solução de hidróxido de sódio a 50% (25 mL), para a liberação da amônia, apresentando uma coloração escura devido a formação de óxido de cobre. O destilado foi coletado em erlenmeyer, já contendo a solução de ácido bórico a 2% (10 mL) com indicador misto (50 µL de vermelho de metila 0,1% e 250 µL de verde de bromocresol 0,1%, ambos diluídos em álcool etílico absoluto).

Na terceira e última etapa, que corresponde a titulação, foi usado o ácido clorídrico 0,1 N ($f_c = 1,0446$) para reagir com a amostra, ocorrendo a mudança de coloração de azul para vinho, sendo determinada a quantidade de nitrogênio presente nas amostras pelo excesso de ácido usado na titulação. O fator de correção utilizado no cálculo para a conversão da quantidade de nitrogênio em proteínas foi 6,25.

2.2.2.2.5 Determinação do teor de fibras brutas

Para a quantificação das fibras brutas totais nas amostras, foi realizado o método de saqueta. Para isso, foi registrada a massa inicial da saqueta (dimensões de 5cm x 7cm) e em seguida, foi pesado 2,5g da amostra, sendo esta posteriormente selada. As saquetas foram imersas em acetona por 15 minutos e secas em estufa a 105 ± 2 °C por 6 horas. Em seguida, as amostras foram colocadas em bandejas, encaixadas em digestor de fibras (MARCONI, modelo MA-444/CI, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com agitação e aquecimento a 95 °C por 40 minutos, em contato com 100 mL de ácido sulfúrico $6,8 \text{ mL.L}^{-1}$. Após os 40 minutos, foi retirada a solução quente e foi feita a lavagem com água destilada. O processo foi repetido em meio básico com 100 mL hidróxido de sódio $12,52 \text{ g.L}^{-1}$ e após os 40 minutos de extração, novamente foi feita a lavagem com água destilada.

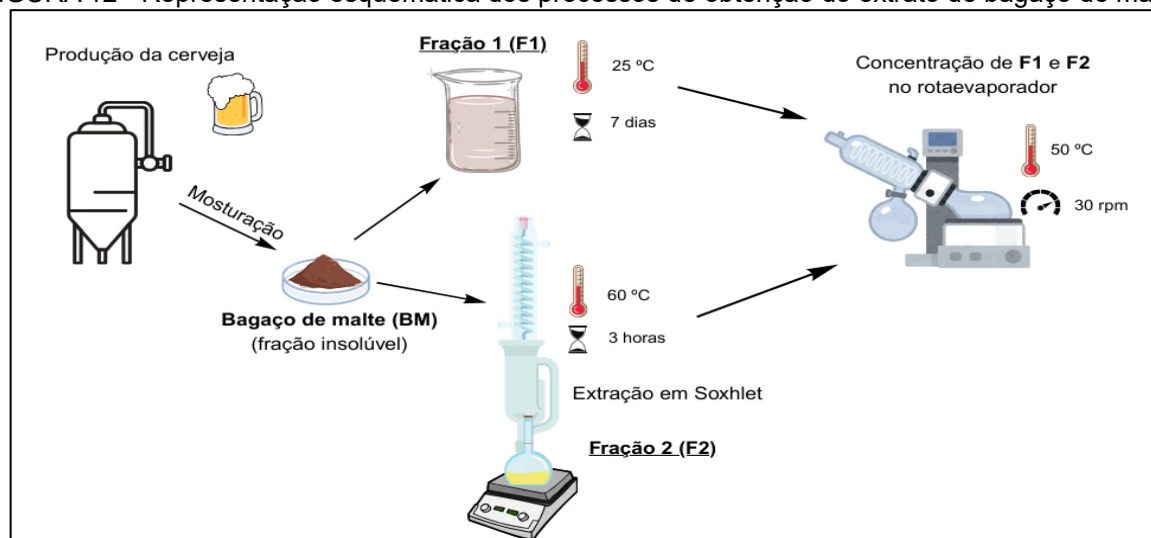
O processo de digestão foi alternado entre as soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio a cada 40 minutos, com lavagem entre as adições, por um período total de 4 horas. Após a última lavagem, as saquetas foram retiradas do suporte, colocadas em contato com 10 mL de acetona por 10 minutos e secas em estufa a 105 ± 2 °C por 6 horas, para garantir a completa evaporação do solvente. Após atingir a temperatura ambiente, a saqueta foi pesada e o conteúdo da saqueta foi transferido

para cadinho de porcelana, para avaliação do teor de resíduo mineral fixo (matéria orgânica), necessário para o cálculo da quantidade de fibras brutas nas amostras.

2.2.2.3 Obtenção dos extratos a partir dos bagaços de malte

Os dois métodos usados no processo de extração dos compostos fenólicos, presentes nos bagaços de malte, foram maceração a frio e extração a quente com Soxhlet, conforme está exposto na Figura 12. A finalidade de utilizar os dois processos foi a de extrair tanto os compostos fenólicos mais apolares, quanto os polares, utilizando solventes com diferentes polaridades para isso.

FIGURA 12 - Representação esquemática dos processos de obtenção do extrato de bagaço de malte



Fonte: A autora

Para a maceração, os solventes utilizados foram álcool etílico: água (mistura hidroalcoólica), na proporção de 70:30 (v/v), sendo que foram pesados 20g dos bagaços de malte secos e triturados, e estes foram colocados em contato com 100 mL da solução hidroalcoólica, por 7 dias a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em repouso.

Após o período de 7 dias, o macerado foi filtrado (fração hidroalcoólica) e os bagaços de malte, úmidos pelo contato com os solventes, foram secos a 60 ± 2 °C por 8 horas, para serem condicionados nos cartuchos, usados na extração com extrator Soxhlet. Após a evaporação completa dos solventes nos bagaços de malte, foram pesados 2,5g das amostras nos cartuchos e estes colocados em contato com acetona, em balão de 250 mL acoplado ao extrator Soxhlet e condensador, durante 3 horas,

aquecido em manta de aquecimento (FISATOM, modelo 22E, São Paulo, Brasil) a 60 °C, para a extração dos compostos fenólicos com características apolares, que não tinham sido extraídos pelo método de maceração.

Após o período de 3 horas foi necessária a etapa de evaporação rotativa em rotaevaporador (FISATOM, modelo 801, São Paulo, Brasil) a 50 ± 2 °C com velocidade de rotação de 30 rpm, tanto da fração cetônica (obtida no processo a quente), quanto da fração hidroalcoólica (obtida na maceração), com a finalidade de promover a evaporação do excesso de solventes e concentrar os compostos fenólicos presentes em ambas as frações. Em seguida, após o resfriamento, as frações cetônicas e hidroalcoólicas foram unidas em frascos de vidros âmbar, os quais foram armazenados sob refrigeração (8 ± 2 °C) para análises posteriores.

Para algumas análises, como análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho, foi necessária a liofilização dos extratos.

2.2.2.4 Caracterização dos extratos

As análises realizadas com os quatro tipos de bagaços de malte incluem: teor de fenólicos, análise da atividade antioxidante, análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho. Para as demais análises foram selecionados somente os dois extratos com maiores concentrações de compostos fenólicos e maiores porcentagens de inibição dos radicais ABTS•+ (EBMP e EBMC), ou seja, aqueles com atividade antioxidante promissora à aplicação pretendida.

2.2.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O método utilizado para quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato foi o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Para isso foi feita a diluição do extrato em solução hidroalcoólica (etanol:água, 70:30 v/v) na concentração de $50 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. 200 μL da amostra foi colocada em tubo de ensaio em contato com 7 mL de água destilada, 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e mais 2,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 10,6% (% m/v). Após 5 minutos de reação, em banho-maria (SOC. FABBE LTDA, modelo 169, São Paulo, Brasil) a temperatura de 50 °C, houve mudança de coloração de verde para azul e o conteúdo do tubo foi

transferido para a cubeta de quartzo, para a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (BEL PHOTONICS, modelo UV-M51, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com *software* UV-Professional 2, e comprimento de onda $\lambda=715$ nm. O teste foi realizado em triplicata e para a construção da curva analítica, foi utilizado o padrão de ácido gálico nas concentrações 800; 600; 400; 200; 100; 50 e 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

2.2.2.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais nos extratos foi utilizado o método colorimétrico, descrito por Chang *et al.* (2002), com algumas modificações. Assim como na quantificação de compostos fenólicos, para fins comparativos, também foi preparada a diluição do extrato, na concentração de 50 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, em solução hidroalcoólica 70:30 (v/v). Após o preparo da amostra, 500 μL do extrato foi colocado em contato com 100 μL da solução de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$) 10%, 100 μL de acetato de potássio 1 M e 2,8 mL de água destilada. O tempo de reação dessa mistura, antes da leitura, foi de 30 minutos a temperatura ambiente. Após os 30 minutos, foi lida a absorbância em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS, modelo UV-M51, Piracicaba, São Paulo, Brasil), em comprimento de onda $\lambda=415$ nm. O teste foi realizado em triplicata e para a construção da curva analítica, foi utilizado o padrão de quercetina nas concentrações 120; 100; 80; 60; 40; 20; 10 e 4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

2.2.2.4.3 Análise térmica dos extratos

Para realizar a análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos extratos, estes foram acondicionados em células calorimétricas de alumina (~500 mg). O instrumento STA 600 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado previamente usando índio (In; P.F.= 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54$ J.g⁻¹) como padrão. Os termogramas e curvas de DSC foram obtidos sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C.min⁻¹ e a faixa de temperatura utilizada foi de 20 °C a 500 °C.

2.2.2.4.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) dos extratos

As amostras liofilizadas foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no espectrofotômetro (SHIMADZU, modelo IR Prestige21, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com parâmetro de 32 scan.min⁻¹ e resolução de 4 cm^{-1} .

2.2.2.5 Testes para avaliação *in vitro* de atividade antioxidante, antimicrobiana e prebiótica e análises de citotoxicidade em linhagem de fibroblastos 3T3

2.2.2.5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos

Para analisar o potencial antioxidante das amostras foram realizados tanto o teste de captura dos radicais ABTS•+, quanto dos radicais DPPH•. Para os radicais ABTS•+, foram usadas as concentrações de 250; 220; 200; 170; 150; 120; 100; 70 e 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para os extratos, os quais foram diluídos em solução tampão fosfato 10 mM (pH=7,4). Para a reação com as amostras, foram preparadas soluções de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM, e misturadas em frasco âmbar 12 horas antes do teste, para a formação dos radicais ABTS•+ (mudança de coloração de verde para azul escuro). Após as 12 horas, foi feita a diluição da mistura da reação, para um volume total de 100 mL, com tampão fosfato 10 mM (pH=7,4). Foram feitos controle positivo (somente a solução de ABTS) e negativo (somente tampão fosfato 10 mM) para fins comparativos, assim como a presença das amostras com e sem exposição aos radicais ABTS•+. Todo o teste foi realizado ao abrigo de luz e foi utilizado espectrofotômetro com leitor de microplacas (BIOTEK, modelo Synergy H1 Hybrid Reader), com *software* Gen5.2, com comprimento de onda de $\lambda=734$ nm, para a leitura dos valores de absorbância. Como padrão, para fins comparativos, foi utilizada a quercetina nas concentrações 16; 8; 4; 1,6; 0,8; 0,4; 0,16; 0,08 e 0,04 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e o teste foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações das amostras citadas acima.

Já para os radicais DPPH•, foram usadas as concentrações 5000; 4400; 4000; 3400; 3000; 2400; 2000; 1400 e 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para os extratos, os quais foram diluídos em álcool etílico absoluto. Para a reação com as amostras, foi preparada a solução

de DPPH 120 μM em etanol absoluto. Foram feitos controle positivo (somente a solução de DPPH) e negativo (somente álcool etílico absoluto) para fins comparativos, assim como a presença das amostras com e sem exposição aos radicais DPPH $\cdot$. Todo o teste foi realizado ao abrigo de luz e foi utilizado espectrofotômetro com leitor de microplacas, com comprimento de onda de $\lambda=531\text{ nm}$, para a leitura dos valores de absorbância. Como padrão, para fins comparativos, foi utilizada a quercetina nas concentrações 16; 8; 4; 1,6; 0,8; 0,4; 0,16; 0,08 e 0,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o teste foi realizado em triplicata para cada uma das concentrações das amostras citadas acima.

2.2.2.5.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos

Para a avaliação da citotoxicidade, foram usados somente EBMP e EBMC e a linhagem celular para esse estudo foi a 3T3 (fibroblastos de camundongos). Foram usados dois métodos para avaliação da citotoxicidade, o MTT e vermelho neutro, e foram avaliados dois tempos de exposição para cada uma das amostras e nos dois métodos, que correspondem a 24 horas e 48 horas. As concentrações dos extratos testados, tanto para o MTT, quanto para o vermelho neutro, foram 10; 5; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,075; 0,050; 0,025 e 0,015 mg.mL^{-1} . As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 34 mmol.L^{-1} de bicarbonato de sódio e antibiótico (penicilina 10000 UI.mL^{-1} e estreptomicina 10 mg.mL^{-1}) e mantidas a 37° C em estufa umidificada com 5% de CO_2 (SANYO, modelo MCO-19AIC, Moriguchi, Osaka, Japão). A concentração de células usada nos testes foi de $0,20 \times 10^5$ células/poço, em placas de 96 poços. Foi usado somente o meio de cultivo como controle negativo. Para o teste do MTT, as células, após a exposição aos extratos, foram colocadas em contato com 100 μL da solução de MTT 0,5 mg.mL^{-1} por 1 hora a 37 °C, em estufa com 5% de CO_2 . Após 1 hora, a solução de MTT foi retirada, sendo adicionado 100 μL de dimetilsulfóxido para a solubilização dos cristais de formazan, formados pelas células viáveis. A leitura dos valores de absorbância foi feita no comprimento de onda $\lambda=570\text{ nm}$ e o teste foi realizado em octuplicata para cada uma das amostras.

No teste com o uso do corante vermelho neutro seguiu-se o protocolo estabelecido por Repetto; Del Peso e Zurita (2008), com algumas modificações. Primeiramente foi preparada a solução de vermelho neutro na concentração 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

¹ e o volume desse corante adicionado às células, após exposição com as amostras, foi de 100 µL. O período de exposição das células ao corante, para permitir a incorporação do vermelho neutro no interior das células, foi de 3 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO₂. Após as 3 horas, o corante foi retirado e foi adicionado 150 µL da solução descorante de vermelho neutro (10 mL de água purificada, 10 mL de etanol 96% e 200 µL de ácido acético glacial). As placas foram agitadas cuidadosamente por 10 minutos a temperatura ambiente, para garantir a homogeneidade do corante nos poços das placas. A leitura dos valores de absorbância foi feita em comprimento de onda $\lambda=540$ nm e o teste foi realizado em octuplicata para cada uma das amostras.

2.2.2.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Para esse teste, foram usados somente EBMP e EBMC e foram usadas as cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e o fungo *Candida albicans* ATCC 1023. Para as bactérias, o meio de escolha foi caldo Mueller-Hinton e para o fungo o caldo Mueller-Hinton, com 2% de glicose. As concentrações de extratos testadas foram 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,0312 mg.mL⁻¹. Em tubos com volume de 1 mL, foi adicionado 50µL da suspensão microbiana padrão 0,5 da escala de MacFarland (1x10⁸ UFC.mL⁻¹), diluída 1:10. O teste foi feito em triplicata, com controles positivo e negativo de crescimento do microrganismo. Após período de incubação de 24 horas a 35°C foram transferidos 200 µL dos tubos para as placas de 96 poços e três leituras da densidade óptica (DO) foram feitas, em comprimento de onda $\lambda=630$ nm, no espectrofotômetro com leitor de microplacas de multidetecção híbrida SynergyTMH1, com *software* Gen5.2.

2.2.2.5.4 Avaliação da inibição da formação de biofilme

O teste foi realizado em triplicata, através da técnica da microplaca corada com cristal violeta 0,5%, adaptada de Stepanovic *et al.* (2000). Para isso, foi usado somente o microrganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pois os demais, que foram usados para atividade antimicrobiana, não produziram biofilme. As soluções

com os extratos foram preparadas na concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na placa de microtitulação, foi adicionado 20 μL da suspensão bacteriana no padrão 0,5 da escala de MacFarland ($1 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) e em seguida a placa foi incubada a 35 °C por 1 hora, para o início da formação de biofilme, em seguida foi adicionado 200 μL do caldo Mueller-Hinton com os extratos de bagaço de malte. Após o período de incubação a 35°C por 24 horas foi feita a lavagem da placa com salina estéril e em sequência a adição de 200 μL de metanol por 20 minutos para fixação do biofilme. Após a retirada do metanol, 200 μL do corante violeta de genciana a 0,5% foi colocado nos poços das placas e após 15 minutos em contato com o corante, as placas foram novamente lavadas com salina estéril e em seguida, foi adicionado 200 μL de etanol absoluto. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram demonstrados através de fotos das placas, uma vez que não houve inibição do biofilme, não sendo possível calcular a densidade óptica.

2.2.2.5.5 Avaliação da atividade prebiótica do extrato Pilsen (EBMP)

Na análise da atividade prebiótica, o microrganismo utilizado foi *Lactobacillus acidophilus* e o meio de cultivo, necessário para o crescimento da bactéria, foi o caldo MRS. Seguiu-se o método descrito por Bonifácio-Lopes *et al.* (2023), com modificações. O controle positivo foi o caldo MRS completo, com a adição da fonte de carbono (glicose) e a presença da bactéria, já no controle negativo foi feita a adição somente do extrato Pilsen (EBMP) no caldo sem glicose e sem a adição do microrganismo. Nos frascos em que foram adicionados o extrato junto com a bactéria, foi usado o caldo MRS sem glicose, sendo a glicose substituída pela amostra. Todos os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm em *shaker* (KUHNER, modelo LT-X, Birsfelden, Basel, Suíça), com temperatura controlada de 37 °C. Foi feita a curva de crescimento, com o valor de densidade ótica (DO) inicial de 0,05 (ajustada a partir de um pré-inóculo), e os valores subsequentes da DO foram obtidos a partir de leituras, feitas em triplicata, a cada hora por um período total de 18 horas, que foi o tempo em que a bactéria *Lactobacillus acidophilus* atingiu a fase estacionária. As concentrações do EBMP avaliadas foram 1%; 1,5% e 2% (% , v/v). Os valores de DO foram obtidos por meio de espectrofotômetro (VWR, modelo UV-1600PC, Pensilvânia, Estados Unidos) com comprimento de onda $\lambda=600 \text{ nm}$.

2.2.2.6 Desenvolvimento e validação de método analítico para identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato de bagaço de malte por UHPLC-DAD

Para o desenvolvimento do método analítico, foi usado como referência o trabalho de Becker; Stegmüller e Richling (2022), porém foram feitas modificações. O equipamento utilizado durante o desenvolvimento e validação de método analítico foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU, modelo Nexera-i LD-2040C, Quito, Japão), com *software LabSolutions Lite*.

Os parâmetros estabelecidos no desenvolvimento do método analítico estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Parâmetros cromatográficos usados para avaliação do perfil de compostos fenólicos no extrato de bagaço de malte

Parâmetros avaliados	Descrição
<i>Detecção</i>	UV ($\lambda = 280 \text{ nm}$ e $\lambda = 320 \text{ nm}$)
<i>Fluxo</i>	0,60 mL.min ⁻¹
<i>Coluna</i>	Phenomenex, Synergi 4u Polar-RP 80 A C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm)
<i>Temperatura</i>	30 °C
<i>Fase móvel</i>	Fase A: água purificada com 0,2% (% v.v ⁻¹) de ácido fórmico Fase B: Acetonitrila com 0,2% (% v.v ⁻¹) de ácido fórmico
<i>Volume de injeção</i>	10 µL
<i>Tempo de análise</i>	21 min
<i>Modo</i>	<u>Gradiente</u> 0-15 minutos – 20-70% concentração de Fase B 15-15,01 minutos: 70-100% concentração de Fase B 15,01-21 minutos: 100-20% concentração de Fase B

Fonte: A autora

Primeiramente, foi necessário fazer o preparo do EBMP, utilizando hexano (extrato de bagaço de malte: hexano, proporção 1:1, v/v) para a retirada do excesso de gordura presente na amostra, uma vez que mesmo realizando a diluição em metanol, a amostra continuou turva, impossibilitando a sua injeção no equipamento.

Com o hexano foi realizada a microextração líquido-líquido, com duas partições, sendo feita a centrifugação em ultracentrífuga (HERMLE, modelo Z326K, Alemanha) a 14000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, 500 µL do extrato foi diluído em 1500 µL de metanol puro, e 1000 µL desta fração com metanol foi adicionada em 1000 µL da mistura metanol:água (50:50, v/v), sendo 40 µL.mL⁻¹ a concentração final de extrato usada na análise. A amostra foi então filtrada, com auxílio de seringa e filtro de nylon de 0,22 µm, para *vial* de 2 mL para leitura em equipamento, sendo feito primeiro o gradiente exploratório, para depois estabelecer as condições adequadas para obtenção de um pico.

Para a validação do método desenvolvido anteriormente, seguiu-se todas as recomendações da RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 (Brasil, 2017) e da *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2022), sendo usado somente o padrão de ácido gálico, pois foi observado que este foi o composto majoritário encontrado no extrato. Foi testado também o padrão de ácido ferúlico, porém como não foi encontrado o seu respectivo pico no cromatograma do EBMP, este ácido não foi utilizado na validação. Os parâmetros avaliados foram linearidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão, precisão e robustez. Também foi realizado um estudo de estabilidade do ácido gálico em solução a cada 7 dias por um período de 21 dias, com e sem exposição à luz.

Para a linearidade, foi preparado solução estoque de ácido gálico na concentração de 200 µg.mL⁻¹ e em seguida foram feitas as diluições nas concentrações 2; 5; 10; 15 e 20 µg.mL⁻¹, para a construção das três curvas analíticas. A equação da reta e o coeficiente de correlação R^2 foram obtidos. A análise de regressão linear ocorreu pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente angular foi testado por Análise de Variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

Para determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram feitos os cálculos a partir da razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (σ) e a média dos coeficientes angulares das curvas (IC), utilizando fatores multiplicadores sugeridos pela ICH (2005), conforme as Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3,3 \cdot \Sigma}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \Sigma}{IC} \quad (2)$$

Para a repetibilidade ou precisão intradia, foram feitas seis leituras no período da manhã e seis leituras no período da tarde, do padrão de ácido gálico na concentração de 10 µg.mL⁻¹, no mesmo dia, usando as mesmas condições de análise, mesmo analista e mesmo equipamento. O resultado foi expresso em coeficiente de variação, calculado pela razão entre o desvio padrão e a concentração média determinada (CMD), conforme a Equação 3 abaixo.

$$CV = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (3)$$

A precisão intermediária ou inter-dia foi realizada com doze repetições, utilizando o padrão na concentração de 10 µg.mL⁻¹, em dois dias diferentes, com as mesmas condições de análise, mesmo equipamento e mesmo operador. Em seguida, foi calculado o coeficiente de variação inter-dia, utilizando a Equação 3. A análise estatística dos resultados foi realizada por Teste-t com $p < 0,05$.

Para a exatidão, foi utilizado o método de recuperação com adição de padrão. Para isso, foram preparadas as soluções estoque de ácido gálico (200 µg.mL⁻¹), adicionando 2 mg, 3 mg e 6 mg do ácido gálico nas soluções, resultando nas concentrações de 400, 500 e 800 µg.mL⁻¹. A partir dessas concentrações foi feita a diluição para 10 µg.mL⁻¹, que está dentro do intervalo da curva analítica de ácido gálico, para a leitura no equipamento. As soluções foram preparadas em triplicata e os resultados expressos como porcentagem de recuperação, a partir da Equação 4, onde CME é a concentração média experimental e CT a concentração teórica.

$$Recuperação (\%) = \frac{CME}{CT} \times 100 \quad (4)$$

Na avaliação da robustez, soluções de ácido gálico na concentração 10 µg.mL⁻¹ foram submetidas a diferentes condições de fluxo da fase móvel, temperatura da coluna analítica e temperatura da amostra. O fluxo foi modificado de 0,600 mL.min⁻¹

¹ para 0,605 mL.minuto⁻¹. A temperatura da coluna analítica foi alterada de 30 °C para 25 °C. A temperatura da amostra variou de 15 °C para 20 °C. Os resultados dos parâmetros foram analisados por meio do coeficiente de variação e comparados com os valores obtidos em condições padrão. A significância dos resultados foi verificada por ANOVA com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

Para o estudo de estabilidade, foram preparadas soluções de ácido gálico na concentração 10 µg.mL⁻¹, sendo uma filtrada em *vial* de vidro âmbar e outra em *vial* transparente (com e sem exposição à luz). Foram feitas as leituras, em triplicata, das soluções no dia 0, dia 7, dia 14 e dia 21. A significância dos resultados foi verificada por ANOVA com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

2.2.2.7 Análise estatística

Os valores experimentais foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão. Os dados resultantes das análises foram avaliados pelos softwares GraphPad Prism versão 9.0 e Statistica versão 10.0. A análise de variância (ANOVA) *one-way* com pós-teste de Tukey, com múltiplas comparações, foi usada para comparações estatísticas entre as amostras, assim como análise de resíduos, falta de ajuste e Teste T de Student.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Preparo dos Diferentes Tipos de Bagaços de Malte

Os bagaços de malte foram fornecidos úmidos pela Koch Cervejaria, porém devido ao problema de contaminação por microrganismos, estes materiais foram secos em estufa logo em seguida. Para a padronização nas análises de caracterização foi necessária ainda a etapa de uniformização (tamis granulométrico 30 mesh) do tamanho de partículas ($\sim 0,59$ mm), sendo todas essas etapas demonstradas na Figura 13.

FIGURA 13 – Bagaço de malte úmido (A), seco (B) e triturado e tamisado (C)



Fonte: A autora

2.3.2 Composição Centesimal dos Bagaços de Malte

A Tabela 2 descreve os dados obtidos para umidade, cinzas, lipídeos e proteínas para cada um dos bagaços de malte avaliados. Em relação a umidade, o BMP + C foi o que apresentou o maior valor ($12,73 \pm 0,25\%$) quando comparado aos demais. Já em relação ao teor de lipídeos, somente BMP apresentou diferença significativa em relação aos demais bagaços, com o valor de $11,04 \pm 0,12\%$. O teor de proteínas e fibra bruta, as amostras BMC e BMP, respectivamente, apresentaram valores maiores ($21,87 \pm 0,05\%$ e $24,57 \pm 0,07\%$, respectivamente) quando comparados aos demais. Os componentes presentes em maiores quantidades nos bagaços de malte são as proteínas e fibras. O bagaço de malte é constituído pela casca, pericarpo e semente, que são ricos em celulose e lignina (fibras), além de proteínas e lipídios. É na casca também que estão presentes a sílica e a maior parte dos compostos fenólicos do grão de cevada. Portanto, considerando um material com potencial antioxidante, pela presença de compostos fenólicos, é importante que haja uma quantidade considerável de fibras em sua composição (Almeida *et al.*, 2017).

A variação na composição centesimal de cada um dos bagaços de malte, especialmente nas proteínas e fibra bruta, pode estar relacionada a diferentes condições de processo para obtenção de cada tipo de malte, aos cereais usados e suas respectivas proporções e também à época de colheita e condições de crescimento da cevada (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2020).

TABELA 2 - Composição centesimal dos diferentes tipos de bagaços de malte avaliados

Análises	BMP	BMP + PA	BMC	BMP + C
Umidade (%)	8,78 ± 0,26 ^a	3,71 ± 0,17 ^b	3,99 ± 0,15 ^b	12,73 ± 0,25 ^c
Cinzas (%)	2,26 ± 0,60 ^a	2,62 ± 0,25 ^a	2,41 ± 0,28 ^a	2,87 ± 1,37 ^a
Lipídeos (%)	11,04 ± 0,12 ^a	7,57 ± 0,21 ^b	8,04 ± 0,79 ^b	8,29 ± 0,30 ^b
Proteínas (%)	14,89 ± 0,33 ^a	20,57 ± 0,14 ^b	21,87 ± 0,05 ^c	17,84 ± 0,15 ^d
Fibra bruta (%)	24,57 ± 0,07 ^a	15,19 ± 0,22 ^b	16,89 ± 0,16 ^c	14,56 ± 0,03 ^d

Fonte: A autora

Notas: BMP: extrato Pilsen; BMP + PA: extrato Pilsen + Pale Ale; BMC: extrato Centeio + Golden + Pale Ale + Caraaroma; BMP + C: extrato Pilsen + Carared + Carapils + Caramunich + Caraaroma. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, p≤0,05).

Após a secagem em estufa, foi possível perceber a redução da umidade do material, preservando os bagaços de malte da contaminação microbiana e prolongar o tempo de uso.

A proteína é altamente concentrada no bagaço de malte, porque a maior parte do amido do malte é removida durante a mosturação (Mussatto; Dragone; Roberto, 2006). Os valores obtidos para proteínas foram semelhantes aos de outros autores, como para Arauzo; Olszewski e Kruse (2018), que obtiveram 29,3%, Bucci *et al.* (2020) com 23%, Castro; Colpini (2021) com 18,14 ± 0,25%, Cheratriu; Dabija (2020) na faixa de 15-30%, Mendes *et al.* (2019), com 14,7 ± 1,3%, Rojas-Chamorro *et al.* (2018) com 21,2 ± 0,22% e Saraiva *et al.* (2019) com 23,48 ± 0,63%.

Os dados obtidos em relação às cinzas também foram semelhantes aos do presente trabalho, Bucci *et al.* (2020) com 2,5%, Castro; Colpini (2021) com 2,34 ± 0,07%, Cheratriu; Dabija (2020) na faixa de 2-5%, Mendes *et al.* (2019), com 2,5 ± 0,1% e Rojas-Chamorro *et al.* (2018) com 2,28 ± 0,05%.

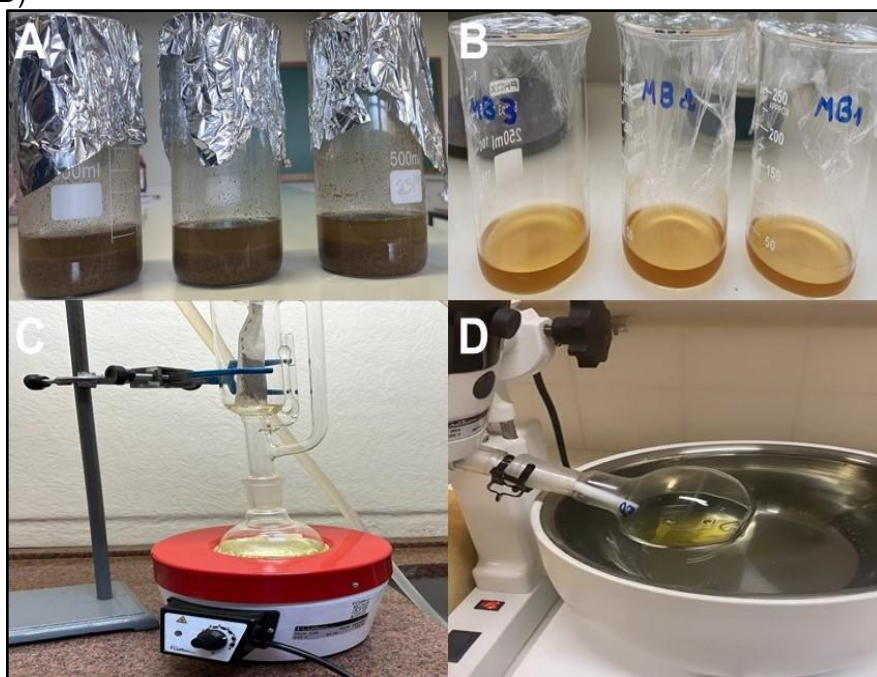
Em relação ao teor de lipídeos, os valores encontrados na literatura, que estão próximos aos encontrados para os diferentes tipos de bagaços de malte avaliados, foram dos trabalhos de Bucci *et al.* (2020) com 8%, Bonifácio-Lopes *et al.* (2022) com 6,35 ± 0,20%, Cheratriu; Dabija (2020) na faixa de 3-10%, Rojas-Chamorro *et al.* (2018) com valor de 8,61 ± 0,47% e Saraiva *et al.* (2019) com 6,31 ± 0,64%.

Já para a fibra bruta, foi quantificada com o valor de 38% por Bucci *et al.* (2020) e $19,62 \pm 0,36\%$ por Saraiva *et al.* (2019). Muitos autores ainda especificam o teor específico de cada fibra encontrada no bagaço de malte, como celulose, hemicelulose e lignina, porém no presente trabalho foi possível somente a quantificação das fibras brutas totais.

2.3.3 Obtenção dos Extratos a partir dos Bagaços de Malte

As porções hidroalcoólica e cetônica obtidas pelos processos de extração de maceração e extração em Soxhlet respectivamente, podem ser visualizadas na Figura 14. Os extratos obtidos em ambos os processos, apresentaram coloração amarela, mais escura na maceração devido ao contato direto do solvente com uma quantidade de bagaço de malte usada maior (20g) quando comparada à quantidade utilizada na extração em Soxhlet (2,5g do bagaço reaproveitado). Após a evaporação rotativa, as frações hidroalcoólica e cetônica foram unidas em um único extrato, com o objetivo de aumentar a concentração de compostos fenólicos, uma vez que mesmo após os 7 dias de maceração, existe a possibilidade de não ter ocorrido a extração de alguns compostos fenólicos, principalmente os que apresentam característica mais apolar.

FIGURA 14 - Processos de extração: maceração demonstrada em (A) com o macerado e (B) com o filtrado após os 7 dias, e extração em Soxhlet em (C) juntamente com a evaporação rotativa dos extratos em (D)



Fonte: A autora

A presença da água nos extratos, juntamente com o etanol no processo de maceração, podem aumentar a permeabilidade do tecido celular do bagaço de malte, permitindo uma maior transferência dos compostos fenólicos por difusão molecular, melhorando assim a extração desses componentes (Almeida *et al.*, 2017).

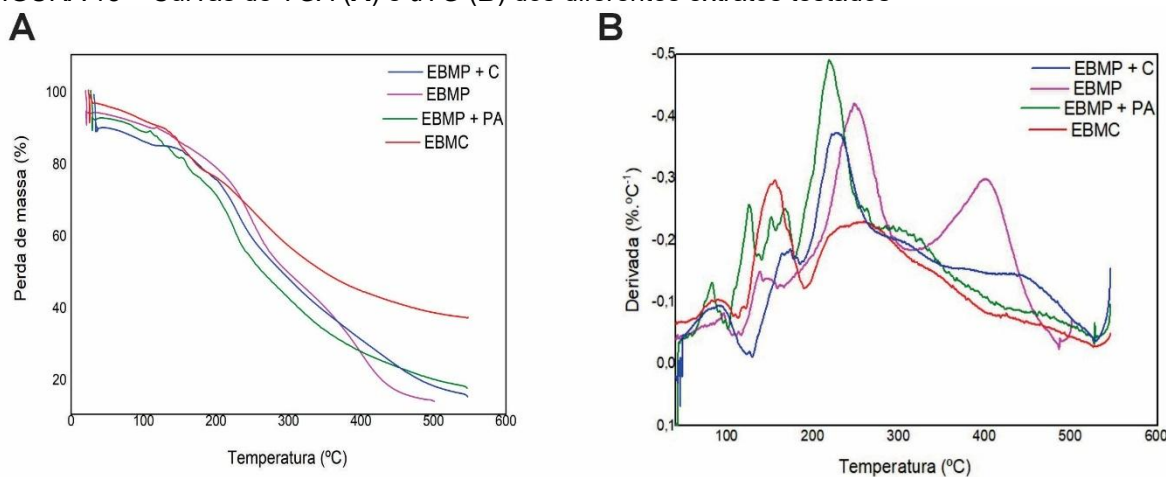
Os extratos obtidos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, em geladeira, para evitar a oxidação e degradação dos compostos fenólicos, os quais são fotossensíveis e sensíveis ao oxigênio (Spinelli; Conte; Del Nobile, 2016).

2.3.4 Caracterização dos Extratos

2.3.4.1 Análise térmica dos extratos

Por meio da análise das curvas de termogravimetria (*TGA*) e termogravimetria derivada (*dTG*) dos extratos apresentadas na Figura 15, foi possível observar perfis semelhantes para os quatro extratos testados, sendo demonstrada perda mais intensa da massa dos extratos a partir de 100 °C, temperatura em que já inicia a degradação dos compostos fenólicos.

FIGURA 15 – Curvas de *TGA* (A) e *dTG* (B) dos diferentes extratos testados



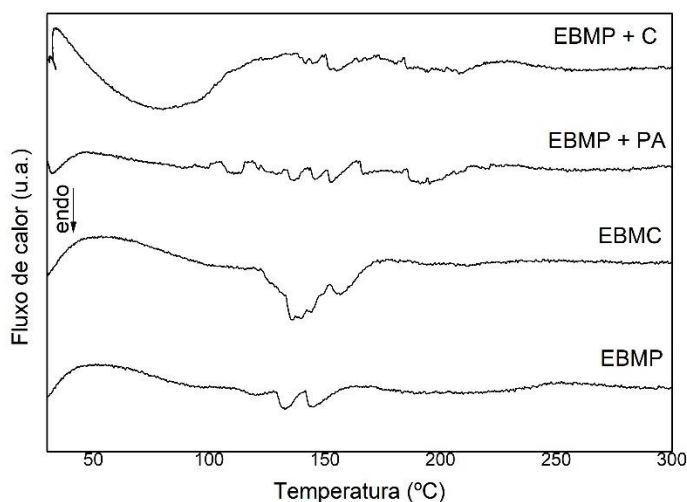
Fonte: A autora

Foi possível observar três eventos térmicos nos termogramas dos extratos de bagaço de malte, que correspondem a: 1) 50-105 °C – eliminação da água (umidade), 2) 100-200 °C – os picos estão relacionados ao processo de decomposição dos diferentes compostos fenólicos presentes nas amostras, 3) 250-375 °C – degradação

de compostos orgânicos, gorduras, ceras, alcaloides e glicosídeos (Abdel-Aty *et al.*, 2023; Castro; Colpini, 2021; de Lima Marsiglia *et al.*, 2023) .

Na análise de *DSC*, demonstrada na Figura 16, é possível observar a presença de picos endotérmicos na faixa de temperatura de 100-160 °C, o que pode confirmar a degradação dos compostos fenólicos, já visualizada nas curvas de *TGA* e *dTG* dos extratos.

FIGURA 16 – Curvas de *DSC* dos diferentes extratos testados



Fonte: A autora

Para o EBMP + PA, os picos endotérmicos, relacionados à degradação dos compostos fenólicos presentes no extrato já iniciaram na temperatura de 110 °C, enquanto para os demais extratos, pode-se observar que a degradação e a consequente perda de massa iniciam-se próximo a 132 °C. Nessas temperaturas, a evaporação da água é responsável pela presença dos picos endotérmicos. A segunda etapa de degradação inicia-se em temperatura ~ 150 °C, em que ocorre a degradação dos compostos fenólicos da amostra. Os resultados obtidos foram próximos aos dos extratos de fenólicos das folhas e goma de *Ferula asafoetida*, em que houve a formação de picos endotérmicos nas temperaturas de 100, 117, 132 e 164 °C (Niazmand; Razavizadeh, 2021), e essa diferença deve-se a espécies vegetais distintas, diferenciando em suas composições químicas, bem como no cultivo e na região demográfica.

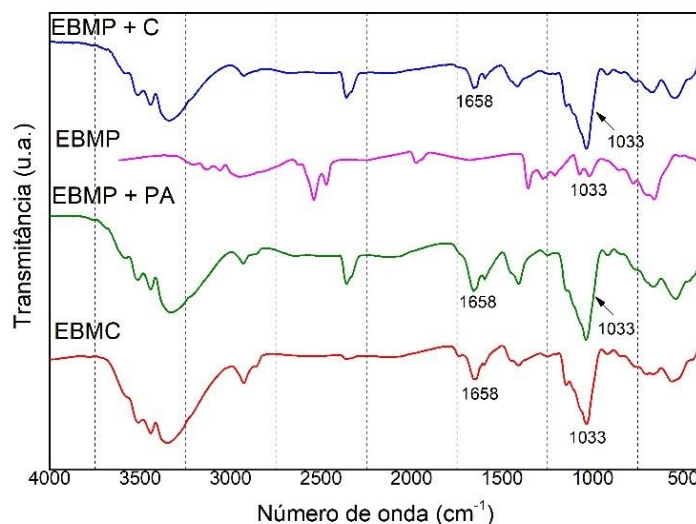
Portanto, a temperatura recomendada de exposição dos extratos de bagaço de malte, sem que haja degradação dos compostos fenólicos e a consequente perda de atividade desses compostos, é inferior a 100 °C. Esta temperatura garante a

integridade da estrutura dos compostos fenólicos, mantendo suas atividades antioxidante e prebiótica.

2.3.4.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (*FTIR*) dos extratos

Em relação aos espectros de *FTIR* dos extratos, demonstrados na Figura 17, foi possível observar em todos os espectros a presença da banda (1033 cm^{-1}) e a banda em 1658 cm^{-1} , com exceção do extrato EBMP devido a diferença de composição que os extratos de bagaço de malte podem apresentar. Em 1658 cm^{-1} , há vibração de estiramento de grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e em 1033 cm^{-1} está relacionado ao agrupamento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (Iadecola *et al.*, 2022). Outras bandas que são visualizadas e podem estar relacionadas aos compostos fenólicos que estão presentes no extratos, como em 3300 cm^{-1} , que está relacionado ao estiramento dos grupos $\text{O}-\text{H}$ e em 2923 cm^{-1} refere-se ao estiramento de grupos $\text{C}-\text{H}$ (Ogawa; Sato, 2016).

FIGURA 17 – Espectros de *FTIR* dos diferentes extratos testados



Fonte: A autora

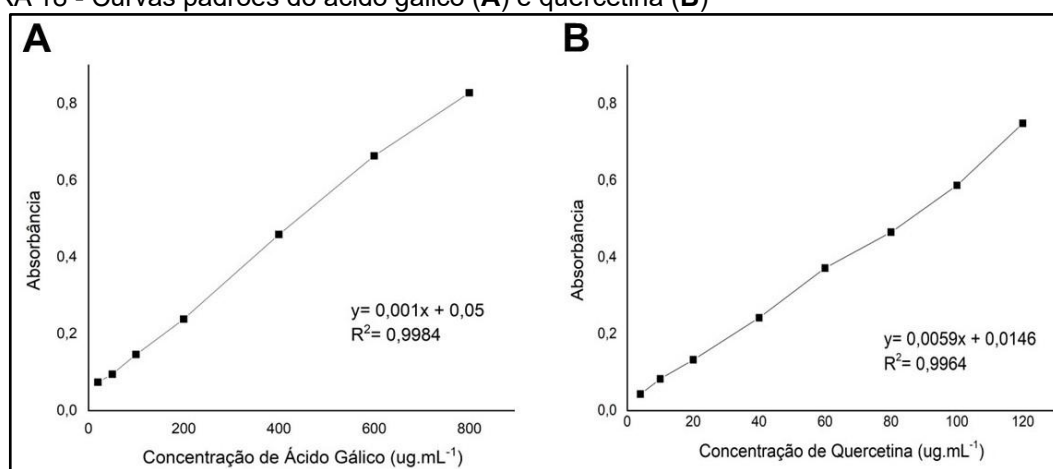
Os quatro extratos avaliados nessa análise apresentaram espectros muito semelhantes, indicando a possível semelhança nas suas composições relacionadas aos tipos de compostos fenólicos extraídos para cada tipo de bagaço de malte.

2.3.5 Testes para Avaliação *In Vitro* de Atividade Antioxidante, Antimicrobiana e Prebiótica e Análises de Citotoxicidade em Linhagem de Fibroblastos 3T3

2.3.5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, e avaliação da atividade antioxidante por ABTS•+ e DPPH•

Para a determinação do teor de fenólicos e flavonoides foi necessária a construção de curvas padrão do ácido gálico e da quercetina com as equações da reta, respectivamente, como mostrado na Figura 18.

FIGURA 18 - Curvas padrões do ácido gálico (A) e quercetina (B)



Fonte: A autora

Na Tabela 3 foi possível observar que o extrato com maior teor de compostos fenólicos foi o EBMC ($4,28 \pm 0,14$ mg EAG.g⁻¹), seguido do EBMP ($2,82 \pm 0,03$ mg EAG.g⁻¹). Já o teor de flavonoides totais, como foi realizado posteriormente, quando os dois extratos (EBMC e EBMP) já haviam sido selecionados, só foi realizado de ambos, sendo que o EBMP apresentou maior teor de flavonoides ($1,00 \pm 0,11$ mg.g⁻¹), quando comparado ao EBMC. A concentrações de compostos fenólicos no bagaço de malte pode variar de 0,14 a 13,23 mg EAG.g⁻¹ de bagaço de malte, dependendo do tipo de cevada, pré-tratamento e método de extração (Zago *et al.*, 2022).

Os valores obtidos na quantificação do teor de compostos fenólicos totais em bagaços de malte foram comparados com os valores obtidos por outros autores, como Almeida *et al.* (2017) com 3,80 mg.kg⁻¹, Lech; Labus (2022) com 1,7 mg.kg⁻¹ de bagaço de malte e Zuorro; Iannone e Lavecchia (2019) com 4,126 mg EAG.g⁻¹ e nesse caso utilizando apenas a acetona como solvente de extração. Já Almendinger; Rohn e Pleissner (2020) demonstraram que há diferença entre a concentração de compostos

fenólicos em bagaços de malte mais escuros (5,1 mg GAE.g⁻¹ de bagaço de malte) e mais claros (1,8 mg GAE.g⁻¹ de bagaço de malte), como discutido anteriormente.

A pré-seleção dos extratos foi realizada mediante as análises do teor de fenólicos e da atividade antioxidante por ABTS•+ e DPPH•. Para os radicais ABTS•+, o extrato com maior poder de inibição, ou seja, menor IC50 (174,80 ± 4,90 µg.mL⁻¹) quando comparado aos demais foi o EBMC.

Já para os radicais DPPH•, a maior inibição foi realizada pelo EBMP com valor de IC50 correspondente a 4276,70 ± 32 µg.mL⁻¹. O resultado foi semelhante ao que foi obtido por Almeida *et al.* (2017), em que também obteve valor alto de IC50 para os radicais DPPH• (6630 ± 90 µg.mL⁻¹) indicando que os compostos fenólicos presentes no extrato de bagaço de malte apresentam uma baixa inibição dos radicais DPPH•.

TABELA 3 - Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, e inibição dos radicais ABTS•+ e DPPH• pelos extratos

Amostras	Teor de fenólicos totais (mg EAG.g ⁻¹ de extrato)	Teor de flavonoides totais (mg.g ⁻¹ de extrato)	ABTS•+ (IC50 µg.mL ⁻¹)	DPPH• (IC50 µg.mL ⁻¹)
EBMP	2,82 ± 0,03 ^a	1,00 ± 0,11 ^a	240,10 ± 1,60 ^a	4276,70 ± 32 ^a
EBMP + PA	0,55 ± 0,01 ^b	-	>250 ^b	>5000 ^b
EBMC	4,28 ± 0,14 ^c	0,11 ± 0,01 ^b	174,80 ± 4,90 ^c	>5000 ^b
EBMP + C	1,13 ± 0,02 ^d	-	220,10 ± 3,40 ^d	>5000 ^b

Fonte: A autora

Notas: EBMP: extrato Pilsen; EBMP + PA: extrato Pilsen + Pale Ale; EBMC: extrato Centeio + Golden + Pale Ale + Caraaroma; EBMP + C: extrato Pilsen + Carared + Carapils + Caramunich + Caraaroma. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, p≤0,05).

O padrão utilizado para comparação foi a quercetina, a qual apresentou valores de IC50 de 3,50 ± 0,17 µg.mL⁻¹ para inibição de ABTS•+ e 8,52 ± 0,20 µg.mL⁻¹ para inibição de DPPH•, portanto com potencial antioxidante maior quando comparado aos extratos de bagaços de malte. Considerando que a quercetina foi usada de forma pura e que já tem atividade antioxidante bem consolidada, e que o bagaço de malte é um resíduo da indústria cervejeira, já é esperado que a atividade

antioxidante seja menor do extrato. Porém, devido a sustentabilidade, a grande quantidade que é produzido (em toneladas) e ao baixo custo do bagaço de malte, quando comparado a quercetina, que é fornecida em quantidades menores por um preço razoavelmente alto, considera-se vantajoso o uso do bagaço de malte na aplicação antioxidante. Além disso, o valor de IC50 para ABTS•+ para o extrato de bagaço de malte foi significativamente menor do que quando comparado ao DPPH•.

Na etapa de mosturação da produção cervejeira, quando ocorre a inativação das enzimas a 78 °C, já pode ocorrer a redução na quantidade de polifenóis. Os processos como oxidação, degradação e formação de complexos dos polifenóis com proteínas também podem ocasionar uma diminuição (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020).

Geralmente o bagaço de malte de coloração mais escura apresenta valores mais elevados de compostos fenólicos totais quando comparado ao bagaço de malte de coloração mais clara, devido à presença de melanoidinas de alto peso molecular, que são provenientes da reação de Maillard, em que ocorre a degradação de açúcares e aminoácidos. As melanoidinas também podem reagir com o reagente Folin-Ciocalteu e assim levar um valor de compostos fenólicos totais mais elevado (Birsan *et al.*, 2019). O BMC mostrou-se com uma coloração mais escura quando comparado ao BMP e a maior intensidade da cor pode ter relação com a maior concentração de melanoidinas, interferindo na reação de Folin-Ciocalteu e resultando em maior concentração de compostos fenólicos, porém mais estudos seriam necessários para essa afirmação.

Em relação ao teor de flavonoides totais, Almeida *et al.* (2017) obtiveram o valor de $1,49 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$ de bagaço de malte, semelhante ao que foi observado para o extrato BMP no trabalho. Já no trabalho de Meneses *et al.* (2013), utilizando apenas a acetona como solvente de extração, a concentração de flavonoides ficou na faixa de 0,51 a $2,12 \text{ mg.g}^{-1}$ de bagaço de malte, dependendo da concentração de acetona usada na extração (20-100%, v/v).

No presente trabalho, a inibição foi maior para os radicais ABTS•+ do que para os radicais DPPH• para os quatro tipos de extratos de bagaços de malte avaliados. O radical DPPH reage preferencialmente com polifenóis de alta massa molecular, como flavonoides ou taninos, mas não com ácidos fenólicos de baixa massa molecular, como com os ácidos hidroxicinâmicos presentes no bagaço de malte, que reagem melhor com os radicais ABTS, por isso há diferença nas concentrações usadas em

ambos os testes antioxidantes (Almendinger; Rohn; Pleissner, 2020). Além disso, são usados mecanismos diferentes por parte das substâncias antioxidantes para a redução e inibição dos radicais, sendo que para os radicais ABTS, ocorre a recepção de elétrons e para DPPH, ocorre recepção de próton (Almeida *et al.*, 2017).

Devido às diferenças relacionadas às composições dos diferentes bagaços de malte avaliados, houve variação na concentração de compostos fenólicos e consequentemente na atividade antioxidante. Como os polifenóis predominantes no bagaço de malte são os ácidos hidroxicinâmicos, e estes reagem preferencialmente com os radicais ABTS^{•+}, pode-se concluir que o método de ABTS^{•+} é o mais adequado e fidedigno nos resultados para avaliação da atividade antioxidante, do que quando comparado ao DPPH.

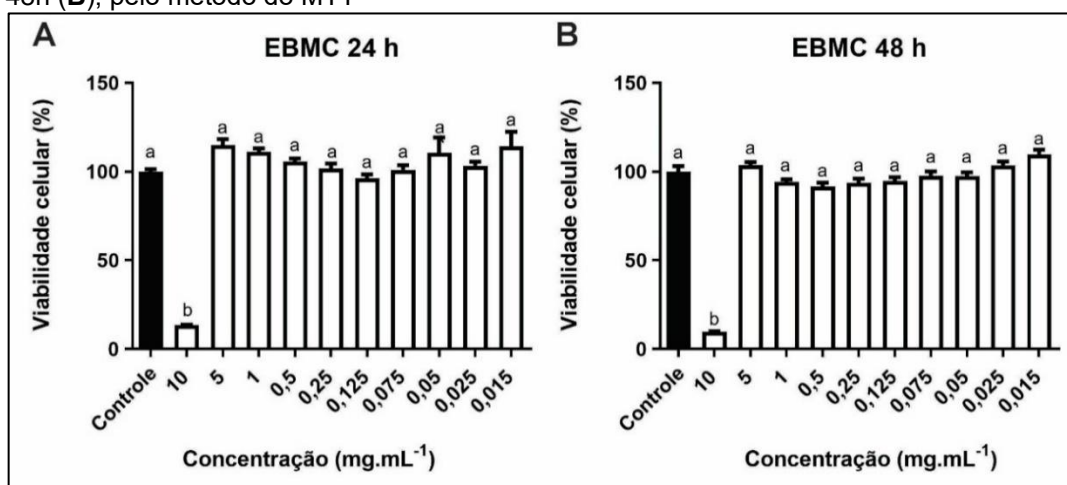
Neste trabalho, foram testados apenas os métodos de captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] para avaliação da atividade antioxidante, que são os métodos mais comuns. Porém, existem outros testes que também podem ser usados, como o ORAC, em que consiste no sequestro de radicais peroxila, utilizando AAPH (2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida) como sendo uma substância que induz a formação dos radicais e vermelho de catecol (PGR), ficoeritrina (β -PE) e fluoresceína (FL) como moléculas-alvo, que reagem com radicais peroxila, reduzindo a fluorescência. Também existem métodos em que ocorrem reações, levando a alteração da valência de íons metálicos, como os íons de ferro e cobre. Estas incluem o poder antioxidante redutor de íons férricos (FRAP), de ferricianeto de potássio (PFRAC), de tiocianato férrico (FTC) e cúprica (CUPRAC). Ainda existem ensaios de atividade antioxidante realizados em células, em que avaliação ocorre por meio do número de produtos ou enzimas relevantes, que compõem o sistema de estresse oxidativo. O mais comum entre esses engloba a determinação de espécies reativas de oxigênio usando sondas como DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorodi-hidrofluoresceína), DHR (di-hidrorodamina) e DHE (di-hidroetídio) (Chen *et al.*, 2023b).

2.3.5.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos

Por meio da análise dos gráficos de viabilidade celular de EBMP e EBMC, nas Figuras 19, 20, 21 e 22, foi possível observar que tanto na metodologia do MTT, quanto na captação do corante vermelho neutro, e nos dois períodos avaliados (24 horas e

48 horas) houve uma maior citotoxicidade (viabilidade celular < 50%) somente na máxima concentração testada (10 mg.mL⁻¹) do EBMC e nas concentrações 5 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹ para o EBMP. Nas concentrações iguais ou inferiores a 1 mg.mL⁻¹ de ambos os extratos, a viabilidade celular foi semelhante ao Controle, sendo, portanto, estabelecido o limite máximo da concentração dos extratos para uso seguro em produtos cosméticos antienvhecimento, em que pode haver a permeação até a camada dérmica da pele, sem ocasionar a morte celular de fibroblastos.

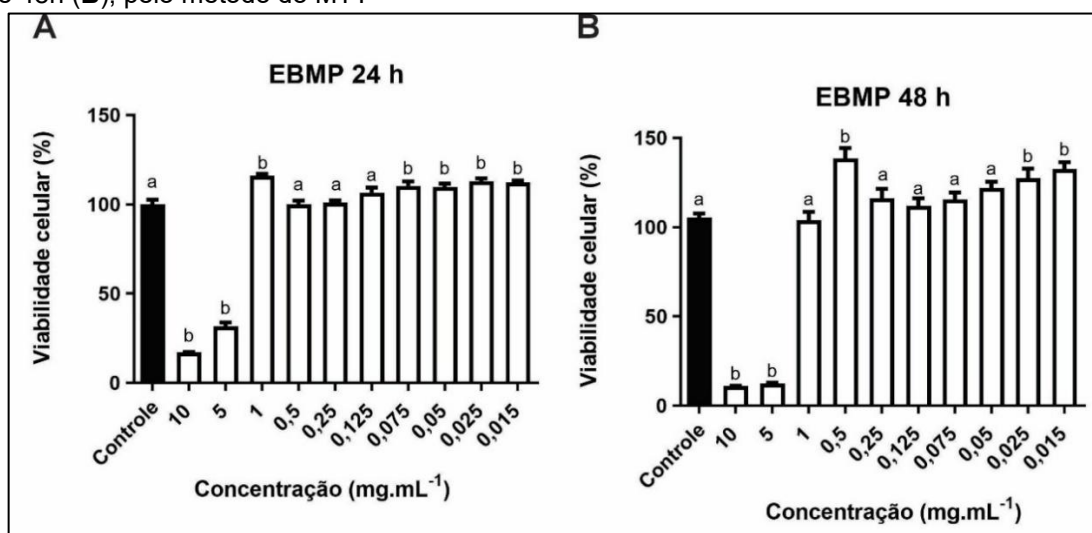
FIGURA 19 – Viabilidade celular frente à exposição ao EBMC, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do MTT



Fonte: A autora

Notas: Efeito do EBMC sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3. As células foram tratadas pelos períodos de 24h e 48h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. As concentrações testadas (0,015; 0,025; 0,05; 0,075; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 5 e 10) estão em mg.mL⁻¹. Como controle negativo (Controle), empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=8). Letras diferentes do Controle indicam diferença significativa entre a concentração da amostra e o controle (ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, p≤0,05).

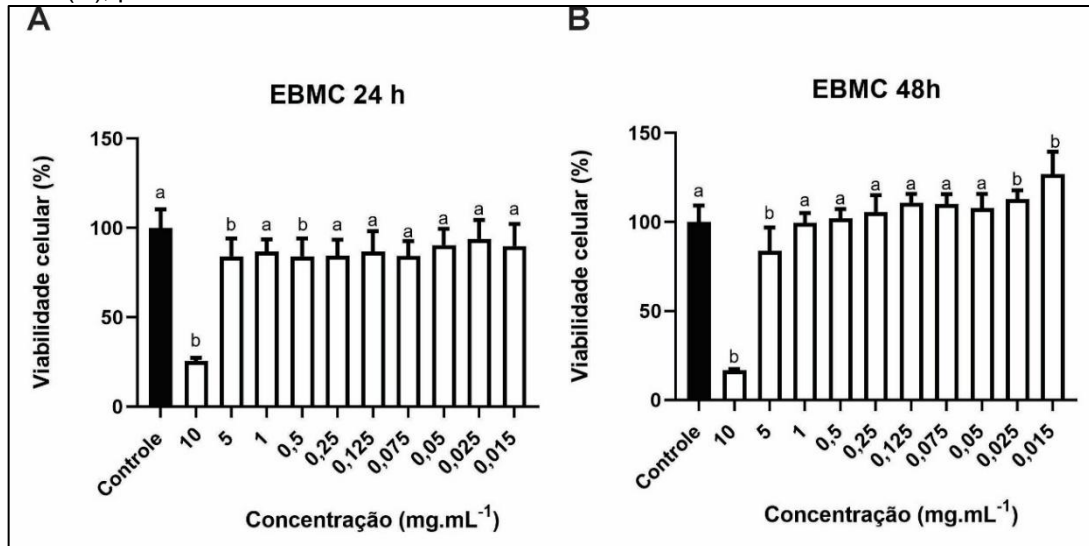
FIGURA 20 – Viabilidade celular frente à exposição ao EBMP, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do MTT



Fonte: A autora

Notas: Efeito do EBMP sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3. As células foram tratadas pelos períodos de 24h e 48h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. As concentrações testadas (0,015; 0,025; 0,05; 0,075; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 5 e 10) estão em mg.mL^{-1} . Como controle negativo (Controle), empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM ($n=8$). Letras diferentes do Controle indicam diferença significativa entre a concentração da amostra e o controle (ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

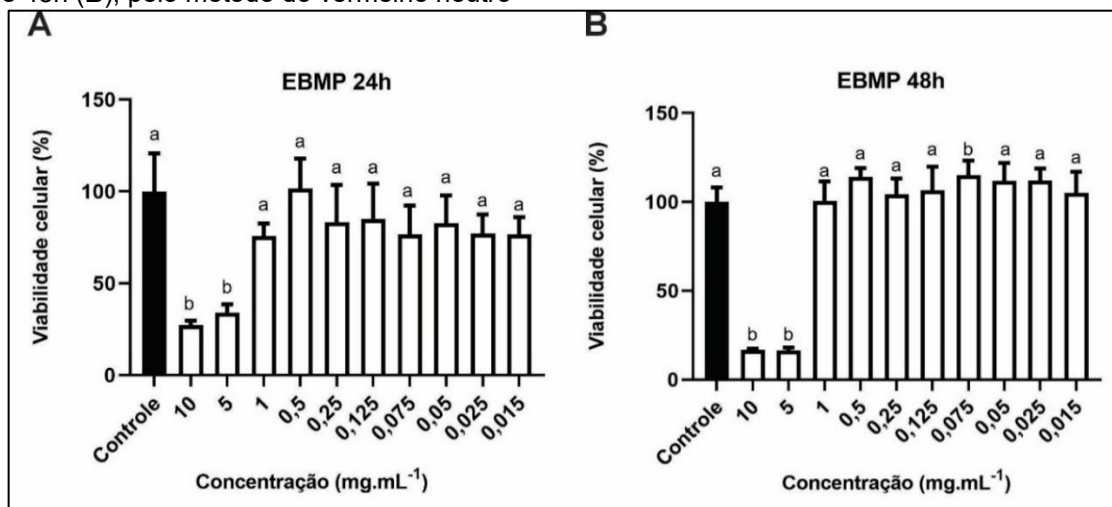
FIGURA 21 – Viabilidade celular frente à exposição ao EBMC, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do vermelho neutro



Fonte: A autora

Notas: Efeito do extrato EBMC sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3. As células foram tratadas pelos períodos de 24h e 48h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do vermelho neutro. As concentrações testadas (0,015; 0,025; 0,05; 0,075; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 5 e 10) estão em mg.mL^{-1} . Como controle negativo (Controle), empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM ($n=8$). Letras diferentes do Controle indicam diferença significativa entre a concentração da amostra e o controle (ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

FIGURA 22 – Viabilidade celular frente à exposição ao EBMP, em diferentes concentrações, em 24h (A) e 48h (B), pelo método do vermelho neutro



Fonte: A autora

Notas: Efeito do EBMP sobre a viabilidade de fibroblastos 3T3. As células foram tratadas pelos períodos de 24h e 48h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do vermelho neutro. As concentrações testadas (0,015; 0,025; 0,05; 0,075; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 5 e 10) estão em mg.mL^{-1} . Como controle negativo (Controle), empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras. Os resultados

estão expressos como média $\pm$ EPM (n=8). Letras diferentes do Controle indicam diferença significativa entre a concentração da amostra e o controle (ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

No estudo de Bonifácio-Lopes *et al* (2022), o método utilizado na citotoxicidade foi o de fluorescência por *Presto-Blue* e as linhagens celulares estudadas foram HT29-MTX e Caco-2, que correspondem as células do cólon humano e carcinoma de cólon, respectivamente. As concentrações de extrato de bagaço de malte testadas foram 10; 5; 1 e 0,5 mg.mL⁻¹. Para célula de cólon, somente a concentração 0,5 mg.mL⁻¹ não foi considerada citotóxica. Já na linhagem tumoral, todas as concentrações foram citotóxicas.

Já Almendinger; Rohn e Pleissner (2020), também com o uso de método fluorescente com o marcador fluoresceína, avaliaram a citotoxicidade do extrato de bagaço de malte nas concentrações de 1%, 5% e 10% frente a linhagem HaCaT (queratinócitos). Na concentração mais elevada de 10% de extrato, já foi possível observar efeito citotóxico causado por melanoidinas presentes no bagaço de malte. Em algumas reações secundárias da reação de Maillard, a formação de peróxido de hidrogênio também pode levar à citotoxicidade.

Portanto, mesmo com a utilização de linhagens celulares distintas e métodos para avaliação da citotoxicidade também diferentes, os dados obtidos por outros autores, que também desenvolveram extratos com bagaço de malte, foram similares ao que foi observado neste trabalho, demonstrando que somente em concentrações de 5 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹ neste estudo e 10% no estudo de Almendinger; Rohn e Pleissner (2020), houve citotoxicidade significativa quando comparadas às concentrações mais baixas.

2.3.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana para EBMP e EBMC estão demonstrados nas Tabela 4 para *Candida albicans*, Tabela 5 para *Escherichia coli*, Tabela 6 para *Staphylococcus aureus* e Tabela 7 para *Staphylococcus epidermidis*. Não foi observada ação antimicrobiana significativa (inibição dos microrganismos $\geq 50\%$) para nenhum dos extratos em nenhum dos quatro microrganismos testados. Em alguns casos é possível observar valores de densidade óptica (DO) superiores ao controle negativo (só a presença do microrganismo, sem a aplicação da amostra).

TABELA 4 -Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo *Candida albicans* quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações

Microrganismo	EBMC			EBMP		
	CA10231			CA10231		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	DO	Crescimento	Inibição	DO	Crescimento	Inibição
Controle	0,348 ns	100	0	0,233 ns	100	0
2	0,337*	97	3	0,536*	100	0
1	0,295 ns	85	15	0,554 ns	100	0
0,5	0,325 ns	93	7	0,297 ns	100	0
0,25	0,300 ns	86	14	0,404 ns	100	0
0,125	0,426 ns	100	0	0,330 ns	100	0
0,0625	0,338 ns	97	3	0,413 ns	100	0
0,0312	0,337 ns	97	3	0,492*	100	0

Fonte: A autora

Notas: DO – densidade óptica; ns significa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao controle, enquanto a presença de * indica que há diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 5 - Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo *Escherichia coli* quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações

Microrganismo	EBMC			EBMP		
	EC25922			EC25922		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	DO	Crescimento	Inibição	DO	Crescimento	Inibição
Controle	0,273 ns	100	0	0,220 ns	100	0
2	0,467*	100	0	0,257*	100	0
1	0,322* ns	100	0	0,249 ns	100	0
0,5	0,289*	100	0	0,254 ns	100	0
0,25	0,277 ns	100	0	0,231 ns	100	0
0,125	0,272 ns	99	1	0,234 ns	100	0
0,0625	0,282 ns	100	0	0,234 ns	100	0
0,0312	0,287 ns	100	0	0,228 ns	100	0

Fonte: A autora

Notas: DO – densidade óptica - ns significa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao controle, enquanto a presença de * indica que há diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 6 - Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo *Staphylococcus aureus* quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações

Concentração	Microrganismo	EBMC SA25923			EBMP SA25923		
		DO	Crescimento	Inibição	DO	Crescimento	Inibição
	Controle	0,549 ns	100	0	0,418 ns	100	0
	2	0,333*	61	39	0,283*	68	32
	1	0,428 ns	78	22	0,323*	77	23
	0,5	0,403 ns	73	27	0,361 ns	86	14
	0,25	0,294*	54	46	0,454 ns	100	0
	0,125	0,362 ns	66	34	0,549*	100	0
	0,0625	0,342 ns	62	38	0,125 ns	100	0
	0,0312	0,358 ns	65	35	0,228 ns	96	4

Fonte: A autora

Notas: DO – densidade óptica - ns significa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao controle, enquanto a presença de * indica que há diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 7 - Valores de densidade óptica, com as porcentagens de inibição e crescimento do microrganismo *Staphylococcus epidermidis* quando exposto ao EBMP e EBMC em diferentes concentrações

Microrganismo	EBMC SE12228			EBMP SE12228		
	DO	Crescimento	Inibição	DO	Crescimento	Inibição
Concentração (mg.mL ⁻¹)						
Controle	0,948 ns	100	0	0,682 ns	100	0
2	0,613*	63	37	0,964*	100	0
1	0,639*	67	33	0,843*	100	0
0,5	0,867 ns	91	9	0,639 ns	93	7
0,25	1,048 ns	100	0	0,747 ns	100	0
0,125	1,128*	100	0	0,693 ns	100	0
0,0625	1,086 ns	100	0	0,750 ns	100	0
0,0312	1,064 ns	100	0	0,772 ns	100	0

Fonte: A autora

Notas: DO – densidade óptica ns significa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao controle, enquanto a presença de * indica que há diferença estatística significativa (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Por serem altamente nutritivos, os bagaços de malte podem fornecer substratos também para o crescimento de microrganismos, exercendo ação prebiótica (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2023).

Como o objetivo do presente trabalho é a aplicação do extrato de bagaço de malte em formulações dermatológicas foi importante observar que o extrato não apresenta inibição do crescimento do *Staphylococcus epidermidis*, pois essa é uma bactéria que compõe a microbiota cutânea sem ocasionar patologias se não estiver em excesso e a inibição dessa bactéria poderia ocasionar desequilíbrio, levando a problemas de pele após a aplicação do produto (Petrov Ivanković *et al.*, 2023).

Algumas variáveis podem influenciar na atividade antimicrobiana, como o método utilizado na extração dos compostos fenólicos, a cultura microbiana, a composição e a concentração de extrato testada (Almeida *et al.*, 2017).

No estudo conduzido por Bonifácio-Lopes *et al.* (2022), as cepas de microrganismos avaliadas foram *Staphylococcus aureus* metilicina-sensível (ATCC 25923), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 2599) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313). As concentrações de extrato de bagaço de malte foram 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg.mL⁻¹. Só houve inibição de crescimento para *Bacillus cereus* nas concentrações 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg.mL⁻¹ e *Listeria monocytogenes* nas concentrações de 5 e 2,5 mg.mL⁻¹.

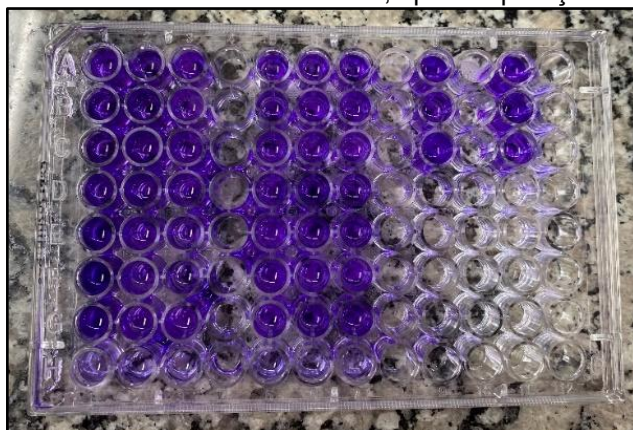
Já para Almeida *et al.* (2017), foram testadas as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. As concentrações de extrato de bagaço de malte avaliadas foram 0,01; 0,1; 1 e 50 mg.mL⁻¹. O resultado obtido foi que não houve inibição de crescimento para nenhum dos microrganismos em nenhuma das concentrações testadas, resultado em acordo ao observado no presente trabalho.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo foram similares a outros trabalhos, em que o extrato de bagaço de malte não promove completa inibição do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Como o bagaço de malte é um resíduo rico em carboidratos, juntamente com compostos fenólicos, estes componentes são metabolizados pelas bactérias, favorecendo o crescimento bacteriano.

2.3.5.4 Avaliação da inibição da formação de biofilme

Não houve inibição da formação de biofilme por nenhum dos extratos testados, sendo demonstrado o resultado obtido através da Figura 23, que mostra a coloração arroxeada do corante utilizado para corar o biofilme formado. As soluções com os extratos foram preparadas na concentração de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma vez que em concentrações menores a essa já havia sido observado que não apresentaram inibição no crescimento dos microrganismos. Portanto, os resultados obtidos nessa análise estão coerentes à avaliação da atividade antimicrobiana, em que não houve inibição no crescimento de *Staphylococcus aureus*, que foi a única bactéria formadora de filme, quando comparada às demais que foram testadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*).

FIGURA 23 - Foto da placa contendo o biofilme formado, após a aplicação de EBMP e EBMC



Fonte: A autora

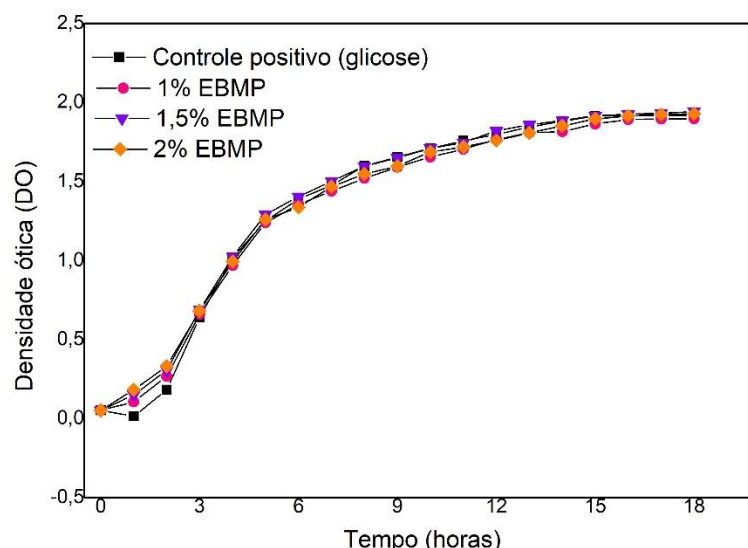
2.3.5.5 Avaliação da atividade prebiótica

Prebióticos podem ser definidos como substâncias que são utilizadas por microrganismos hospedeiros para gerar algum benefício para o organismo. Os cereais, como o bagaço de malte, possuem β -glucanos, arabinosilanos e compostos fenólicos que estão ligados com a ação prebiótica (Van de Velde *et al.*, 2025).

No presente estudo, a bactéria *Lactobacillus acidophilus* apresentou crescimento em meio MRS, sem a presença da glicose (fonte de carbono) e somente com o EBMP, como pode-se observar na Figura 24, indicando que o EBMP pode ser uma alternativa de fonte de carbono para o crescimento desta bactéria. Os perfis de

crescimento do microrganismo avaliados foram semelhantes para as três concentrações de extrato testadas e não houve diferença quando comparado ao meio MRS, com a presença de glicose.

FIGURA 24 – Curvas de crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, quando exposto a meio MRS com glicose (controle positivo) e meios MRS (sem glicose) com EBMP nas concentrações 1; 1,5% e 2% (% m.v⁻¹)



Fonte: A autora

As diferentes espécies de *Lactobacillus* fermentam hexoses, como a glicose, por meio de via homofermentativa com a formação do metabólito ácido láctico, ou de via heterofermentativa, em que além do ácido láctico, etanol, ácido acético e CO₂ também são produzidos (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2025).

Os grupos hidroxilas que compõem a estrutura dos ácidos fenólicos possuem fraca acidez e efeito protetor sobre os probióticos, o que acarreta a proliferação desses microrganismos, como as bactérias do ácido láctico (Zhang *et al.*, 2023).

Várias espécies de *Lactobacillus* apresentam uma enzima denominada galato descarboxilase, a qual é responsável pela quebra de ácido gálico em pirogalol e este é então convertido em cis-aconitato, o qual atua como fonte de carbono no ciclo de Krebs. Além da galato descarboxilase, outras enzimas, como esterases, hidrogenases, desidrogenases, desidroxilases, descarboxilases e isomerases degradam os compostos fenólicos em intermediários de carbono C3 que são consumidos pela bactéria, auxiliando no seu crescimento (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2025). Pela análise de UHPLC, exposta no próximo tópico, o principal composto

fenólico encontrado no EBMP foi o ácido gálico e com isso, os resultados obtidos na curva de crescimento estão de acordo com o perfil de fenólicos demonstrado.

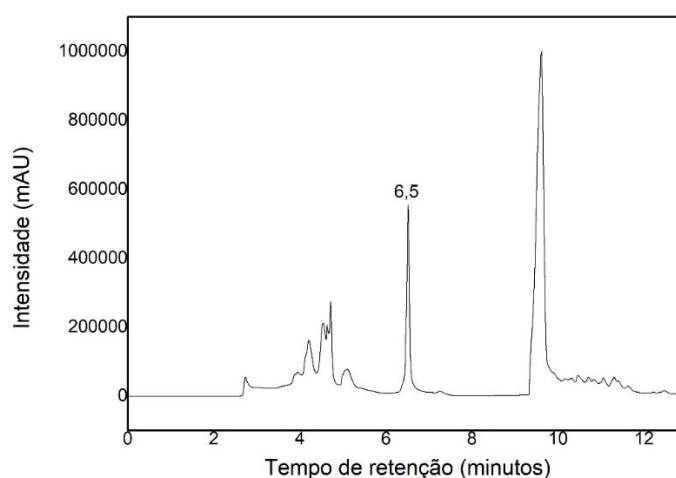
No estudo de Bonifácio-Lopes *et al.* (2023), também foram testados extratos de bagaço de malte em diferentes cepas de bactérias e o microrganismo *Lactobacillus acidophilus* também apresentou seu crescimento aumentado quando exposto aos extratos. Neste estudo, foi utilizado o meio MRS com frutooligossacarídeos (FOS) como controle positivo ao invés de glicose, mas como no presente estudo, não foi observada diferença entre o crescimento induzido pelos extratos quando comparado ao controle positivo para *Lactobacillus acidophilus* (Bonifácio-Lopes *et al.*, 2023)

Assim, é possível verificar a partir dos resultados apresentados para o EBMP, uma possível utilização prebiótica, além de antioxidante em formulações cosméticas.

2.3.6 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos no Extrato de Bagaço de Malte por UHPLC-DAD

Após o preparo do EBMP, este foi diluído em mistura de metanol:água na proporção 50:50, com a concentração final de $40 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, e o cromatograma foi obtido, conforme na Figura 25. Por ser uma mistura complexa foi possível isolar um pico com tempo de retenção de 6,5 minutos.

FIGURA 25 – Cromatograma do EBMP ($40 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) obtido em UHPLC com as condições testadas



Fonte: A autora

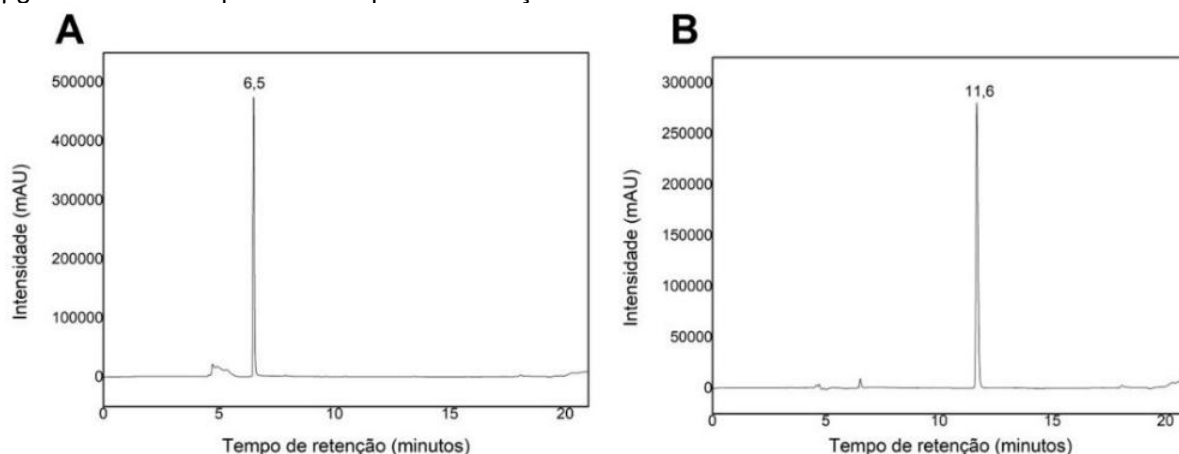
Foram utilizados os padrões de dois ácidos hidroxicinâmicos, tanto de ácido gálico e ácido ferúlico e obtidos seus respectivos cromatogramas, para comparação e avaliação da presença ou ausência desses ácidos fenólicos.

Conforme exposto na Figura 26, na metodologia desenvolvida, o pico de ácido gálico apresentou um tempo de retenção de 6,5 minutos e o pico de ácido ferúlico em 11,6 minutos. Dessa forma, pelo método desenvolvido, foi possível concluir que somente o ácido gálico foi encontrado devido ao mesmo tempo de retenção quando feita a comparação.

O ácido ferúlico é geralmente encontrado ligado a proteínas, lignina, hemicelulose e/ou polissacarídeos por meio de ligações éter ou éster na parede celular. E não sendo encontrado na forma livre, com a forma ligada pode haver a alteração do tempo de retenção, por isso não foi possível identificar o pico para o ácido ferúlico no cromatograma do extrato Pilsen. Além disso, durante a etapa de torrefação, o ácido ferúlico e o ácido p-cumárico podem ser descarboxilados através de reações de Maillard em seus vinilfenóis correspondentes: vinil-guaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol) e p-vinilfenol (4-hidroxiestireno), respectivamente (Zago *et al.*, 2022).

No estudo conduzido por Becker; Stegmüller e Richling (2022), a fase móvel foi composta pela Fase A – água com 0,1% de ácido fórmico e pela Fase B – acetonitrila e a taxa de fluxo foi 0,8 mL.min⁻¹. Os comprimentos de onda analisados foram 280, 300 e 320 nm. A análise do UHPLC foi acoplada ao espectrômetro de massas e dessa forma foram encontrados apenas dehidrodímeros do ácido ferúlico, comprovando que grande parte do ácido ferúlico em extrato de bagaço de malte se encontra na forma ligada e não na forma livre.

FIGURA 26 – Cromatogramas dos padrões de ácido gálico (A) e ácido ferúlico (B) na concentração 50 µg.mL⁻¹ e seus respectivos tempos de retenção



Fonte: A autora

Pode-se comparar os resultados obtidos com outros estudos que foram realizados com extratos de bagaço de malte, em que também identificaram pico relacionado ao ácido gálico, com tempo de retenção próximo a 6,5 min em $\lambda = 280$ nm. As principais condições, bem como os compostos fenólicos encontrados nesses estudos estão demonstrados na Tabela 8.

TABELA 8 – Principais compostos fenólicos encontrados em diferentes estudos com extratos de bagaço de malte

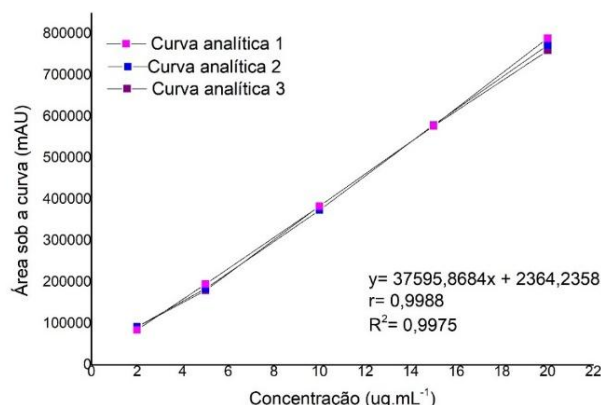
Autores	Fase móvel	Taxa de fluxo	Compostos fenólicos encontrados
Almeida <i>et al.</i> (2017)	Fase A – Água com 1% de ácido fosfórico Fase B – Metanol	1 mL.min ⁻¹	<u>Ácido gálico</u> (tempo de retenção = 6,65 minutos em $\lambda = 280$ nm) Catequina Ácido siríngico Kaempferol
Andres <i>et al.</i> (2020)	Fase A – Água com 2,5% de ácido fórmico Fase B – Acetonitrila com 2,5% de ácido fórmico	1 mL.min ⁻¹	<u>Ácido gálico</u> (composto majoritário) Ácido 4-hidroxifenilacético Epicatequina
Rahman <i>et al.</i> (2021)	Fase A – Água com 0,1% de ácido acético Fase B – Metanol com 0,1% de ácido acético	0,7 mL.min ⁻¹	<u>Ácido gálico</u> Ácido clorogênico

Fonte: A autora

Para a avaliação da linearidade do método, foram obtidas cinco concentrações distintas (2; 5; 10; 15 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi possível observar a relação linear entre a área do pico e a concentração do ácido gálico na faixa de concentração testada. Na Figura 27, estão representadas as 3 curvas analíticas obtidas na triplicata, e sua respectiva equação da reta $y = 37595,8684x + 2364,2358$, com o valor de r igual a 0,9988. Quanto mais próximo a 1 for o valor de r, significa que há maior qualidade na regressão linear obtida (ANVISA, 2017).

O desvio padrão relativo da inclinação (DPR) foi igual a 1,51%, estando dentro do limite estabelecido pela ICH e ANVISA, que é até 5%. O valor de b está dentro do intervalo de confiança de 95% da curva analítica, pelo teste de variância (ANOVA).

FIGURA 27 – Representação gráfica das curvas analíticas padrões (n=3) do ácido gálico obtidas por UHPLC na faixa de concentração de 2 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$



Fonte: A autora

Porém, somente pelo valor de r não é possível afirmar a linearidade do método, sendo necessário também o teste de falta de ajuste, que avalia a variação dos valores residuais (Gomes *et al.*, 2015). O teste ANOVA para a linearidade está presente na Tabela 9. Não há falta de ajuste na regressão linear quando o valor de F é menor que o valor do F tabelado (Klein; Longhini; de Mello, 2012).

TABELA 9 – Resultados de ANOVA para linearidade do método

	SS	dF	MS	F	F _{tab}
Modelo	$9,04 \times 10^{11}$	1	$9,04 \times 10^{11}$	5231,65	4,67
Resíduo	$2,24 \times 10^9$	13	$1,72 \times 10^8$	Linear	
Falta de ajuste	$6,24 \times 10^8$	3	$2,08 \times 10^8$	1,28	3,71
Erro puro	$1,62 \times 10^9$	10	$1,62 \times 10^8$	Não há falta de ajuste	

Fonte: A autora

Notas: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados; F valor F experimental; F_{tab} : valor de F tabelado.

Com os resultados obtidos na linearidade foi possível calcular os limites de detecção e de quantificação através das Equações 1 e 2, respectivamente. O limite de detecção corresponde a menor quantidade de analito que o método desenvolvido consegue detectar, já o limite de quantificação corresponde a quantidade da substância teste que pode ser quantificada (ANVISA, 2017). Os valores obtidos foram

0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Os valores são bem menores do que os valores da faixa de concentração definida, o que permite assegurar a viabilidade desse método para a detecção e quantificação de ácido gálico.

A precisão é definida como a avaliação da proximidade entre as medidas individuais e deve ser expressa em repetibilidade ou precisão intradia e precisão intermediária ou inter-dia. Na repetibilidade, há a necessidade da concordância dos dados obtidos, de um mesmo método, realizado nas mesmas condições e no mesmo dia. Já na precisão intermediária, há a necessidade de serem realizados em dias diferentes, para avaliação das variações (ANVISA, 2017).

Os valores do coeficiente de variação (CV), demonstrados na Tabela 10, foram inferiores a 5% e através da análise estatística ($p < 0,05$), foi possível perceber que não houve diferença estatística significativa e, portanto, o método pode ser considerado preciso.

TABELA 10 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária

Parâmetros	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	*CV (%)
Repetibilidade (n=12)	10	0,46
Precisão intermediária (n=12)	10	1,81

Fonte: A autora

Notas: CV – coeficiente de variação

Através da exatidão é possível perceber se os dados experimentais estão próximos de um valor teórico de referência. O método usado para avaliação da exatidão foi de recuperação e os valores de recuperação obtidos ficaram na faixa de 95,85% até 99,27%, conforme demonstrado na Tabela 11, que caracteriza o método como exato, segundo o que é estabelecido pela ANVISA (2017) e ICH (2005), uma vez que todos os valores são superiores a 95%.

TABELA 11 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de exatidão

Concentração teórica de ácido gálico ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Recuperação (%)
400	0,16	95,85
500	0,32	97,32
800	0,18	99,27

Fonte: A autora

Notas: CV – coeficiente de variação

A robustez de um método é medida através do coeficiente de variação e através desse valor é possível avaliar se o método desenvolvido permanece sem alterações em seus resultados quando são feitas pequenas mudanças em algumas condições do teste. Os parâmetros avaliados, descritos na Tabela 12, foram o fluxo de fase móvel (0,6 e 0,605 mL.min⁻¹), temperatura da coluna (25 e 30 °C) e ainda a temperatura da amostra (15 e 20 °C). Os valores do coeficiente de variação foram inferiores a 5% e devido a isso, o método pode ser considerado robusto, considerando $p < 0,05$.

TABELA 12 – Valores experimentais obtidos nos ensaios de robustez (n=3)

Parâmetros		CV (%)
Fluxo da fase móvel ($\pm 0,005$ mL.minuto ⁻¹)	0,6 mL.min ⁻¹	0,62
	0,605 mL.min ⁻¹	0,61
Temperatura da coluna (± 5 °C)	30 °C	0,92
	25 °C	0,57
Temperatura da amostra (± 5 °C)	15 °C	0,82
	20 °C	0,82

Fonte: A autora

Notas: CV – coeficiente de variação

Os resultados do teste de estabilidade de 21 dias realizado com o ácido gálico estão demonstrados na Tabela 13.

TABELA 13 – Valores de concentração da solução de ácido gálico, armazenada em frasco âmbar, obtidos durante estudo de estabilidade

Dias do teste	Concentração experimental obtida (ug.mL ⁻¹)
0	9,60 $\pm$ 0,05 ^a
7	8,06 $\pm$ 0,03 ^b
14	6,69 $\pm$ 0,03 ^c
21	5,16 $\pm$ 0,04 ^d

Fonte: A autora

Notas: Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Foi possível perceber que em *vial* transparente (com exposição a luz), o ácido gálico foi completamente degradado após 7 dias de leitura. Já em frasco âmbar (sem exposição a luz), já houve uma redução considerada significativa ($p < 0,05$) em análise estatística depois de 7 dias e, ao longo dos 21 dias, a redução da concentração desse ácido fenólico continuou ocorrendo, a qual pode ser explicada pela presença de água

e conseqüentemente de oxigênio, que pode promover a oxidação e degradação do ácido gálico ao longo dos dias.

2.4 CONCLUSÃO

As amostras EBMP e EBMC foram os extratos mais promissores para aplicação cosmética, considerando a maior concentração de compostos fenólicos e maior inibição dos radicais ABTS•+. Porém, devido a maior produção mundial da cerveja e conseqüentemente do bagaço de malte tipo Pilsen, somente EBMP foi selecionado para a continuidade do estudo.

Além da atividade antioxidante, demonstrada pelo teste dos radicais ABTS•+, o EBMP apresentou ação prebiótica, uma vez que por ser um alimento, é um material rico em compostos fenólicos e nutrientes necessários para o crescimento de bactérias benéficas ao organismo humano. E na atividade antibacteriana, não houve inibição da bactéria *Staphylococcus epidermis*, a qual faz parte da microbiota cutânea, o que é interessante para que não haja desequilíbrio desse microrganismo residente na pele, evitando com que ocorram irritações após aplicação do extrato como ingrediente cosmético.

Com a finalidade de explorar o uso de EBMP para uso cosmético, já que além das atividades antioxidante e prebiótica que apresenta, não se mostrou citotóxico em concentrações $\leq 1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em fibroblastos 3T3, foram desenvolvidas formulações contendo amido como polímero e o extrato de bagaço de malte como ativo, cujos processos de desenvolvimento e caracterizações serão discutidos nos capítulos seguintes.

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE AMIDO DE MANDIOCA E POLI (VINIL ÁLCOOL) CONTENDO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN

RESUMO: Os filmes de amido de e poli (vinil álcool) ou PVA são filmes transparentes, inodoros, biodegradáveis, biocompatíveis e resistentes mecanicamente. Considerando essas características, esses filmes tornam-se interessantes sistemas de liberação de ingredientes cosméticos, como do extrato de bagaço de malte tipo Pilsen (EBMP). Dessa forma, os filmes de amido e PVA foram desenvolvidos por *solvent casting* e foi feita a adição de EBMP nas concentrações 5% e 10% (% m.m⁻¹). Na avaliação das propriedades mecânicas, pode-se perceber que o aumento da concentração de 5% para 10% ocasionou aumento da resistência mecânica e do módulo elástico e redução na elongação, o que indica que o aumento de extrato ocasiona a formação de filmes mais resistentes, rígidos e pouco flexíveis, fraturando-se facilmente. Além disso, pela microscopia eletrônica foi possível observar que o filme com 10% de extrato apresentou uma estrutura mais homogênea, sem a presença de depressões ou rugosidades, que são observadas no filme com 5%, e isso pode justificar o menor valor de permeabilidade ao vapor d'água (mais oclusivo) do filme com a maior concentração de extrato ($1,41 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$). Como o extrato apresentou uma coloração amarela, o filme com maior teor de extrato também se apresentou mais opaco ($53,98 \pm 6,73 \text{ \%}.\mu\text{m}^{-1}$) e menos transparente. Houve a liberação dos compostos fenólicos durante as 4 horas de teste para os filmes com 5% e 10% (% m.m⁻¹) nas condições simuladas da pele (32 °C e pH 5,5). Considerando os resultados obtidos, foi possível concluir que o filme com 5% (% m.m⁻¹) de EBMP é melhor alternativa de máscara facial para aplicação cosmética.

Palavras-chave: Amido/PVA filmes. Extrato. Propriedades mecânicas. *Solvent casting*. Liberação de ativos.

3.1 INTRODUÇÃO

Devido a problemas ambientais ocasionados pela poluição e problemas de saúde pelo acúmulo de algumas substâncias no organismo ao longo do tempo, os plásticos, de origem sintética, vêm sendo substituídos por biopolímeros de origem natural, que são biodegradáveis e biocompatíveis. Um exemplo de biopolímero que é encontrado de forma abundante em diferentes espécies vegetais, que é amplamente utilizado dentro da área alimentícia, mas também pode ser usado em formulações cosméticas, é o amido (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

Além de apresentar baixo custo e baixa toxicidade, o amido apresenta a propriedade de formação de filmes, atuando como um sistema de liberação de ativos. Porém, quando o amido é usado isoladamente, este por ser altamente solúvel em

água, acaba sendo um material sensível a umidade e que pode se dissolver com facilidade se não for armazenado em ambiente com condições controladas de umidade. Além disso, os filmes de amido apresentam baixa resistência a tração e dependendo da aplicação, podem romper-se, não mantendo a integridade do material. Para suprir essas limitações, recomenda-se a mistura do amido com outros polímeros biodegradáveis compatíveis, como o poli (álcool vinílico) ou PVA, bem como a adição de plastificantes, como o glicerol, para o aprimoramento das propriedades físico-químicas dos filmes. O PVA, quando isolado, torna-se caro e por isso é preferível a mistura do amido com o PVA, com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas dos filmes, além de reduzir a hidrofilicidade desses materiais, aumentando suas resistências a água, tornando-os mais acessíveis economicamente. Já o glicerol, como plastificante, atua melhorando a flexibilidade e a integridade dos filmes poliméricos (de Andrade *et al.*, 2022; Delavari; Stiharu, 2022).

Além de polímeros e plastificantes, também pode ser feita a adição de ativos nos filmes poliméricos. Dentro da área cosmética, tem-se buscado cada vez mais por formulações com ingredientes naturais, de origem vegetal (Carvalho *et al.*, 2024). Portanto, no presente trabalho optou-se em usar como ativo nos filmes poliméricos o extrato de bagaço de malte (EBM) tipo Pilsen ou EBMP, pois além de ser sustentável pelo reaproveitamento de um subproduto que poderia ser descartado incorretamente na natureza, também é derivado da cevada e apresenta atividades antioxidante e prebiótica, como comprovado no capítulo anterior. Os filmes foram desenvolvidos com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP e foram avaliadas suas propriedades físico-químicas, mecânicas, térmicas e de barreira, bem como a liberação dos compostos fenólicos dos filmes, quando estes foram submetidos a diferentes meios (meio aquoso/tampão pH 5,5) e temperaturas distintas (25 °C e 32 °C), focando na aplicação cosmética de máscaras faciais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material

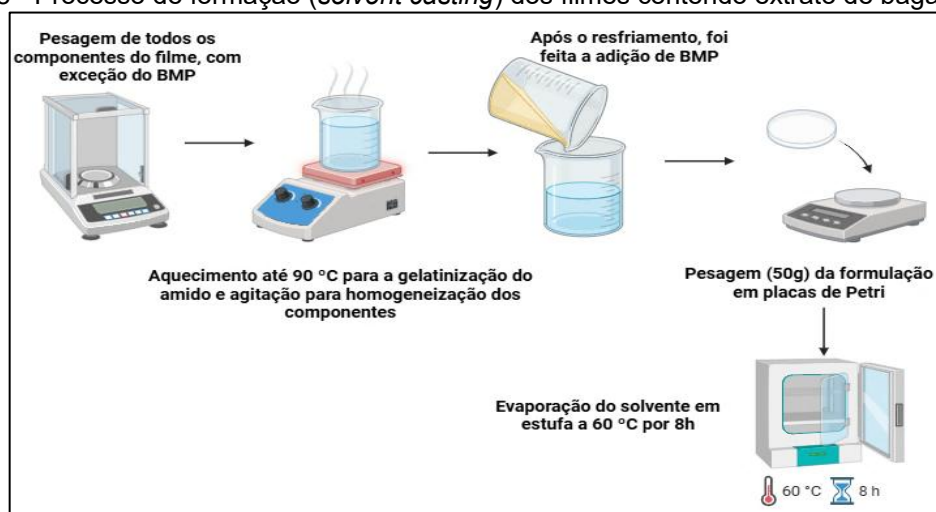
Para a obtenção dos filmes, foi utilizado como polímeros tanto o amido de mandioca (lote AGG071), fornecido pela Agrícola Horizonte Ltda (Marechal Cândido

Rondon, Paraná, Brasil), quanto o poli (álcool vinílico) ou PVA (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Darmestádio, Alemanha) e como plastificante, a glicerina PA (Reatec – Colombo, Paraná, Brasil). Para a simulação de uma pele saudável e jovem, foram preparadas soluções tampão fosfato pH 5,5, usando os sais fosfato de potássio monobásico PA (Reatec – Colombo, Paraná, Brasil) e fosfato de sódio dibásico anidro PA (Reatec – Colombo, Paraná, Brasil). O cloreto de cálcio anidro P.A (Êxodo Científica, Sumaré, São Paulo, Brasil) foi usado tanto no teste de permeabilidade ao vapor d'água, quanto nos dessecadores com UR=0. O nitrato de magnésio P.A (Dinâmica Química Contemporânea Ltda – Indaiatuba, São Paulo, Brasil) e cloreto de sódio P.A (Biotec Reagentes Analíticos – São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) foram usados nos dessecadores com UR=53% e UR=75%, respectivamente, para os testes de propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor d'água.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Desenvolvimento dos filmes de amido/PVA com e sem extrato de bagaço de malte

Os filmes de amido foram desenvolvidos por *solvent casting*, conforme descrito no trabalho de Ludka *et al.* (2023) e ilustrado na Figura 28, com adaptações. Cerca de 50g das formulações, descritas na Tabela 14, foram transferidas para placas de Petri plásticas (dimensões de 150 mm x 20 mm) e secas em estufa (LUCADAMA, modelo SLSDc-110L, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), até a completa evaporação do solvente, a 60 ± 2 °C, por tempo aproximado de 8 horas. Após as 8 horas, os filmes foram retirados das placas, com auxílio de pinças, e armazenados em sacos plásticos envolvidos com papel alumínio, para garantir a proteção à luz, em incubadora BOD para a manutenção da temperatura em 25 ± 2 °C.

FIGURA 28 - Processo de formação (*solvent casting*) dos filmes contendo extrato de bagaço de malte

Fonte: A autora

Somente o EBMP foi utilizado no desenvolvimento dos filmes poliméricos. O EBMP foi incorporado nos filmes poliméricos nas concentrações de 5% e 10%, calculadas a partir do amido, que é o componente presente em maior quantidade na formulação. Portanto, considerando que a proporção de amido nos filmes é de 3,32%, o extrato está presente nas concentrações correspondentes a 0,166% para os filmes com 5% de EBMP e 0,332% para os filmes com 10% de EBMP. As porcentagens 5% e 10% foram usadas na nomenclatura das amostras, com a finalidade de facilitar a visualização, já que números inteiros são mais facilmente visualizáveis quando comparados aos números decimais.

TABELA 14 - Formulações dos filmes de amido/PVA, com e sem o extrato de bagaço de malte

Composição	Formulações		
	Filme Controle	Filme 5% EBMP	Filme 10% EBMP
Amido de mandioca (%)	3,32	3,32	3,32
*PVA (%)	0,66	0,66	0,66
Glicerina (%)	0,66	0,66	0,66
*EBMP-L (%)	-	0,166	0,332
Água destilada (mL)	qsp. 100 mL	qsp. 100 mL	qsp. 100 mL

Fonte: A autora

Notas: *PVA: poli (vinil álcool); *EBMP-L: extrato de bagaço de malte tipo Pilsen na forma líquida. As concentrações de todos os componentes da formulação foram calculadas em relação à proporção de amido (% , m.m⁻¹).

3.2.2.2 Caracterização dos filmes de amido/PVA com e sem extrato de bagaço de malte

3.2.2.2.1 *Determinação da espessura dos filmes*

Para avaliação da espessura foram realizadas 10 medidas de pontos aleatórios nos filmes, usando micrômetro digital (Carbon Fiber Composite Digital Thickness Gauge), com resolução de 0,01 mm. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e a significância dos resultados foi verificada por ANOVA com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

3.2.2.2.2 *Determinação da densidade dos filmes*

Para a análise da densidade, os filmes foram cortados nas dimensões de 2cm x 2cm e armazenados durante 7 dias em dessecador com UR=0, para eliminar a interferência da umidade nos resultados. Após os 7 dias, os filmes foram pesados em balança analítica (MARTE CIENTÍFICA, modelo AL-500, São Paulo, Brasil) para a obtenção das massas (g), necessárias para o cálculo da densidade (g.cm^{-3}). O volume foi determinado através das dimensões dos filmes (comprimento, largura e espessura). A densidade foi calculada pela razão entre a massa e o volume dos filmes. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3.2.2.2.3 *Determinação da opacidade aparente dos filmes*

A opacidade aparente foi avaliada através do sistema de cores CIE $L^*a^*b^*$, com o uso de colorímetro digital (HUNTERLAB, modelo MiniScan EZ, Reston, Virginia, Estados Unidos), usando o iluminante D65. Foram utilizados tanto o padrão branco, quanto o padrão preto e os resultados foram expressos em função da espessura ($\%.\mu\text{m}^{-1}$). O teste foi realizado em sextuplicata, e o cálculo de opacidade aparente está demonstrado na Equação 5, sendo L_p o valor da luminosidade em padrão preto e L_b o valor da luminosidade em padrão branco.

$$\% \text{ Opacidade aparente} = \frac{(100 \times L_b)}{L_p} \quad (5)$$

3.2.2.2.4 Avaliação da microestrutura dos filmes

A análise da microestrutura dos filmes foi feita com o uso de microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca) e para isso, foram feitas criofraturas dos filmes com nitrogênio líquido. Antes da visualização das eletromicrografias das amostras no equipamento, os filmes foram fixados em stubs com fitas de carbono e metalizados com ouro em metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater, Quioto, Japão). As eletromicrografias foram obtidas, empregando voltagem de aceleração de 10 kV e o registro das imagens foi realizado pelo software específico do equipamento (*Electron Optical Design*).

3.2.2.2.5 Análise térmica dos filmes

Para realizar a análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos filmes, estes foram armazenados em dessecador com UR=0 por 7 dias e após os 7 dias, foram acondicionados em células calorimétricas de alumina para serem analisados termicamente. O instrumento STA 600 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado previamente usando índio (In; P.F.= 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão. Os termogramas e curvas de DSC foram obtidos sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C.min⁻¹ e a faixa de temperatura utilizada foi de 20 °C a 500 °C.

3.2.2.2.6 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) dos filmes

Para a análise espectroscópica, os filmes foram cortados nas dimensões 2 cm x 2 cm e armazenados em dessecador com UR=0 por 7 dias. Após os 7 dias, os espectros foram obtidos com auxílio de espectrofotômetro (SHIMADZU, modelo IRPrestige-21, Quioto, Japão) provido de um módulo para leitura de Refletância Total Atenuada Universal (UATR) MIRacle A com base de cristal diamante/ZnSe com tripla

reflexão. As análises foram realizadas na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com parâmetro de 32 scan.min^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.2.2.7 Avaliação das propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas foram determinadas através do teste de tração, conforme preconizado pela *American Society for Testing and Material* (ASTM D-882-91, 1996). Para isso, os filmes foram cortados nas dimensões 5cm x 2cm, obtendo no total 10 corpos de prova (5 cortados no sentido longitudinal e 5 no sentido transversal) e condicionados em dessecador com UR=53%, por 48 horas antes da análise. Em seguida, foi feito o teste mecânico dos corpos de prova, utilizando velocidade de tração de 50 mm.min^{-1} , em Máquina Universal de Ensaio Mecânicos (SHIMADZU, modelo AG-I 10 kN, Quioto, Japão) com distância entre as garras pneumáticas de 30 mm. As seguintes características foram determinadas: tensão máxima na ruptura (MPa), módulo de Young ou módulo elástico (MPa) e elongação (%).

3.2.2.2.8 Perda de peso ou solubilidade em água dos filmes

Para avaliação da perda de peso em água, os filmes foram cortados nas dimensões 2cm x 2cm e armazenados em dessecador com UR=0 por 7 dias. Após os 7 dias, os filmes e os pesa-filtros vazios foram pesados e em seguida os filmes foram colocados em pesa-filtros contendo 20 mL de água destilada. Os filmes foram mantidos em contato com a água por 48 horas, sendo os pesa-filtros armazenados em incubadora BOD, para manutenção da temperatura 25 ± 2 °C. Após 48 horas, foi retirado o excesso de água dos pesa-filtros e estes, com os filmes no interior, foram colocados para secagem em estufa (BIOMATRIC, modelo 1306, Porto Alegre, Brasil) a 100 ± 2 °C por 4 horas. Após atingir temperatura ambiente, os pesa-filtros foram novamente pesados, para avaliação da solubilidade em água através da gravimetria.

3.2.2.2.9 Permeabilidade ao vapor d'água dos filmes

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a *American Society for Testing and Material* (ASTM E-96-95, 1995). Os filmes, nas dimensões de 6cm x 1,5cm, foram colocados previamente em dessecador com UR=53% pelo período de 7 dias antes da realização da análise. Após os 7 dias, as amostras foram posicionadas na abertura circular da célula de permeação, com diâmetro de 6 cm, e coladas com auxílio de cola epóxi premium (Aralbras, Joinville, Brasil), para garantir que a migração da umidade ocorra exclusivamente através do filme. Antes da colocação dos filmes, o interior da célula foi preenchido com cloreto de cálcio anidro (UR=0), e em seguida, os sistemas foram colocados em dessecador com UR=75% (contendo solução saturada de cloreto de sódio) e temperatura de 25 °C. Sucessivas pesagens foram realizadas a cada 1 hora até um tempo total de 9 horas e depois 24 horas para registrar o ganho de massa adquirido pelas amostras. O teste foi realizado em triplicata.

O ganho de massa (m) foi plotado em função do tempo (t), sendo determinado o coeficiente angular por meio da equação da reta, obtida por regressão linear e a taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), em g.s⁻¹.m⁻¹, foi calculada conforme a Equação 6, onde A é a área de permeação do filme (m²).

$$TPVA = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A} \quad (6)$$

A espessura dos filmes foi medida e a permeabilidade ao vapor d'água (PVA), em g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹, foi calculada pela Equação 7, onde Ps corresponde a pressão de saturação do vapor d'água (Pa), UR1 é a umidade relativa no dessecador, UR2 é a umidade relativa na célula de permeação e E é a espessura dos filmes (m). Neste trabalho, o valor calculado para Ps(UR1-UR2) foi 2375,39 Pa.

$$PVA = \left[\frac{TPVA}{P_s (UR1-UR2)} \right] \times E \quad (7)$$

3.2.2.2.10 Determinação do grau de intumescimento dos filmes

O grau de intumescimento dos filmes foi avaliado, em triplicata, por método gravimétrico, segundo descrito por Liu, Zheng e Tang (2013). Os filmes foram cortados nas dimensões 2cm x 2cm, armazenados em dessecador com UR=0 por 7 dias e após os 7 dias, foram pesados, para obtenção do peso seco (Ps). Em seguida, as amostras foram colocadas em pesa-filtros com 20 mL de solução tampão pH 5,5 em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após os tempos 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas em contato com a solução tampão, as amostras foram removidas da imersão, o excesso de meio foi retirado com papel filtro e os filmes foram novamente pesados para obtenção do peso úmido (Pu). O grau de intumescimento (GI), obtido em porcentagem, foi calculado conforme a Equação 8, em que Pu é o peso da amostra úmida e Ps o peso da amostra seca:

$$GI (\%) = \frac{Pu - Ps}{Ps} \times 100 \quad (8)$$

3.2.2.3 Avaliação da dissolução *in vitro* dos compostos fenólicos totais presentes no extrato de bagaço de malte liberado dos filmes poliméricos

Para o ensaio de dissolução, seguiu-se o protocolo de Ludka *et al.* (2023). Para isso, os filmes foram cortados nas dimensões 2cm x 2cm e armazenados em dessecador com UR=0 por 7 dias. Após os 7 dias, os filmes foram imersos em 10 mL de solução tampão pH 5,5. A temperatura testada foi 32 ± 2 °C, a qual foi mantida em estufa de secagem com circulação de ar (LUCADAMA, modelo SLSDc, São Paulo, Brasil) e os filmes foram mantidos em repouso durante a liberação. Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h e 1 mL também foi repostado, para garantir que não ocorra a saturação da amostra no meio. As alíquotas coletadas foram avaliadas por meio de método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, que permite a quantificação de compostos fenólicos totais. Para isso, em um tubo de ensaio, foram adicionados: 200 µL das amostras, 7 mL de água destilada, 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de carbonato de sódio 10,6% (% m.v⁻¹). A reação ocorreu por 5 minutos, em banho-maria a 50 °C, e em seguida o conteúdo foi transferido para cubeta de quartzo, para leitura da absorbância em espectrofotômetro

(BEL PHOTONICS, modelo UV-M51, Piracicaba, São Paulo, Brasil), em comprimento de onda $\lambda=715$ nm. Foi obtida a curva padrão de ácido gálico nas concentrações 1; 5; 20; 25 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O teste foi realizado em triplicata para todas as condições testadas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Desenvolvimento dos Filmes de Amido/PVA com e sem Extrato de Bagaço de Malte

Como representado pelo Filme com 5% de EBMP na Figura 29, os filmes obtidos foram incolores. Além disso, os filmes também foram inodoros, o que os torna adequados e com melhor aceitação para aplicação facial, em máscaras cosméticas. Porém, futuros estudos em voluntários(as) humanos(as) seriam necessários para confirmar a aceitabilidade dos filmes como produtos cosméticos.

FIGURA 29 – Foto do Filme com 5% (% m.m^{-1}) de EBMP



Fonte: A autora

Notas: EBMP – extrato de bagaço de malte tipo Pilsen

Após o amido de milho, o amido de mandioca é o mais produzido no Brasil, sendo este país o segundo maior produtor mundial de mandioca. O excedente de produção do amido de mandioca motivou a escolha desse tipo de amido para a produção dos filmes (de Oliveira *et al.*, 2018). Portanto, filmes de amido de mandioca

com PVA, que também é um polímero biodegradável, são alternativas acessíveis e sustentáveis para aplicação em máscaras cosméticas.

3.3.2 Caracterização dos Filmes de Amido/PVA com e sem Extrato de Bagaço de Malte

3.3.2.1 Determinação da espessura, densidade e opacidade aparente dos filmes

Os dados de espessura, densidade e opacidade aparente estão presentes na Tabela 15. A espessura é um parâmetro que está diretamente ligado com a resistência mecânica, transmissão de luz e permeabilidade ao vapor d'água e depende da composição da matriz do filme da embalagem (Abedl-Firoozjah *et al.*, 2023). Pode-se perceber que o extrato de bagaço de malte, independente da concentração, não interferiu na espessura dos filmes. No trabalho de Kumar *et al.* (2021), a espessura aumentou de 0,055 mm para 0,062 mm com aumento na concentração de extrato de 0% para 20%, porém não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na espessura do filme. No presente trabalho, o valor da espessura aumentou de 0,07 mm para o filme Controle até 0,09 mm para o filme com 5% de EBMP, porém mesmo com o aumento da concentração do extrato, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Em relação aos resultados de densidade, houve um aumento desse parâmetro para o filme com 5% de extrato ($1,47 \pm 0,09 \text{ g.cm}^{-3}$) quando comparado ao filme Controle ($1,28 \pm 0,04 \text{ g.cm}^{-3}$). O aumento da densidade pode ser explicado pelas ligações de hidrogênio que os compostos presentes no extrato podem apresentar com outros componentes da matriz do filme, preenchendo os espaços vazios que podem existir e tornando a estrutura mais densa e compacta (Qin *et al.*, 2020).

O filme com 10% de extrato pode ser considerado mais opaco quando comparado aos demais. A opacidade aumenta com o aumento da concentração de polifenóis e esse aumento está relacionado à cor dos polifenóis. Da mesma forma, o extrato de bagaço de malte apresentou-se com uma coloração mais amarelada, fazendo com que o aumento da concentração de extrato aumentasse a opacidade do filme (Yu *et al.*, 2022). Entretanto, para a proporção de 5% de extrato (Filme com 5% de EBMP), a concentração de extrato foi pequena e não influenciou na opacidade dos filmes.

Considerando a aplicação em máscaras cosméticas, é desejável que o filme seja aparentemente agradável ao consumidor, sendo de preferência transparente ou translúcido, sem alteração de cor, para não levar a interpretação de um produto que possa estar em processo de oxidação e/ou degradação. Futuros estudos de aceitabilidade de produto cosmético em voluntários humanos seriam necessários para confirmar esta informação, porém o teste para avaliar a opacidade aparente é uma alternativa que precede testes *in vivo* e que permite avaliar características físicas dos filmes.

Considerando um filme com menor valor de opacidade aparente, quando comparado aos demais, e que seja mais transparente/translúcido, o Filme com 5% de EBMP seria o mais adequado para aplicação facial, porém mais parâmetros foram avaliados e discutidos nos próximos tópicos para chegar a esta conclusão.

TABELA 15 - Valores de espessura, densidade e opacidade aparente dos filmes obtidos

Amostras	Espessura (mm)	Densidade (g.cm⁻³)	Opacidade aparente (%.µm⁻¹)
Filme Controle	0,07 ± 0,02 ^a	1,28 ± 0,04 ^a	35,08 ± 2,48 ^a
Filme com 5% de EBMP	0,09 ± 0,03 ^a	1,47 ± 0,09 ^b	35,86 ± 1,85 ^a
Filme com 10% de EBMP	0,08 ± 0,02 ^a	1,42 ± 0,06 ^{a,b}	53,98 ± 6,73 ^b

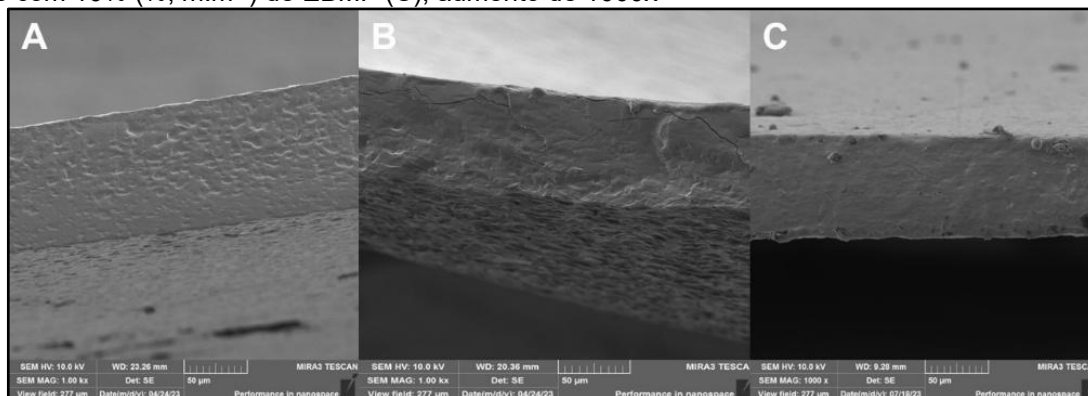
Fonte: A autora

Notas: EBMP – extrato de bagaço de malte tipo Pilsen. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, p≤0,05).

3.3.2.2 Avaliação da microestrutura dos filmes

Na microscopia eletrônica da criofratura dos filmes, cujas eletromicrografias estão mostradas na Figura 30, foi possível observar que o filme Controle apresenta superfície de fratura mais irregular e heterogênea. O filme com 5% de extrato apresentou superfície mais rugosa, enquanto o filme com 10% de extrato apresentou a superfície mais lisa e homogênea.

FIGURA 30 - Fotomicrografias das criofraturas dos filmes Controle (A), com 5% (% m.m⁻¹) de EBMP (B) e com 10% (% m.m⁻¹) de EBMP (C), aumento de 1000x



Fonte: A autora

No estudo de Yu *et al.* (2022), quando houve aumento da concentração dos polifenóis (de 8% e 10%) na matriz polimérica dos filmes, a homogeneidade diminuiu. A quantidade excessiva de polifenóis de chá fez com que a estrutura do filme se rompesse. Nas concentrações de 2%, 4% e 6% de polifenóis, os filmes se mantiveram uniformes devido a possível interação, por ligações de hidrogênio, dos polifenóis com o amido e o PVA.

Nesse sentido, nas concentrações testadas, podemos concluir que o material se mostrou homogêneo e sem tendência à separação de fases, o que evidencia a boa interação entre a matriz e os compostos fenólicos.

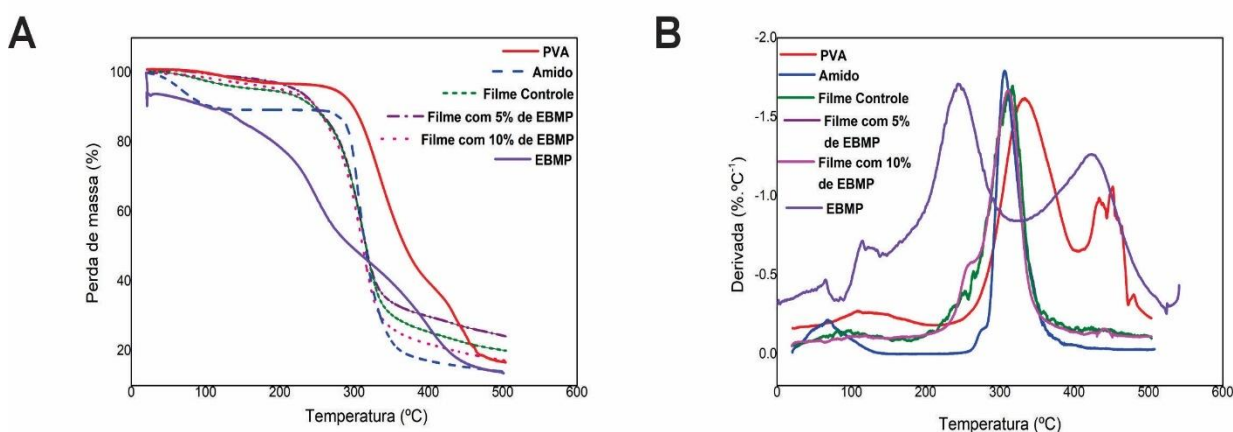
3.3.2.3 Análise térmica dos filmes

A curva obtida na análise de TGA é uma representação gráfica da variação de massa da amostra versus temperatura ou tempo. Os termogramas diferem de um composto para outro e permitem a avaliação da estabilidade térmica do material, bem como da estabilidade oxidativa, composição multicomponente, vida útil do produto, cinética de decomposição e umidade e conteúdo volátil. Através dessa informação, é possível aplicar uma faixa de temperatura adequada no processo produtivo das formulações, de forma que não haja degradação dos componentes presentes. Por avaliar cada composto separadamente, a análise de TGA é adequada para misturas complexas, como é o caso de extratos e formulações contendo extratos (Brand *et al.*, 2018; Saadatkhah *et al.*, 2020).

Os gráficos de análise termogravimétrica dos filmes (Figura 31) mostraram três etapas de degradação térmica: A perda de massa inicial (100 °C) está relacionada a evaporação da água e outras substâncias voláteis. Na segunda região (200-300 °C), ocorre a degradação das cadeias de amilose e amilopectina do amido e a degradação térmica do PVA e na terceira etapa (400-500 °C), ocorre a provável oxidação da amostra. Com a adição do poli (vinil álcool), as interações entre o amido e o PVA ocorrem devido a grande quantidade de hidroxilas existentes nos dois polímeros, e isto também pode auxiliar no aumento da estabilidade térmica dos filmes. Também é possível a formação de multicamadas de silicato de carbono durante o processo de aquecimento dos filmes, que pode acarretar também na melhora da estabilidade térmica (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023; Begum *et al.*, 2019).

Pela análise das curvas de *dTG*, demonstradas na Figura 32, foi possível visualizar a temperatura de máxima degradação para a mistura do amido com PVA apresentou um sutil aumento (317 °C) quando comparada a temperatura do amido puro (300 °C). O PVA puro apresentou maior temperatura de degradação (333 °C) quando comparado às demais amostras analisadas. Além disso, a presença do extrato não interferiu na estabilidade térmica dos filmes, uma vez que os filmes com 5% e 10% de extrato apresentaram a mesma temperatura de máxima degradação (317 °C) quando comparados ao filme Controle.

FIGURA 31 - Curvas de TGA (A) e *dTG* (B) dos polímeros amido e PVA, do EBMP e dos filmes Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



Fonte: A autora

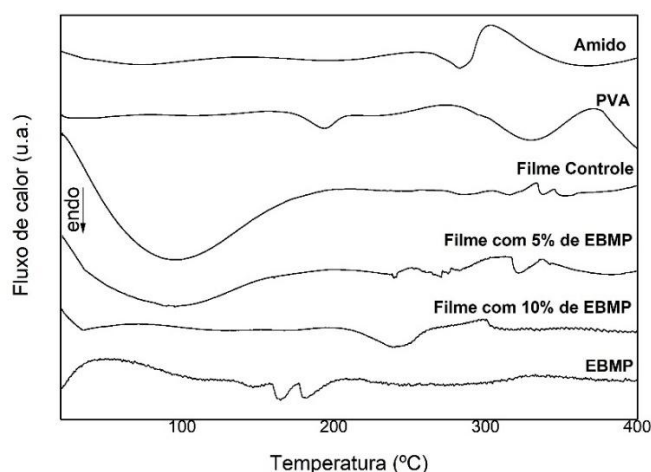
A análise de DSC permite avaliar os efeitos do calor e associá-los às alterações físicas e/ou químicas da amostra, como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, mudanças na cristalinidade) ou reações de desidratação,

decomposição, oxido-redução. Os efeitos endotérmicos geralmente estão associados aos processos de transição de fase, desidratação, redução e decomposição, já os exotérmicos com cristalização, oxidação e também com decomposição (Beninca, 2008).

Em geral, o estágio de fusão pode ser detectado pela presença de pico endotérmico em termogramas de *DSC*. Por meio da análise das curvas de *DSC* (Figura 32), o polímero PVA puro apresentou um pico endotérmico em ~ 200 °C, relacionado a fusão desse polímero, que pode variar de 200-230 °C. A estreita faixa de fusão dos filmes de amido/PVA (faixa de 330-350 °C para os filmes Controle e com 5% de EBMP e 230-250 °C para Filme com 10% de EBMP) indica a existência de fortes interações intermoleculares, que correspondem às ligações de hidrogênio entre as moléculas de PVA e amido. Caso não houvesse interações entre o PVA e o amido de mandioca, a incorporação de PVA ao amido teria reduzido as temperaturas de fusão dos filmes de amido/PVA. Porém, os filmes Controle e com 5% de EBMP apresentaram picos endotérmicos muito próximos ao segundo pico endotérmico do PVA puro. A estrutura helicoidal do amido, com muitos grupos hidroxila direcionados para fora do anel, interagiu e formou ligações de hidrogênio com PVA (Sin *et al.*, 2010).

Já o filme com 10% de EBM apresentou um pico endotérmico em ~ 250 °C, e a redução da temperatura de fusão do material pode estar relacionada à maior quantidade de extrato aplicada no filme, que pode comprometer as propriedades térmicas deste filme e levar a degradação em temperatura mais baixa quando comparado aos demais filmes.

FIGURA 32 - Curvas de *DSC* dos polímeros amido e PVA, do EBMP e dos filmes Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



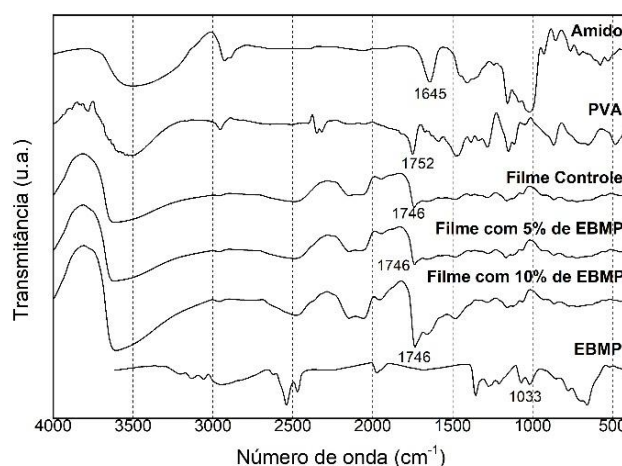
Fonte: A autora

3.3.2.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (*FTIR*) dos filmes

Através da Figura 33, foi possível observar que o amido apresenta a banda em 3387 cm^{-1} , relacionado a vibração de estiramento do grupo OH. Em 2930 cm^{-1} , ocorre o estiramento de CH_2 do grupo alcano e 1333 cm^{-1} corresponde a flexão de C-H do grupo alcano. A banda em 1641 cm^{-1} deve-se a flexão do grupo OH na molécula de água (higroscopicidade do amido). Na faixa de $1652\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$, também pode ocorrer a vibração de estiramento de $\text{C}=\text{C}$. Em 1205 cm^{-1} , ocorre a flexão C-OH. Em 1149 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} , são bandas características da vibração C-O e estiramento C-C dos grupos C-O-C da unidade de glicose do amido (Patil *et al.*, 2021).

Já no espectro do PVA, a presença da banda em 3926 cm^{-1} é devido a presença de OH, que representa a ligação de hidrogênio intra e intermolecular. As bandas entre $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ correspondem a vibração de estiramento assimétrico da ligação C-H dos grupos alquil. A banda em 1752 cm^{-1} está relacionada ao grupo C=O de acetatos residuais de PVA. Em 1414 cm^{-1} , ocorre a vibração de estiramento CH-CH_2 . No número de onda 1373 cm^{-1} , há a presença de hidrocarboneto (alcano) e na faixa de $1000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$, a vibração C-O dos grupos C-OH (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023; Patil *et al.*, 2021).

FIGURA 33 - Espectros de *FTIR* dos polímeros amido e PVA, do EBMP e dos filmes Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



Fonte: A autora

Nos filmes Controle, pela mistura de amido e PVA, foi possível perceber que na faixa de $3300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, ocorre vibração de estiramento dos grupos OH. Em 2930 cm^{-1} , a presença do grupo C-H. Em 1710 cm^{-1} , é caracterizado pela vibração da flexão

da ligação de hidrogênio do grupo OH e em 1076 cm^{-1} , o estiramento C-O. Os espectros de *FTIR* mostram que há interação por ligações de hidrogênio entre PVA e amido, devido a presença dos grupos OH e C-O (Patil *et al.*, 2021). A banda em 1746 cm^{-1} pode ser atribuída a vibração de estiramento de grupos C=O (Castanho; de Souza do Prado; de Paiva, 2022).

Os espectros de *FTIR* das amostras contendo EBMP apresentaram-se semelhantes entre si, como uma combinação dos espectros dos polímeros isolados e sem a visualização de novas bandas. Isso mostra que não ocorreram ligações químicas entre os extratos e a matriz polimérica que sejam visíveis nos espectros, o que é desejado, uma vez que durante a aplicação dos filmes como máscaras cosméticas deseja-se que os compostos fenólicos migrem da matriz para a pele, exercendo suas ações prebiótica e antioxidante.

3.3.2.5 Avaliação das propriedades mecânicas dos filmes

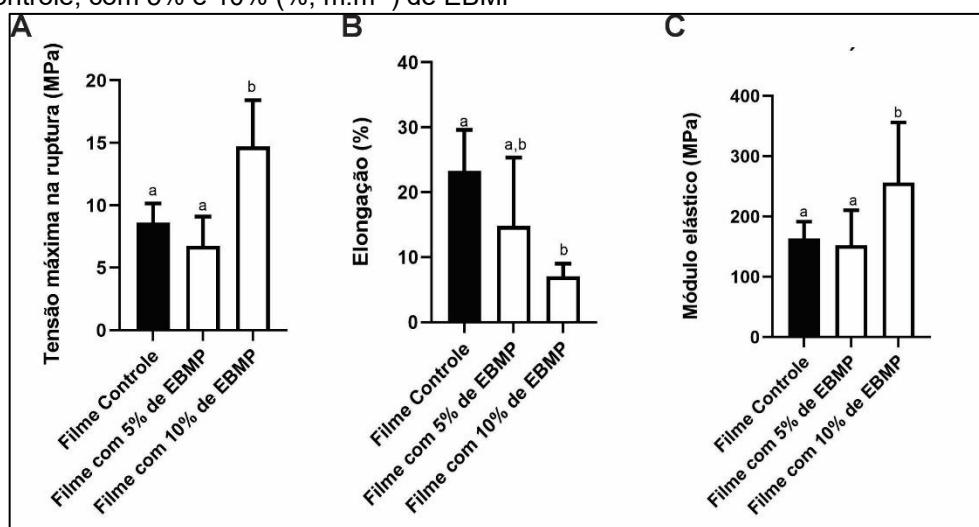
Considerando que a finalidade de aplicação do filme é em máscara facial, é importante que este material não se rompa ou quebre facilmente e devido a isso, as propriedades mecânicas foram investigadas. A tensão máxima na ruptura mede a resistência do filme contra as pressões e forças aplicadas, já a elongação avalia a deformação, ou seja, a capacidade que o filme tem de se esticar até ocorrer a ruptura e o módulo elástico consiste em uma medida de rigidez do material, e quanto maior for o valor do módulo elástico, maior a chance de ocorrer ruptura desse filme, em condições de tensão mecânica. Os gráficos de tensão máxima na ruptura (MPa), elongação (%) e módulo elástico (MPa) estão presentes na Figura 34.

A tensão máxima dos filmes com 10% de extrato foi significativamente superior à observada para a amostra Controle. O poli (vinil álcool) apresenta o grupamento C – C flexível e grande número de grupos OH, e também há compatibilidade entre o amido e o poli (vinil álcool) pelas ligações de hidrogênio, isso justifica a melhora das propriedades mecânicas quando comparado ao amido isolado em filmes (Patil *et al.*, 2021).

Ainda, ligações de hidrogênio podem ocorrer entre os compostos fenólicos do extrato com os outros componentes da matriz polimérica, incluindo os polímeros. O aumento da resistência dos filmes favorece sua aplicação comercial, tornando-o mais

resistente ao manuseio. A ocorrência de interações entre os componentes dos filmes faz com que a matriz fique mais homogênea (como mostrado nas imagens de MEV) e mais resistente (maior tensão máxima na ruptura). Por outro lado, esse fenômeno torna os filmes menos flexíveis, ou seja, com menores elongações, como é observado para o filme com 10% de extrato, quando comparado ao filme Controle e com 5% de extrato.

FIGURA 34 - Valores de tensão máxima na ruptura (A), elongação (B) e módulo elástico (C) para os filmes Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



Fonte: A autora

Notas: Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Quanto maior a possibilidade de interações químicas dos compostos fenólicos com os demais componentes, menor a mobilidade das cadeias poliméricas e mais densa a matriz polimérica, diminuindo a flexibilidade e elongação (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos dados de Yu *et al.* (2022), os quais desenvolveram filmes de amido e PVA com polifenóis de chá pela técnica de *solvent casting* e observaram que com o aumento da concentração dos polifenóis, a tensão máxima na ruptura também aumentou. Como há interação entre as moléculas de polifenóis, amido e PVA, a adição dos polifenóis em maior concentração pode ter melhorado a estrutura da matriz do filme, melhorando também a resistência à tração. Já para a elongação na ruptura, quando a concentração de polifenóis foi aumentada, houve comprometimento da estabilidade da rede polimérica do filme, fazendo com que a elongação diminuísse significativamente (Yu *et al.*, 2022).

Nos filmes de amido e PVA desenvolvidos com betalaínas da casca de pitaya vermelha, também foi observado que a resistência à tração dos filmes de amido com poli (vinil álcool) aumentou quando houve aumento da concentração do extrato de pitaya. As ligações de hidrogênio entre betalaínas, amido, PVA e glicerol fazem com que a estrutura do filme fique mais compacta, levando a uma maior resistência mecânica (Qin *et al.*, 2020).

No estudo de Kumar *et al.* (2021), em que foi observado nos filmes de amido de arroz com PVA com extrato de casca de abacaxi que o aumento da concentração de extrato ocasionou a redução na elongação na ruptura. O aumento da concentração de extrato ocasionou maior rigidez e menor extensibilidade nos filmes de amido/PVA.

Para aplicação cosmética como máscara facial é desejável que o filme seja resistente mecanicamente, porém que não seja facilmente fraturado. O filme com 5% de extrato apresentou menor valor de módulo elástico quando comparado ao filme com 10% de extrato, indicando uma menor rigidez do filme com 5% e filmes menos rígidos, tendem a sofrer deformações com menor chance de ruptura quando comparado aos filmes com maior valor de módulo elástico.

3.3.2.6 Solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes

Os filmes apresentaram valores de solubilidade em água entre 55,71 e 67,26% (Tabela 16), o que significa que esses materiais são altamente solúveis em água. A presença e o aumento da concentração do extrato não interferiram na solubilidade em água, porém houve redução da permeabilidade ao vapor d'água do filme com 10% de extrato quando comparado ao com 5% de extrato.

O filme com 10% de extrato apresentou menor valor de permeabilidade ao vapor d'água do que quando comparado ao filme com 5%, isso pode ser justificado pela dificuldade de um caminho tortuoso que o vapor d'água precise percorrer, formado pelo aumento da concentração de extrato na matriz polimérica. Além disso, houve aumento da hidrofobicidade, devido à adição de extrato no filme, o que também dificulta a passagem de vapor d'água. Os filmes com 10% de extrato são filmes mais rígidos quando comparados aos de 5%, o que confirma isso é que os filmes com 10% apresentam maior valor de módulo elástico, e, portanto, as cadeias poliméricas são

mais rígidas e menos flexíveis, o que também pode dificultar a difusão da água pela matriz e reduzir a permeabilidade ao vapor d'água (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

TABELA 16 - Valores da solubilidade em água e permeabilidade ao vapor d'água dos filmes Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP

Amostras	Perda de peso em água (%)	Permeabilidade ao vapor d'água (x 10⁻¹¹ g.m⁻¹.s⁻¹.Pa⁻¹)
Controle	67,26 ± 3,76 ^a	2,67 ^{a,b}
Filme com 5% de EBMP	66,40 ± 1,98 ^a	4,20 ^a
Filme com 10% de EBMP	55,71 ± 11,01 ^a	1,41 ^b

Fonte: A autora

Notas: EBMP – extrato de bagaço de malte tipo Pilsen. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, p≤0,05).

A solubilidade em água é um parâmetro para avaliar se a mistura entre amido e PVA é facilmente solúvel em água ou apresenta resistência a água. Essa medida está diretamente relacionada a biodegradabilidade, ou seja, quanto maior a solubilidade em água, mais rapidamente a amostra é degradada. Como os polímeros e compostos fenólicos presentes nos extratos apresentam muitas hidroxilas em suas estruturas químicas, estas se ligam, ocorrendo a solubilização dos filmes em água. Além disso, os constituintes do filme (amido, PVA e glicerol) são hidrofílicos. A elevada solubilidade dos filmes em água permite com que em peles mais hidratadas por exemplo, a presença de água pode permitir uma desintegração mais rápida da estrutura polimérica, facilitando a liberação dos compostos fenólicos do extrato na pele (Patil *et al.*, 2021).

A permeabilidade ao vapor d'água avalia a permeação da umidade através do filme para a pele ou outro meio em que o filme esteja em contato. O filme para aplicação na pele precisa ser permeável, não pode ser totalmente oclusivo, uma vez que há necessidade da troca gasosa entre a pele e o meio. Alguns fatores que podem interferir na permeabilidade ao vapor d'água incluem tipo de ativo incorporado na matriz, integridade, flexibilidade da cadeia polimérica a relação hidrofílica/hidrofóbica e condições ambientais (Patil *et al.*, 2021).

No estudo de Patil *et al.* (2021), os valores de permeabilidade ao vapor d'água para filmes de amido/PVA variaram entre $4,57 \times 10^{-10}$ até $3,17 \times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$, ocorrendo uma redução do valor com o aumento na proporção de PVA adicionado no filme. A estrutura molecular organizada do polímero PVA devido à sua natureza semicristalina e a grande quantidade de grupos OH podem ter auxiliado no aumento da polaridade e cristalinidade e consequentemente em valores mais baixos de permeabilidade ao vapor d'água.

Os resultados de permeabilidade foram compatíveis ao encontrado no estudo de Qin *et al.* (2020), em que também foi observado que com o aumento da concentração do extrato no filme, houve redução do valor de permeabilidade, uma vez que as betalaínas e outros componentes presentes em extratos vegetais podem fazer ligações de hidrogênio com o amido e PVA, tornando a estrutura mais compacta e com menos poros para a passagem de vapor d'água.

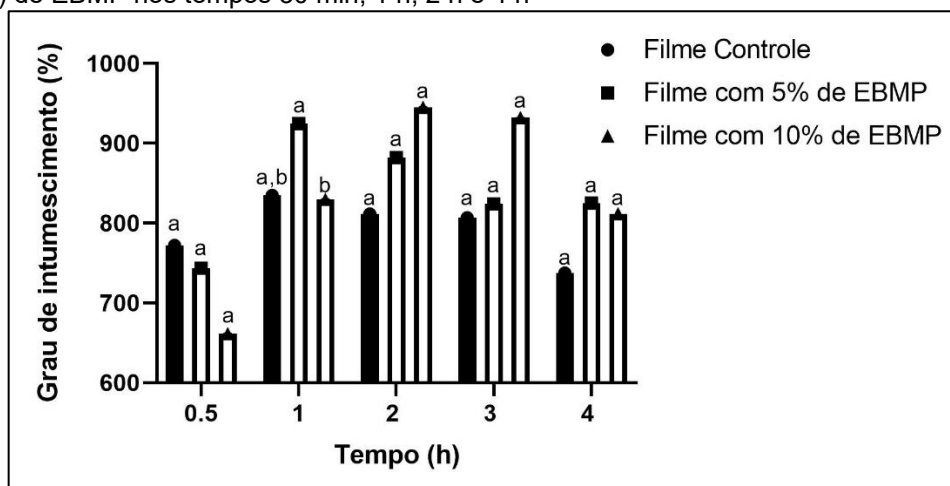
Para aplicação cosmética como máscara facial é desejável que o filme seja permeável ao vapor d'água (não oclusivo) e, portanto, o filme com 5% de extrato apresentou maior valor de permeabilidade ao vapor d'água do que quando comparado ao filme com 10%, sendo um filme menos oclusivo e mais adequado para uso na pele.

3.3.2.7 Determinação do grau de intumescimento dos filmes

Pela análise dos gráficos presentes na Figura 35 foi possível perceber que os filmes apresentaram valores de intumescimento de 600 a 950%, valores considerados extremamente altos, quando foram expostos ao meio tampão pH 5,5.

Apesar da alta solubilidade dos filmes de amido, como foi demonstrado no teste de perda de peso em água, estes quando mantidos em repouso por períodos curtos, como o período de 4h, em que foi realizada a determinação do grau de intumescimento, não são solubilizados em água e são intumescidos. A presença do polímero PVA permite com que os filmes apresentem maior resistência a água do que se fosse usado o amido isoladamente.

FIGURA 35 – Representação gráfica do grau de intumescimento dos filmes Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP nos tempos 30 min, 1 h, 2 h e 4 h



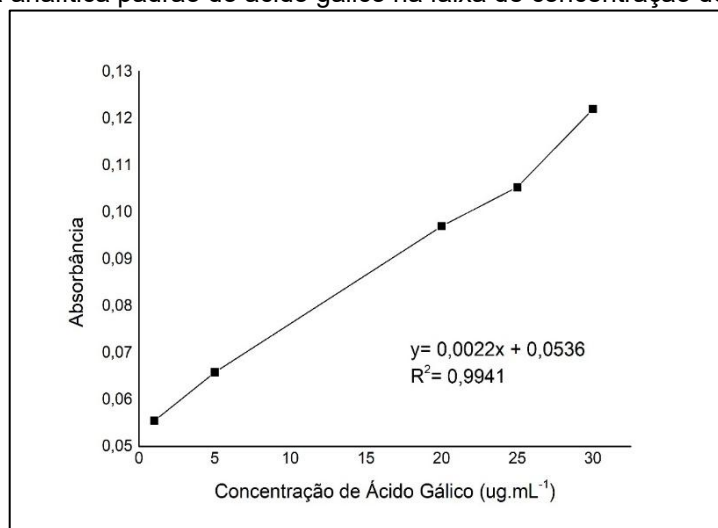
Fonte: A autora

Notas: Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes entre as colunas indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

O grau de intumescimento está relacionado com o volume total livre ocupado pela água nos filmes. Quanto maior for o valor do grau de intumescimento, isto significa que há mais interações entre as hidroxilas das moléculas de água e as hidroxilas da mistura de amido e PVA. No tempo de 1 h foi possível observar que houve diferença no grau de intumescimento entre as amostras. Nesse tempo o filme com 10% de extrato mostrou redução da retenção de umidade quando comparado ao filme com 5% de extrato. Isso pode ter ocorrido devido às ligações de hidrogênio entre as hidroxilas dos polímeros com as hidroxilas dos compostos fenólicos do extrato, deixando menos OH livres para reagir com a água e dessa forma intumescendo menos. A possível presença de extrato na superfície do filme pode ter aumentado a hidrofobicidade, reduzindo o grau de intumescimento para o filme com 10% de extrato (Abedi-Firoozjah *et al.*, 2023).

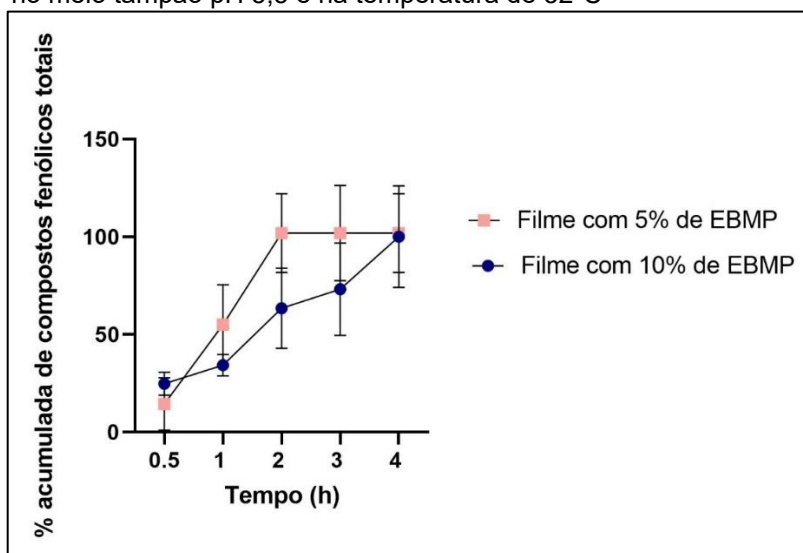
3.3.3 Avaliação da Dissolução *In Vitro* dos Compostos Fenólicos Totais presentes no Extrato de Bagaço de Malte liberado dos Filmes Poliméricos

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais liberados do extrato incorporado nos filmes com 5% e 10% de extrato, primeiramente foi a curva analítica do ácido gálico na faixa de concentração de 1 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 36).

FIGURA 36 – Curva analítica padrão do ácido gálico na faixa de concentração de 1 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 

Fonte: A autora

Através da Figura 37, foi possível observar o perfil de liberação de 100% dos compostos fenólicos presentes nos filmes com 5% de extrato de bagaço de malte em 2h de teste. Já para os filmes com 10% de extrato, a porcentagem total de compostos fenólicos liberados ocorreu no tempo total avaliado, que foi de 4h.

FIGURA 37 – Perfil de liberação dos compostos fenólicos totais dos filmes com 5% e com 10% (% m.m^{-1}) de EBMP no meio tampão pH 5,5 e na temperatura de 32°C

Fonte: A autora

O resultado obtido foi satisfatório, considerando que o meio tampão pH 5,5 com temperatura de 32 °C é um meio que simula as condições de uma pele humana jovem e saudável. Além disso, considerando a aplicação dos filmes em máscaras cosméticas, é interessante que os filmes fiquem em contato com o rosto dos usuários por curtos períodos, de no máximo 4h. Porém, futuros estudos de permeação cutânea

do extrato presente nos filmes em orelha de porco são necessários para avaliar se o perfil de liberação é semelhante ao que foi obtido através do teste *in vitro* feito nesse estudo.

3.4 CONCLUSÃO

Para o desenvolvimento de um produto cosmético, muitas etapas são necessárias até a comercialização. No presente estudo, foi feito o desenvolvimento e o início das caracterizações *in vitro* dos filmes para aplicação em máscaras faciais.

Dessa forma, o filme de amido/PVA, especialmente com 5% de EBMP, representa uma alternativa biodegradável e sustentável para aplicação cosmética, uma vez que nessa concentração de extrato, a integridade física do filme foi mantida, além de apresentar propriedades mecânicas, ópticas, térmicas, de barreira e químicas adequadas para o uso cosmético. Além disso, os compostos fenólicos, responsáveis pelas ações antioxidante e prebiótica, foram completamente liberados em até 4h em meio tampão pH 5,5 e temperatura de 32 °C (condições que simulam a pele).

CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DE MANDIOCA CONTENDO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN

RESUMO: As nanopartículas de amido são sistemas de liberação biodegradáveis e biocompatíveis, que favorecem a penetração de ativos cosméticos até camadas mais profundas da pele devido aos seus tamanhos reduzidos, além de protegerem os compostos fenólicos de serem degradados pela luz e/ou oxigênio. Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver nanopartículas de amido Controle (sem extrato) e com 5% e 10% (% , m.m⁻¹) de extrato de bagaço de malte, por meio dos métodos de nanoprecipitação, utilizando um antissolvente (etanol), associada a homogeneização com alta velocidade com o uso de ultraturrax. O diâmetro médio das nanopartículas variou de 180 a 200 nm, o índice de polidispersão ficou abaixo de 0,5 (0,26-0,36), indicando que as partículas estão distribuídas de modo uniforme e houve redução do potencial zeta na nanopartícula com 10% (% , m.m⁻¹) de extrato (-12,00 ± 1,10 mV) quando comparada a nanopartícula Controle (-21,80 ± 3,40 mV), o que indica que o aumento do extrato pode reduzir a estabilidade das nanopartículas desenvolvidas. Pela análise microscópica foi possível observar que as nanopartículas formadas apresentam formato esférico e pela análise de difração de raios X, a estrutura semicristalina dos grânulos de amido nativo foi modificada, passando a ser uma estrutura amorfa quando em forma de nanopartícula. A eficiência de encapsulação mostrou que em concentrações de 5% (% , m.m⁻¹) de extrato foi possível encapsular quase a totalidade de extrato (90,34%), porém com o aumento para 10% (% , m.m⁻¹), a eficiência cai drasticamente para apenas 6,67%. Devido a isso, as nanopartículas de amido são alternativas cosméticas sustentáveis para a encapsulação e proteção dos compostos fenólicos presentes no extrato de bagaço de malte, na concentração de 5% (% , m.m⁻¹).

Palavras-chave: Nanoprecipitação. Amido de mandioca. Nanopartículas esféricas. Encapsulação de extrato. Partículas uniformes.

4.1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas são sistemas de liberação de ativos, que apresentam tamanhos na faixa de 1 a 1000 nm. O tamanho nanométrico melhora algumas propriedades físico-químicas quando comparado ao material a granel, como a redução da dispersão da luz, aumento da solubilidade e a penetração através de membranas biológicas (Ruan *et al.*, 2022). Um exemplo de nanomaterial que é biocompatível, biodegradável, sustentável e que apresenta baixa toxicidade, para aplicações cosméticas, é o amido (Hassan *et al.*, 2022).

Os nanomateriais de amido podem apresentar diferentes formas e morfologias, como nanocristais, nanofibras, nanomicelas, nanopartículas e nanovesículas, dependendo do método de obtenção utilizado. Um dos métodos mais antigos e mais utilizados é o da nanoprecipitação com antissolvente ou não-solvente, pois além de ser simples, de baixo custo e reprodutível, pode-se utilizar reagentes de baixa toxicidade, como etanol e água. Este método exige a etapa de pré-gelatinização do amido em água e após a formação dos grânulos de amido, estes são precipitados na presença de etanol puro ou etanol acidificado (antissolvente) e formam nanopartículas de amido com tamanhos inferiores a 1000 nm, ocorrendo as etapas de supersaturação, nucleação e agregação (Jaízia dos Santos Alves; Rodrigues Monteiro; Ayala Valencia, 2022; Jiang *et al.*, 2023).

Para obter nanopartículas com tamanhos menores a 500 nm pelo método de nanoprecipitação, é preciso usar uma solução de amido altamente diluída e volume maior de antissolvente, uma vez que a alta concentração de amido está diretamente relacionada a viscosidade da formulação. A alta viscosidade da solução de amido dificulta a difusão da solução de amido em direção ao antissolvente, levando a formação de partículas com tamanhos maiores. Além disso, a diluição da solução de amido e volume maior de antissolvente diminuirá a eficiência da encapsulação e aumentará o custo (Chang *et al.*, 2017). Devido a isso, é interessante a associação do processo de nanoprecipitação com outros métodos, como a homogeneização em alta velocidade, com a finalidade de aumentar o rendimento e reduzir o tamanho de partículas.

As nanopartículas de amido podem ser usadas como carreadores de ativos naturais, assim como os filmes no capítulo anterior. Alguns trabalhos já demonstraram que as nanopartículas de amido auxiliam na estabilização de compostos fenólicos, que são altamente fotoinstáveis, e consequentemente na manutenção das suas atividades biológicas (Jaízia dos Santos Alves; Rodrigues Monteiro; Ayala Valencia, 2022). Além disso, foi demonstrado que a atividade antioxidante *in vivo* dos polifenóis é inferior a capacidade de eliminarem as espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células devido às suas baixas biodisponibilidades, sendo necessária a encapsulação desses bioativos (García-Gurrola *et al.*, 2021). Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de sintetizar nanopartículas de amido, contendo 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP por nanoprecipitação associada a homogeneização em alta velocidade, bem como caracterizá-las através de métodos que avaliam o tamanho, a morfologia, a

carga superficial e a estabilidade das nanopartículas, bem como a eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos do EBMP.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

Para a obtenção das nanopartículas, foi utilizado amido de mandioca (lote AGG071), fornecido pela Agrícola Horizonte Ltda (Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil), hidróxido de sódio P.A (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) para hidrólise alcalina e álcool etílico absoluto (Reatec – Colombo, Paraná, Brasil), que foi utilizado como não-solvente no processo de nanoprecipitação. Como crioprotetor na liofilização, foi usada a lactose monohidratada P.A (Biotec Produtos Químicos, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

Na espectroscopia na região do infravermelho, foi usado o brometo de potássio (KBr) grau espectroscópico (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Darmestádio, Alemanha) para a formação de pastilhas. A água purificada, usada na formulação das nanopartículas, foi obtida a partir de ultrapurificador de água Mili-Q® (MERCK, modelo Integral 5, Darmstadt, Alemanha).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Desenvolvimento de nanopartículas de amido com e sem extrato de bagaço de malte

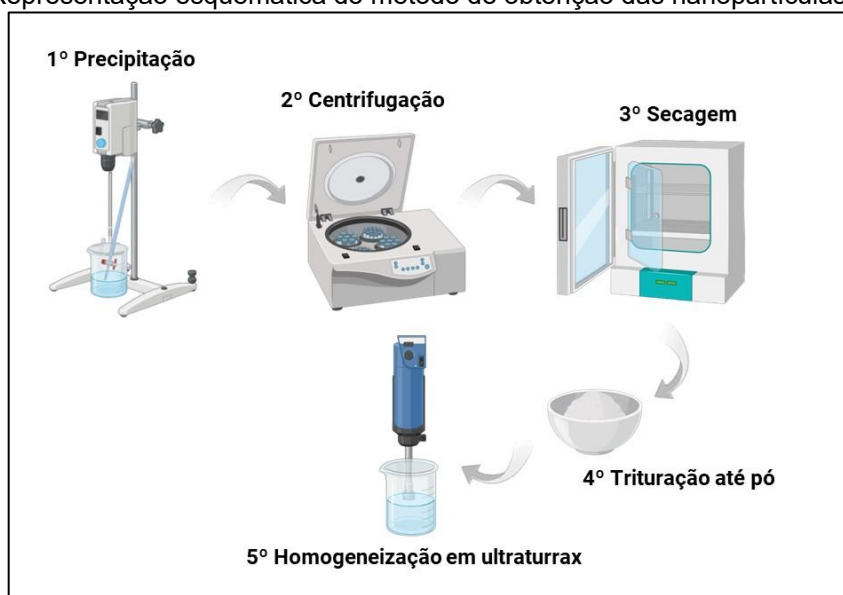
O método utilizado para a obtenção das nanopartículas foi a nanoprecipitação, seguida da homogeneização em ultraturrax, representado na Figura 38, conforme descrito por Ruan *et al.* (2022), com algumas modificações. Primeiramente, foi preparada a solução aquosa de hidróxido de sódio 1% (% m.v⁻¹) e em seguida foi adicionado a essa solução 5g de amido de mandioca (5% m.v⁻¹), considerando um volume total de 100 mL de água purificada, para a etapa de hidrólise alcalina, permitindo a quebra das cadeias de amido. Em seguida, foi feita a agitação da suspensão de amido preparada em agitador mecânico (QUIMIS, modelo Q235,

Diadema, São Paulo, Brasil), com velocidade de rotação de 1700 rpm por 5 minutos, até a formação de um gel. O gel de amido foi então transferido para uma bureta com volume de 100 mL e foi feito o gotejamento lento e contínuo (1 gota/segundo) em 100 mL da solução de etanol absoluto, contendo 5% e 10% (% m.m^{-1}) do extrato de bagaço de malte líquido, em relação ao amido (etapa de precipitação com não-solvente), adicionada em becker de 250 mL, sob agitação de 1700 rpm, a temperatura ambiente. Após o término do gotejamento, a suspensão de amido formada em etanol foi transferida para tubos Falcon de 50 mL para centrifugação a 2000xg por 10 minutos a temperatura ambiente.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com etanol absoluto. Após a lavagem, o precipitado foi seco em estufa a temperatura de 50 °C por 6 horas. Em seguida, o precipitado foi triturado em liquidificador até formação de pó. As micropartículas sólidas foram armazenadas em recipientes de vidro, no interior de dessecador com UR=0, devido a higroscopicidade do amido. Para a redução do tamanho de partículas e a obtenção destas na escala nanométrica, foi pesado 0,8g das micropartículas sólidas (0,8%, % m.v^{-1}) em um becker contendo 100 mL de água purificada. Esta preparação foi homogeneizada com o uso de ultraturrax a 14000 rpm por 8 minutos.

Além das nanopartículas com o extrato, também foram desenvolvidas nanopartículas de amido Controle, em que não houve adição de extrato, para fins comparativos, e todas as formulações foram feitas em triplicata.

FIGURA 38 - Representação esquemática do método de obtenção das nanopartículas de amido



Fonte: A autora

4.2.2.2 Caracterização das nanopartículas de amido com e sem extrato de bagaço de malte

Para algumas análises de caracterização, como análise termogravimétrica, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura (foi realizada com e sem liofilização) e difração de raios X, foi necessária a etapa prévia de liofilização das formulações de nanopartículas. Para isso, as nanossuspensões foram preparadas e lactose 1% (% $m.v^{-1}$) foi adicionado como crioprotetor para a preservação da morfologia e estrutura das nanopartículas, mantendo sob agitação magnética até a completa homogeneização da lactose no meio aquoso. Em seguida, as suspensões foram congeladas em ultrafreezer (NUAIRE, modelo Nu9668GC, Plymouth, Minnesota, Estados Unidos) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e liofilizadas em liofilizador (TERRONI, LD 1500, São Carlos, São Paulo, Brasil) por 48 horas, até total remoção da água.

4.2.2.2.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta foram avaliados pela espectroscopia da correlação de fótons por meio do espalhamento dinâmico da luz (DLS), em triplicata, no analisador de partículas (ZETASIZER NANO ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido) à temperatura de leitura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com *software* Zetasizer versão 8.02. Foi feita a diluição das amostras em água purificada (1:100). Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e foi feita a análise estatística ANOVA 1 via para avaliar a diferença significativa entre as amostras.

4.2.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

As eletromicrografias para avaliação da morfologia e superfície das nanopartículas foram obtidas por meio da exposição das amostras ao microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). Primeiramente, 10 μL das suspensões de nanopartículas 0,8% (% $m.v^{-1}$) foram adicionadas diretamente em *stub*, espalhando a gota formada até a formação de um filme fino na superfície do suporte, e a posterior secagem a $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

por 5 minutos. Porém, o processo de secagem ocasionou a aglomeração das nanopartículas, e por isso optou-se em obter também as fotomicrografias das nanopartículas liofilizadas e trituradas com auxílio de gral e pistilo, para comparação. As amostras foram submetidas à metalização com ouro em um metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias foi empregada voltagem de aceleração de 8 a 10 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

4.2.2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) das nanopartículas

As nanopartículas foram avaliadas em espectrofotômetro na região do infravermelho (SHIMADZU, IR-Prestige 21, Quito, Japão), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), sendo 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m.m⁻¹). As análises foram realizadas na faixa de 4000-400 cm⁻¹, com parâmetro de 32 scan.min⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹. Foram obtidos espectros das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de extrato de bagaço de malte, bem como do amido (polímero) e da lactose (crioprotetor).

4.2.2.2.4 Análise térmica das nanopartículas

Para realizar a análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das nanopartículas, foi utilizado o analisador térmico (PERKIN ELMER, STA 600, Waltham, MA, Estados Unidos), o qual foi calibrado previamente usando índio (In; P.F.= 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) como padrão. Os termogramas e curvas de DSC foram obtidos sob fluxo contínuo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C.min⁻¹ e a faixa de temperatura utilizada foi de 20 °C a 500 °C.

4.2.2.2.5 Difração de raios X (DRX) das nanopartículas

As nanopartículas foram avaliadas em difratômetro de raios X (RIGAKU, Ultima IV, Tóquio, Japão), com *scan* de 50°.minuto⁻¹ e 2 θ de 5° a 80°, radiação K α de

cobre (λ -1,5218 Å), corrente de 40 mA e voltagem de 40 kV, para a observação de picos indicativos de cristalinidade.

4.2.2.2.6 Eficiência de encapsulação das nanopartículas

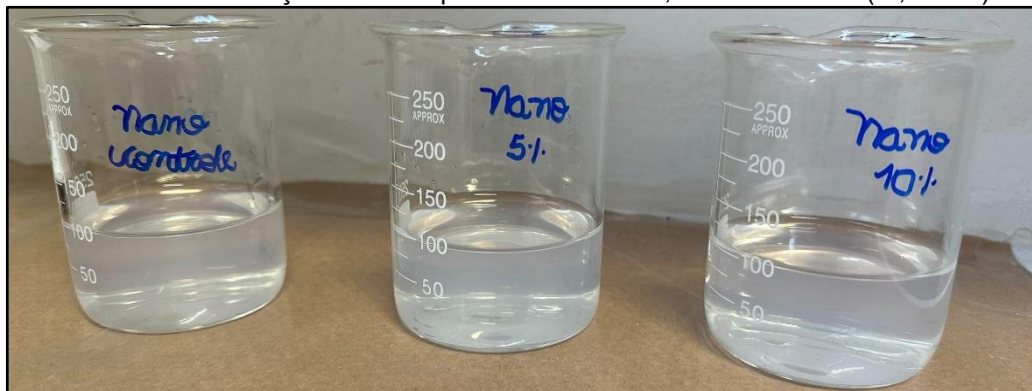
A eficiência de encapsulação (EE) (%) das formulações de nanopartículas contendo 5% e 10% (% m.m⁻¹) de extrato de bagaço de malte foi avaliada, em quadruplicata, pelo método indireto, ou seja, quantificou-se a quantidade de extrato não encapsulado. Para isso, 500 µL da suspensão de nanopartículas foi adicionada em dispositivo de ultrafiltração (Amicon® Ultra 10.000 MW Millipore, Bedford, MA, EUA) e centrifugada por 30 minutos, com velocidade de 3880xg a 4°C. O filtrado foi analisado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, para quantificação dos compostos fenólicos totais livres, conforme o método descrito por García-Gurrola *et al.* (2021). A Equação 9 foi usada para o cálculo da eficiência de encapsulação.

$$EE (\%) = \frac{(\text{Concentração teórica} - \text{Concentração obtida})}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Desenvolvimento de Nanopartículas de Amido com e sem Extrato de Bagaço de Malte

Na Figura 39 foi possível observar que as três formulações de nanopartículas desenvolvidas (Controle, com 5% e 10% de extrato de bagaço de malte) eram levemente esbranquiçadas e turvas. Foi observado que as nanopartículas de amido se apresentaram muito instáveis quando o etanol foi adicionado na suspensão de amido, levando a formação de aglomerados ou precipitados visíveis. Já o inverso, quando a suspensão é adicionada gota a gota na solução de etanol, as nanopartículas ficaram mais estáveis (Sadeghi *et al.*, 2017).

FIGURA 39 - Foto das formulações de nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP

Fonte: A autora

A presença de hidróxido de sódio quebra as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares do amido. Apenas o tratamento térmico (100 °C por 3 horas) não é suficiente para solubilizar completamente o amido, sendo necessária a combinação desse polímero com o hidróxido de sódio (Chin; Pang; Tay, 2011).

4.3.2 Caracterização das Nanopartículas de Amido com e sem Extrato de Bagaço de Malte

4.3.2.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Os valores de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas estão expostos na Tabela 17. Houve redução do tamanho de partículas com 5% de extrato quando comparado a nanopartícula Controle. A presença do extrato de bagaço de malte nas nanopartículas não interferiu no diâmetro médio, pois tanto as nanopartículas sem o extrato (Controle), quanto as com 5% e 10% de extrato apresentaram tamanhos próximos, na faixa de 180-200 nm.

TABELA 17 - Valores obtidos de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta para as nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP

Amostras	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NP Controle	200,30 ± 11,60 ^a	0,36 ± 0,05 ^a	-21,80 ± 3,40 ^a
NP com 5% de EBMP	181,00 ± 5,50 ^b	0,34 ± 0,04 ^{a,b}	-16,90 ± 2,30 ^{a,b}
NP com 10% de EBMP	181,40 ± 2,80 ^{a,b}	0,26 ± 0,01 ^b	-12,00 ± 1,10 ^b

Fonte: A autora

Notas: NP – nanopartícula. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey, p≤0,05).

As nanopartículas de amido preparadas pelo método de nanoprecipitação podem apresentar tamanhos e outras propriedades diferentes devido às diferenças de origens botânicas dos amidos e também das condições de processamento (Jiang *et al.*, 2022). O índice de polidispersão foi utilizado para avaliar a distribuição do tamanho das nanopartículas de amido através do espalhamento dinâmico de luz laser ou *Dynamic Light Scattering (DLS)*. O valor é adimensional e varia de 0,1 a 0,5 para suspensões de boa qualidade e próximo a 1 para preparações de baixa qualidade, em que há maior heterogeneidade nos tamanhos das nanopartículas, geralmente com a presença de partículas grandes ou aglomerados (Wang *et al.*, 2018).

A suspensão de nanopartículas sem a homogeneização em alta velocidade apresentou heterogeneidade na distribuição do tamanho das partículas (índice de polidispersão próximo a 1). À medida que o tempo de homogeneização aumentou, a distribuição de tamanho foi considerada mais homogênea e o tamanho médio das partículas diminuiu após 8 minutos. Além disso, o valor de índice de polidispersão foi inferior a 0,4 (Ruan *et al.*, 2022).

O potencial zeta é considerado uma medida que determina a carga superficial das nanopartículas. Através da passagem do laser pela amostra, há a presença de um campo elétrico variável. Os grupos hidroxila do amido tendem a ionizar na presença de água, levando a carga negativa (Hassan *et al.*, 2022).

Por representar a carga superficial das nanopartículas, o potencial zeta está relacionado com a estabilidade da preparação. As partículas podem ser consideradas estáveis quando o valor absoluto do potencial zeta é próximo de $|30|$ mV, enquanto em potencial zeta próximo a 0 e $|5|$ mV, ocorre a diminuição da repulsão eletrostática entre as partículas e conseqüentemente maior chance de agregação ou floculação (Neves, *et al.*, 2013).

O índice de polidispersão foi mais próximo ao valor de 0 e mais distante a 1 para NP com 10% de extrato, o que implica em uma distribuição mais homogênea de tamanho para as nanopartículas com 10% de extrato comparadas às nanopartículas Controle. Já em relação ao potencial zeta, a nanopartícula com 10% de extrato apresentou um valor de $-12 \pm 1,10$ mV quando comparada ao valor de $-21,80 \pm 3,40$ mV das nanopartículas Controle, indicando que com o aumento da concentração de extrato de 5% para 10%, as partículas se aglomeraram mais facilmente, levando a uma menor estabilidade da formulação.

Wang *et al.* (2018) obteve nanopartículas de amido contendo extrato de *Ginkgo biloba* pela técnica do não-solvente, também utilizando o etanol. Foram obtidas nanopartículas esféricas ou elípticas, com aglomerações, com tamanho na faixa de 100-200 nm, índice de polidispersão de 0,428-0,478 e o potencial zeta variou de -2,47 até -15,4 mV.

Ge *et al.* (2017) utilizou 5% de amido de mandioca e um volume de 100 mL de etanol para a obtenção das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. O diâmetro médio variou de 184 a 228 nm, o índice de polidispersão de 0,318-0,408 e o potencial zeta variou de -14,5 a -17,4 mV.

De Oliveira *et al.* (2018) obteve nanopartículas de amido de mandioca, agora pelo método de hidrólise ácida, com o uso ácido sulfúrico. O diâmetro médio variou de 47 a 178 nm. Além de ser um método com mais etapas (demanda mais tempo, energia e custo), o rendimento obtido foi de apenas 30%.

Sadeghi *et al.* (2017) desenvolveu nanopartículas de amido de milho pelos métodos de nanoprecipitação associado a hidrólise alcalina, com uso de hidróxido de sódio e ureia. Os não-solventes testados foram etanol, metanol e acetona. As nanopartículas com distribuição mais uniforme, com tamanho de partícula de 98 nm, foram obtidas utilizando o etanol como não solvente.

Jiang *et al.* (2023) obteve nanopartículas de amido de quinoa pelo método de nanoprecipitação, utilizando a proporção 1:1 com etanol e amido gelatinizado. O diâmetro médio obtido foi de $191,20 \pm 2,90$ nm.

Minakawa; Faria-Tischer (2019) desenvolveram as nanopartículas utilizando 10% de amido e ultrassonicação por 30 minutos. Após esse tempo, deixaram a suspensão em repouso por 1 hora para precipitação das partículas com tamanhos maiores (micrométricas). As partículas suspensas foram denominadas de nanopartículas. Tanto as micropartículas, quanto as nanopartículas foram transferidas em placas de petri e secas a 35 °C por 48 horas. Para microscopia, as nanopartículas foram mantidas líquidas e refrigeradas a 10 °C para evitar aglomeração. O rendimento foi de $12 \pm 1\%$ para as nanopartículas e $88 \pm 5\%$ para micropartículas. Os grânulos de amido de mandioca foram circulares e truncados, com diâmetro variável de 7-14 μm . As nanopartículas variaram de 35-65 nm.

Conforme explorado acima, diferentes fontes botânicas de amido e diferentes métodos de obtenção são responsáveis pelas diferenças entre as características físico-químicas das nanopartículas obtidas. Em comparação à literatura citada, as

nanopartículas obtidas no presente trabalho mostraram-se promissoras tanto como sistemas de liberação de compostos fenólicos em extratos, assim como estabilizantes em emulsões *pickering*, cuja aplicação será mais bem explorada no próximo capítulo.

A redução do tamanho das partículas de amido permite a formação de emulsões *pickering* com tamanho menor de gotas e consequentemente leva a uma maior estabilidade da emulsão, uma vez que as partículas menores têm maior energia de desorção na interface das fases óleo-água (Ruan *et al.*, 2022).

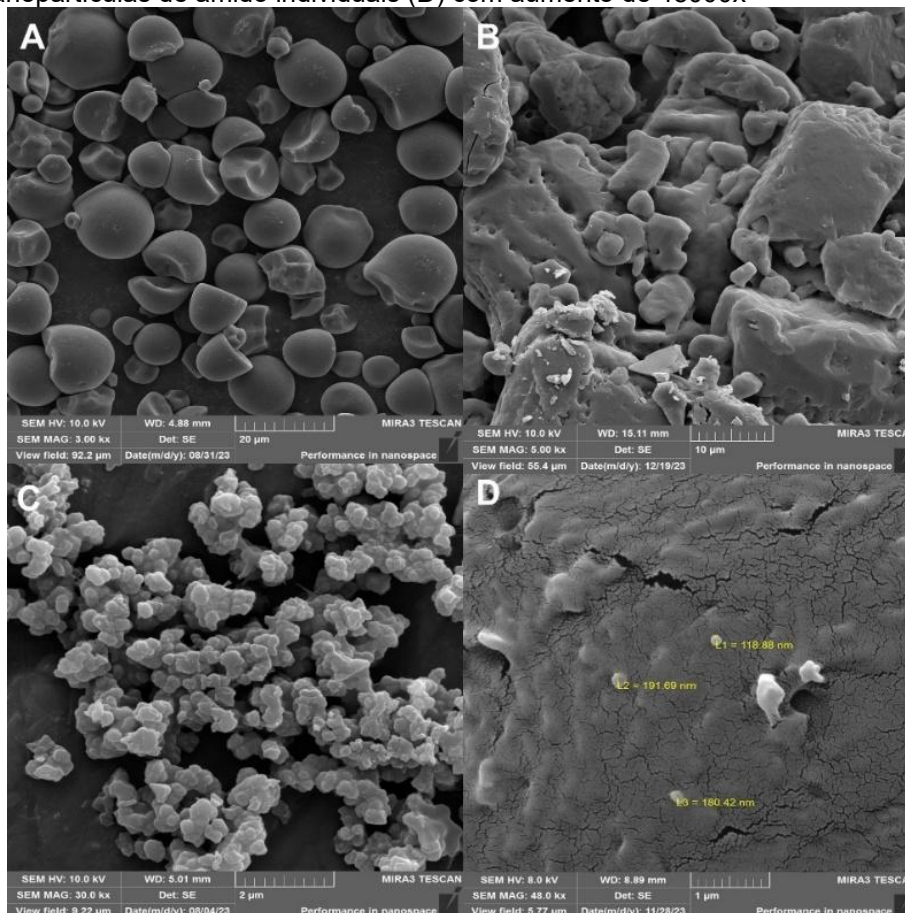
4.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

Na análise microscópica foi possível observar a diferença de tamanho entre os grânulos de amido nativo quando comparados às nanopartículas obtidas (Figura 40). As nanopartículas de amido obtidas apresentaram formato esférico. As nanopartículas foram liofilizadas, representadas na Figura 40 D, foram obtidas isoladamente, sendo medidos os seus tamanhos, que variaram de 118-191 nm. Através da medição das nanopartículas individualmente por MEV, foi possível confirmar o diâmetro médio que já havia sido medido por *DLS*, o qual variou entre 181-200 nm, considerando os três tipos de nanopartículas analisadas: Controle, com 5% e 10% de extrato.

Além do processo de secagem, a formação de aglomerados também pode ter sido ocasionada durante os processos de centrifugação e da lavagem do precipitado formado. Wang *et al.* (2018) também obteve nanopartículas esféricas ou elípticas, com aglomerações.

Pode-se perceber pelas eletromicrografias que para a formação das nanopartículas, houve redução no tamanho e mudança na morfologia dos grânulos de amido de mandioca (Figura 40 A), que apresentaram faixa de tamanho entre 10-20 μm , com formatos ovais ou redondos e uma extremidade truncada. Já o crioprotetor lactose, representado na Figura 40 B, foi capaz de preservar a morfologia e estrutura das nanopartículas, demonstradas na Figura 40 D.

FIGURA 40 - Fotomicrografias das partículas de amido de mandioca (A) com aumento de 3000x, lactose (B) com aumento de 5000x, nanopartículas de amido aglomeradas (C) com o aumento de 30000x e nanopartículas de amido individuais (D) com aumento de 48000x

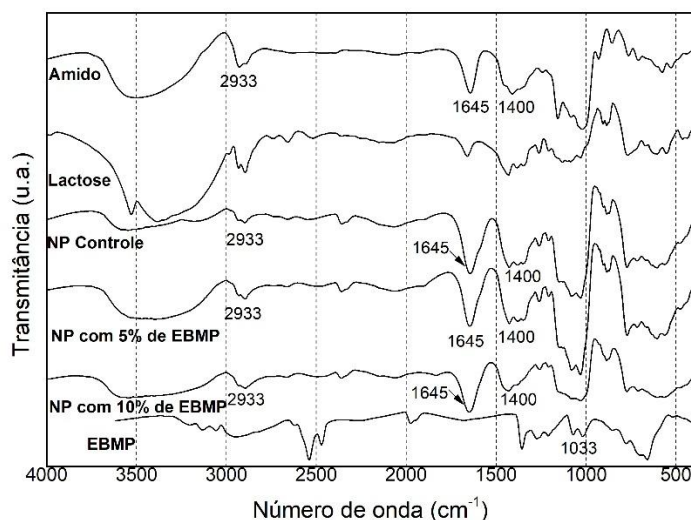


Fonte: A autora

4.3.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho (*FTIR*) das nanopartículas

Através da análise dos espectros de *FTIR*, representados na Figura 41 foi possível perceber que o extrato não interferiu quimicamente na estrutura das nanopartículas, uma vez que o espectro da nanopartícula Controle está bem semelhante aos espectros das nanopartículas contendo 5% e 10% de extrato de bagaço de malte. É importante essa semelhança, uma vez que provavelmente o extrato está encapsulado no interior da nanopartícula e não há interação do extrato com a matriz polimérica, garantindo dessa forma a integridade do ativo antioxidante na formulação. Outra hipótese é que nessas concentrações de extrato testadas, pode ter mantido os espectros das nanopartículas semelhantes ao polímero e ao crioprotetor, porém em concentrações superiores a 10%, as bandas poderiam ser alteradas nos espectros.

FIGURA 41 - Espectros de *FTIR* do polímero amido, crioprotetor lactose, de EBMP e das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m-1) de EBMP



Fonte: A autora

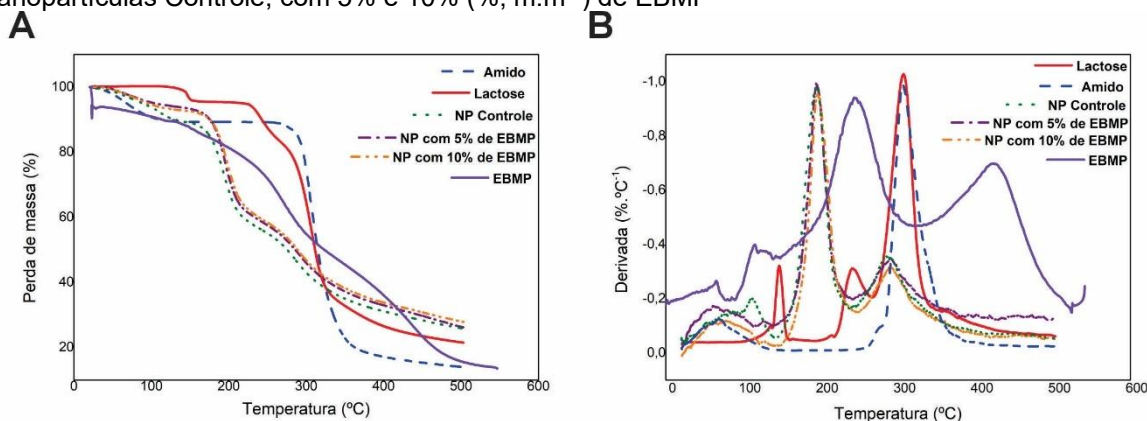
A banda de absorção na região 3700-3000 cm^{-1} refere-se à vibração de estiramento das hidroxilas presentes na estrutura do amido. Além disso, a banda observada em 1645 cm^{-1} está relacionada a vibração de estiramento e flexão da ligação de hidrogênio de grupos hidroxila da água absorvida nas regiões amorfas, tanto do amido, lactose e nas nanopartículas. A banda em 1400 cm^{-1} corresponde a vibração de alongamento em radicais alquil (C-H) (Wang *et al.*, 2018). As bandas situadas na faixa de 3000-2700 cm^{-1} , presentes no amido, lactose e nas nanopartículas, está relacionada à vibração de estiramento assimétrico de C-H (Czaja *et al.*, 2023; de Oliveira *et al.*, 2018).

4.3.2.4 Análise térmica das nanopartículas

A maior perda de massa do amido ocorreu na faixa de 275-350 $^{\circ}\text{C}$, que se refere à sua degradação, visualizada na Figura 42, confirmado pelo pico endotérmico formado em 300 $^{\circ}\text{C}$ na análise de *DSC*, presente na Figura 43. A temperatura de degradação do amido de mandioca pode variar de 259-406 $^{\circ}\text{C}$. A estabilidade térmica das nanopartículas diminuiu quando comparada ao polímero puro (amido), as quais tiveram a 1ª etapa de perda de massa em 105 $^{\circ}\text{C}$ referente a evaporação da água absorvida nas amostras e a 2ª etapa na faixa de temperatura de 220-320 $^{\circ}\text{C}$ relacionada a completa degradação das nanopartículas. Essa diferença

provavelmente ocorreu devido a redução do tamanho das partículas e desestruturação da porção cristalina do amido (quebra das ligações de amilose e amilopectina), ocasionada principalmente pela agitação, o que pode diminuir a estabilidade térmica e consequentemente necessitar de menos energia para completar a degradação das nanopartículas de amido (Jiang *et al.*, 2023).

FIGURA 42 - Curvas de TGA (A) e dTG (B) do polímero amido, crioprotetor lactose, de EBMP e das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



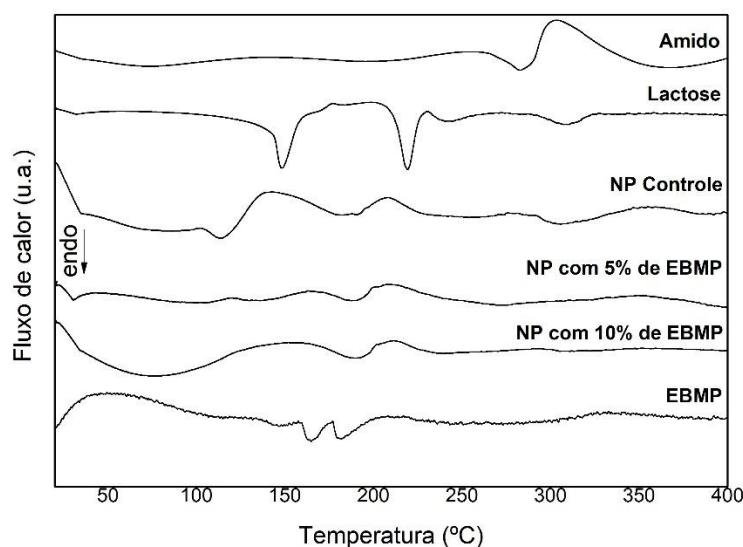
Fonte: A autora

A maior resistência térmica do amido nativo quando comparado às nanopartículas deve-se pela estrutura semicristalina compacta e alto grau de polimerização do amido nativo e isso faz com que essa estrutura seja mais ordenada, precisando de mais energia para degradá-lo (Hedayati; Niakousari; Mohsenpour, 2020)

No estudo de Costa *et al.* (2017), a estabilidade térmica das nanopartículas também diminuiu quando comparada ao polímero puro (amido), as quais tiveram a 1ª etapa de perda de massa em 59 °C referente a evaporação da água absorvida nas amostras e a 2ª etapa na faixa de temperatura de 267 °C relacionada a completa degradação das nanopartículas.

Tanto pela análise de TGA/dTG, quanto na análise de DSC, é possível perceber um perfil térmico muito semelhante entre a nanopartícula Controle e as nanopartículas com extrato, demonstrando dessa forma que o extrato não interferiu nas características térmicas das formulações desenvolvidas.

FIGURA 43 - Curvas de DSC do polímero amido, crioprotetor lactose, de EBMP e das nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



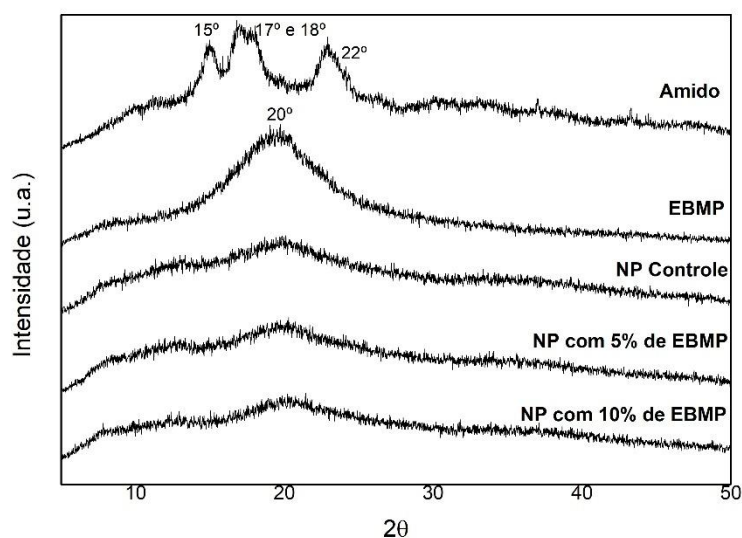
Fonte: A autora

4.3.2.5 Difração de raios X (DRX) das nanopartículas

Os grânulos de amido podem apresentar três tipos de estruturas cristalinas, visualizadas na difração de raios X, que são denominadas de A, B e C. Na estrutura cristalina tipo A, o empacotamento das duplas hélices é mais compacto que no tipo B e o tipo C é uma mistura dos tipos A e B. Por apresentar uma densidade, o tipo B pode se romper mais facilmente que o A (Minakawa; Faria-Tischer, 2019).

Como demonstrado na Figura 44, o amido apresentou picos de difração em 15°, 17° e 18° e 22°, que se refere ao polimorfismo do tipo A (Wang *et al.*, 2018). A diferença botânica entre os diferentes tipos de amido pode fazer com que haja diferença no tipo de cristalinidade observada na análise de DRX. O amido de milho, por exemplo, por ser um cereal, diferente da mandioca, que é um tubérculo, faz com que os seus difratogramas sejam diferentes. O amido de mandioca possui um perfil característico de tuberosas, com picos correspondentes a dois singletos em 15 e 17°, um dubleto em 22 e 24° e ainda, em alguns casos, pode apresentar outro dubleto em 5° e 6° (Beninca, 2008). O EBMP apresenta um pico largo em 2θ = 20°, que pode estar relacionada a cristalinidade de alguns compostos fenólicos presentes na sua estrutura.

FIGURA 44 - Difrátogramas do polímero amido, EBMP e nanopartículas Controle, com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de EBMP



Fonte: A autora

A estrutura semicristalina observada no amido deve-se a presença de dupla hélice de agrupamentos nas cadeias laterais da amilopectina (Lu *et al.*, 2018). A aplicação de força mecânica (através da agitação) fez com que houvesse relaxamento dos aglomerados cristalinos, modificações estruturais dos cristais e quebra da estrutura dos grânulos de amido. Isso pode ser observado nos difratogramas das formulações de nanopartículas, mostrando a redução da proporção cristalina do amido e aumento da proporção amorfa, em que ocorreu a quebra das ligações de hidrogênio e a desestruturação dos arranjos cristalinos da dupla hélice. A hidrólise alcalina também reduz a cristalinidade da estrutura do amido (Chavan *et al.*, 2021).

Como não houve mudança no difratograma das nanopartículas com extrato comparadas às nanopartículas sem o extrato, pode-se concluir que o extrato não interferiu na cristalinidade das amostras.

4.3.2.6 Eficiência de encapsulação das nanopartículas

A Tabela 18 mostra que a eficiência de encapsulação para a nanopartícula com 5% de extrato (90,34%) foi superior à da nanopartícula com 10% de extrato (6,67%).

TABELA 18 – Concentração de compostos fenólicos do extrato incorporado nas nanopartículas de amido (mg EAG.g⁻¹ de extrato) e eficiência de encapsulação – EE (%)

Formulação	Concentração teórica de compostos fenólicos totais (mg EAG.g ⁻¹ de extrato)	EE (%)
NP com 5% de EBMP	0,70	90,34
NP com 10% de EBMP	1,40	6,67

Fonte: A autora

Notas: NP – nanopartícula

O valor obtido foi de 16% para as nanopartículas de amido com extrato de rúcula, com a concentração de polifenóis de 0,125 mg.mL⁻¹ para García-Gurrola *et al.* (2021). Já para Khan *et al.* (2014), as nanopartículas de quitosana com polifenóis de chá verde apresentou a eficiência de encapsulação de 10%, com concentração de polifenóis de 1,6 mg.mL⁻¹ e Maghsoudi *et al.* (2017), com as nanopartículas de amido com curcumina, a eficiência foi de 14%, com concentração de polifenóis de 1,06 mg.mL⁻¹. Portanto, à medida que aumenta a concentração de polifenóis, a eficiência de encapsulação diminui e isso justifica o motivo da diferença entre as eficiências obtidas para nanopartículas com 5% de extrato quando comparadas às com 10% de extrato. Devido a isso, é mais vantajoso o uso das nanopartículas com uma menor concentração de extrato (5%), pois além de usar uma menor quantidade, ainda apresentam quase a totalidade de extrato encapsulado do que quando comparadas às nanopartículas com a quantidade dobrada de extrato, e consequentemente também apresentam uma maior concentração de compostos fenólicos e maior potencial antioxidante.

4.4 CONCLUSÃO

Para a obtenção de partículas com tamanho nanométrico e monodispersas foi necessário associar dois processos, que corresponderam a nanoprecipitação com uso de não-solvente (etanol) e a homogeneização em alta velocidade em equipamento de ultraturrax. Tanto a estabilidade das nanopartículas (avaliada pelo potencial zeta), quanto a eficiência de encapsulação foram reduzidas com o aumento da concentração de extrato para 10%, indicando que a formulação mais adequada para aplicação

cosmética seria a nanopartícula com 5% de extrato. As propriedades térmicas (*TG/dTG* e *DSC*), espectroscópicas (*FTIR*) e de cristalinidade (*DRX*) não foram alteradas com a adição do extrato, indicando que provavelmente não há interação do extrato de bagaço de malte com os demais componentes da formulação, além de ser uma possível indicação de que o extrato está encapsulado, no interior nas nanopartículas e não na estrutura externa.

CAPÍTULO 5 – DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *IN VITRO* DE EMULSÃO *PICKERING* COMPOSTA POR NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE TIPO PILSEN

RESUMO: A emulsão *pickering* é uma mistura de duas fases imiscíveis (água e óleo) que é estabilizada por partículas sólidas adsorvidas na interface óleo-água. Este tipo de formulação torna-se interessante para aplicação cutânea como produto cosmético, uma vez que não há a presença de tensoativos, que são substâncias anfifílicas e que podem ocasionar irritações na pele. Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver emulsão *pickering* estabilizada com nanopartículas de amido e apresentando como ativo antioxidante e prebiótico o extrato de bagaço de malte (5% e 10%, m.m⁻¹). Para isso, onze formulações de emulsões *pickering* foram desenvolvidas conforme planejamento fatorial 2³, em que os fatores foram a concentração de nanopartículas (% m.v⁻¹), o tempo de agitação (minutos) e a proporção óleo/água. Os parâmetros avaliados incluíram o diâmetro médio (nm), índice de polidispersão e potencial zeta (mV). A concentração de nanopartículas variou 2%, 4% e 6% (% m.v⁻¹), o tempo de agitação em 1 minuto, 3 minutos e 5 minutos e a proporção de óleo/água em 0,5/99,5; 1/99 e 2/98. Desses fatores avaliados, apenas o maior tempo de agitação (5 minutos) reduziu significativamente o diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão. Dessa forma a formulação mais promissora foi a com menor concentração de nanopartículas (2% m.v⁻¹), menor proporção óleo/água (0,5/99,5) e maior tempo de agitação (5 minutos), que corresponde a EP3. Na microscopia eletrônica foi possível perceber nanopartículas de formato esférico e pelo teste de segurança *in vitro* HET-CAM, nenhum sinal vascular de irritação foi observado para as emulsões *pickering*. Foi possível concluir que as emulsões *pickering* desenvolvidas são uma opção de formulação cosmética natural, segura e biodegradável para veiculação do extrato de bagaço de malte.

Palavras-chave: Cosmético natural. Biodegradável. HET-CAM. Emulsão. Nanopartículas de amido.

5.1 INTRODUÇÃO

Diferente das emulsões convencionais, que são estabilizadas por tensoativos ou polímeros, as emulsões *pickering* são estabilizadas por partículas sólidas e estas últimas mostram-se estáveis que as convencionais frente aos fenômenos de agregação de gotículas, floculação e amadurecimento de Ostwald. As gotículas da emulsão são estabilizadas pela adsorção de partículas sólidas na interface óleo-água e a energia cinética da colisão entre as gotículas torna-se insuficiente para remover as partículas adsorvidas na interface (Chen *et al.*, 2023^a; Lu; Xiao; Huang, 2018).

O amido é um exemplo de partícula sólida que pode ser parcialmente umedecido pelas fases aquosa e oleosa sem ser completamente dissolvido em cada

fase. Os grânulos de amido nativo apresentam camadas semicristalinas em suas estruturas, com um arranjo alternado de lamelas amorfas e lamelas cristalinas, as quais não são hidrofóbicas e, portanto, geralmente não são adequadas para estabilização de emulsões O/A (Ye *et al.*, 2017). Quando estas partículas são reduzidas a tamanhos em nano e microescala, as emulsões *pickering* podem permanecer estáveis por meses (Ge *et al.*, 2017).

As emulsões *pickering* podem ser facilmente desestabilizadas quando submetidas a determinadas condições, como ao alto teor de sal, alta temperatura, velocidade de agitação, diferentes pHs e outros fatores ambientais. Além disso, a estabilidade a longo prazo de emulsões *pickering* depende da concentração de partículas sólidas e do volume de óleo adequados (Chen *et al.*, 2023^a). Devido a isso, é interessante avaliar o efeito de diferentes condições na estabilidade físico-química das emulsões *pickering*. O objetivo deste estudo foi desenvolver emulsões *pickering* através de um planejamento fatorial 2³ por meio da variação da concentração de nanopartículas de amido, proporção de fase oleosa e tempo de agitação, além de avaliar o tamanho e morfologia das nanopartículas na emulsão, selecionada no planejamento, por meio da microscopia eletrônica de varredura e analisar a segurança *in vitro* pelo teste da membrana corioalantóide ou *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

As formulações de emulsão *pickering* foram desenvolvidas com as nanopartículas de amido desenvolvidas anteriormente, sendo o amido de mandioca (lote AGG071) obtido pela Agrícola Horizonte Ltda (Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil). O óleo de gergelim natural extra virgem puro da marca Sésamo Real (Valinhos, São Paulo, Brasil), compõe a fase oleosa da emulsão. O ácido cítrico P.A Biotec Reagentes Analíticos, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) foi usado no ajuste do pH final da emulsão *pickering* desenvolvida. O cloreto de sódio P.A, que foi usado no preparo da solução de salina, e o dodecil sulfato de sódio ou *sodium dodecyl sulfate (SDS)* 1% usado como controle positivo no teste *HET-CAM*, foram adquiridos pela

Sigma-Aldrich (Darmstadt, Darmestádio, Alemanha). Os ovos férteis, de galinhas da raça White Leghorn, para o teste *HET-CAM*, foram fornecidos pela empresa Valo Biomedia do Brasil (Uberlândia, Minas Gerais, Brasil).

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Planejamento fatorial das formulações de emulsão *pickering*

Primeiramente, foi feito o planejamento fatorial 2^3 para a avaliação dos melhores parâmetros de obtenção de uma emulsão *pickering*, com os seguintes requisitos: menor tamanho de partículas e com distribuição mais homogênea entre as partículas, ou seja, menor índice de polidispersão, para garantir a estabilidade da formulação por mais tempo, uma vez que as emulsões *pickering* são estabilizadas por partículas sólidas e não por tensoativos. Conforme demonstrado na Tabela 19, os três fatores escolhidos no planejamento fatorial desse trabalho foram: (A) concentração de nanopartículas ou [NPS] (% m.v^{-1}), (B) tempo de agitação (min) e (C) proporção O/A. Esta representação mostra que, se em um planejamento fatorial escolhem-se 2 níveis diferentes para 3 fatores (2^3), o número total de formulações desenvolvidas deve ser oito. Porém, para uma melhor avaliação da reprodutibilidade da metodologia analítica em estudo, um ponto central analisado em triplicata foi incluído.

TABELA 19 - Planejamento fatorial 2^3 – número de experimentos e combinação dos níveis nos fatores

Experimentos	Fatores codificados		
	[NPS] (%)	Tempo de agitação (min)	[O/A]
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9.1	0	0	0
9.2	0	0	0
9.3	0	0	0

Fonte: A autora

Para estabelecer os valores para cada um dos fatores avaliados, alguns trabalhos foram usados como referência, como Chen *et al.* (2023), Chutia e Mahanta (2021), Ge *et al.* (2017), Jiang *et al.* (2023), Lu, Xiao e Huang (2018), López-Hernández *et al.* (2022), Ruan *et al.* (2022), Shao *et al.* (2018), Ye *et al.* (2017) e Zhang *et al.* (2023). Os fatores e os níveis estão representados na Tabela 20.

TABELA 20 - Planejamento fatorial 2^3 – fatores em seus níveis baixo, médio e alto

Fator	Nível baixo (-1)	Nível médio (0)	Nível alto (+1)
[NPS] (%)	2	4	6
Tempo de agitação (minutos)	1	3	5
[O/A]	0,5/99,5	1/99	2/98
Fatores decodificados			
Experimentos	[NPS] (%)	Tempo de agitação (min)	[O/A]
1	2	1	0,5/99,5
2	6	1	0,5/99,5
3	2	5	0,5/99,5
4	6	5	0,5/99,5
5	2	1	2/98
6	6	1	2/98
7	2	5	2/98
8	6	5	2/98
9.1	4	3	1/99
9.2	4	3	1/99
9.3	4	3	1/99

Fonte: A autora

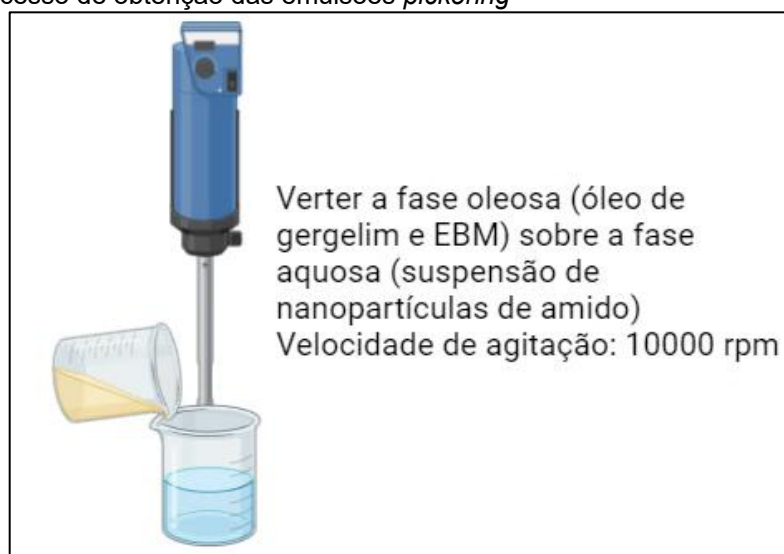
O *software* Statistica 10.0 foi utilizado no desenho do experimento mostrado na Tabela 19, sendo executado de forma aleatorizada.

5.2.2.2 Desenvolvimento da emulsão *pickering*

Primeiramente foram preparadas as suspensões com 2% (% , m.v⁻¹), 4% (% , m.v⁻¹) e 6% (% , m.v⁻¹) de nanopartículas de amido em 20 mL de água purificada e estas suspensões foram homogeneizadas em ultraturrax a 14000 rpm por 8 minutos. Em seguida, por ser uma emulsão O/A, a fase oleosa (composta por óleo de gergelim e o extrato de bagaço de malte líquido nas concentrações 5% e 10% (% , m.m⁻¹),

quando aplicável), nas concentrações 0,5%, 1% e 2% (% m.v⁻¹), foi adicionada sobre a fase aquosa (nanopartículas de amido) sob agitação em ultraturrax a 10000 rpm nos tempos 1, 3 e 5 minutos, para a formação da emulsão *pickering*, conforme está ilustrado na Figura 45. No final do processo foi feito o ajuste de pH para 6,0 com ácido cítrico. Em seguida, as formulações de emulsão *pickering* obtidas foram submetidas à análise de espectroscopia de correlação de fótons para avaliação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de amido que estabilizam a emulsão *pickering*.

FIGURA 45 - Processo de obtenção das emulsões *pickering*



Fonte: A autora

5.2.2.3 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de amido, estabilizantes das emulsões *pickering*

As onze formulações desenvolvidas no planejamento fatorial foram submetidas às análises de diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta através da espectroscopia da correlação de fótons por meio do espalhamento dinâmico da luz (*DLS*) no analisador de partículas (ZETASIZER NANO ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido) à temperatura de leitura de 25 °C, com *software* Zetasizer versão 8.02. Foi feita a diluição das amostras em água purificada (1:500).

5.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura da emulsão *pickering* desenvolvida

As eletromicrografias para avaliação da morfologia e superfície das nanopartículas de amido, que ficam adsorvidas na interface óleo-água para estabilização da emulsão, foram obtidas por meio da exposição das amostras ao microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). Primeiramente, 10 μL da emulsão foi adicionada diretamente em *stub*, espalhando a gota formada até a formação de um filme fino na superfície do suporte, e a posterior secagem a 30 ± 2 °C por 5 minutos. A emulsão foi submetida à metalização com ouro em um metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão). Para obtenção das eletromicrografias, foi empregada voltagem de aceleração de 41 kV e utilizado *software* específico (*Electron Optical Design*).

5.2.2.5 Avaliação da irritação ocular da emulsão *pickering* com e sem extrato de bagaço de malte por *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)*

A avaliação *in vitro* da irritação ocular das emulsões *pickering* Controle, com 5% e 10% (% m.m^{-1}) de extrato de bagaço de malte foi realizada através do *HET-CAM*, de acordo com o protocolo francês descrito por Luepke e Kemper (1986). Esse teste foi realizado em quadruplicata para cada amostra, sendo utilizado 20 ovos galados no total, considerando o controle positivo (*SDS* - *sodium dodecyl sulfate* ou dodecil sulfato de sódio 1%, % m.v^{-1}) e controle negativo (solução salina estéril). No tempo 0, em que os ovos galados foram recebidos do fornecedor, estes já foram pesados (valores de massas ficaram entre 50g-75g) e então foram colocados, em posição horizontal, em chocadeiras (GOLDEN, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com sistema de rotação e termostato para controle de temperatura (38 ± 1 °C) e umidade (UR=50-60%). Os ovos foram incubados por 10 dias para o desenvolvimento completo do embrião e no 9º dia, estes ovos precisaram ser virados para a formação da câmara de ar, que permite a retirada da parte externa do ovo, sem ocasionar danos ao embrião.

No 10º dia de incubação, foi feito o teste *HET-CAM*, em que consistiu primeiramente em retirar a casca do ovo na região da câmara de ar (observada com o auxílio de luminária). Em seguida, a membrana externa foi hidratada com a aplicação de solução fisiológica estéril. Após a hidratação, a membrana externa foi removida

cuidadosamente com pinça e a membrana corioalantóide ou *chorioallantoic membrane* (CAM) do embrião foi exposta. Foi feito o ajuste dos ovos no suporte do estereoscópio Magnifier (BEL PHOTONICS, modelo LED-60 T, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com ampliação de 7x, acoplado a câmera (TUCSEN USB2.0 HSeries, modelo ISH500, China), e o *software* usado foi *TCapture Imaging Application TUCSEN*, para a obtenção das imagens. Em seguida, foi adicionado 200 µL de cada uma das amostras e após 20 segundos da aplicação das amostras, foi feito o enxágue com solução de salina estéril (5 mL), removendo o excesso dessa solução logo em seguida. Ao retornar o ovo para a posição original no suporte do estereoscópio, foi feita a filmagem por 5 minutos (contados a partir da aplicação das amostras). Durante os 5 minutos, foi observada a existência ou não dos fenômenos vasculares, em minutos, descritos na Tabela 21.

TABELA 21 - Escore de irritação considerando o tempo de ocorrência de cada evento vascular

Fenômeno	Tempo (min)		
	T ≤ 0,5 min	0,5 min < t ≤ 2 min	2 min < t ≤ 5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: **Adaptado de** LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, n.6/7, p.495-496, 1986.

Para o cálculo do escore de irritação (*Msc – mean score*), foi utilizada a Equação 10, em que os números subscritos indicam a replicata e as siglas *Hip*, *Hem* e *Coag* significam Hiperemia, Hemorragia e Coagulação, respectivamente.

$$Msc = (Hip_1 + Hem_1 + Coag_1) + (Hip_2 + Hem_2 + Coag_2) + (Hip_3 + Hem_3 + Coag_3) + (Hip_4 + Hem_4 + Coag_4) \quad (10)$$

Uma vez ocorrido algum evento vascular citado, a Tabela 22 demonstra a classificação quanto à intensidade, de acordo com os valores dos escores cumulativos.

TABELA 22 - Classificação da intensidade dos eventos vasculares, de acordo com escore cumulativo

Escore cumulativo	Avaliação da irritação
$\leq 0,9$	Praticamente nenhuma
1,0 até 4,9	Pouca
5,0 até 8,9	Moderada
$\geq 9,0$	Forte

Fonte: **Adaptado de** LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, n.6/7, p.495-496, 1986.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Planejamento Fatorial das Formulações de Emulsão *Pickering*, Desenvolvimento da Emulsão *Pickering* e Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

Os dados numéricos obtidos para cada uma das variáveis avaliadas (diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta) estão presentes na Tabela 23. O potencial zeta não sofreu a interferência de nenhum dos fatores avaliados, ou seja, os coeficientes não foram significativos ($p > 0,05$).

TABELA 23 - Emulsões e as variáveis diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta utilizadas no planejamento fatorial 2³

Variáveis Decodificadas						
Amostras	[NPs]	Tempo de agitação	[O/A]	Diâmetro de partícula	Índice de polidispersão	Potencial zeta
EP 1	2,0	1	0,5/99,5	1929	1	-49,6
EP 2	6,0	1	0,5/99,5	777	0,98	-24,2
EP 3	2,0	5	0,5/99,5	448,6	0,64	-54,5
EP 4	6,0	5	0,5/99,5	350,3	0,52	-46,8
EP 5	2,0	1	2/98	1603	1	-58,3
EP 6	6,0	1	2/98	2402	1	-40,5
EP 7	2,0	5	2/98	694,5	0,78	-44,8
EP 8	6,0	5	2/98	593,6	0,64	-55
EP 9.1	4,0	3	1/99	586,7	0,76	-55,7
EP 9.2	4,0	3	1/99	475,2	0,66	-53,8
EP 9.3	4,0	3	1/99	561,2	0,70	-59,8

Fonte: A autora

Notas: EP: emulsão *pickering*; NPs: nanopartículas; [O/A]: proporção óleo/água. Os dados relacionados a [NPs], tempo de agitação, diâmetro de partícula e potencial zeta estão expressos nas unidades de %, min, nm e mV, respectivamente.

Para poder avaliar a influência dos parâmetros no diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas nas emulsões *pickering*, os dados obtidos nos experimentos foram ajustados em equações polinomiais para as respostas observadas. O desenho experimental foi adequado ao seguinte modelo polinomial de segunda ordem apresentado nas Equações 11, 12 e 13.

$$y_1 = +947,373 - 69,025\beta_1 - 578,000\beta_2 + 223,525\beta_3 + 19,225\beta_{12} + 243,550\beta_{13} - 101,225\beta_{23} \quad (11)$$

$$y_2 = +0,791 - 0,034\beta_1 - 0,174\beta_2 + 0,034\beta_3 - 0,029\beta_{12} - 0,001\beta_{13} + 0,029\beta_{23} \quad (12)$$

$$y_3 = -49,363 + 5,087\beta_1 - 3,562\beta_2 - 2,937\beta_3 - 5,712\beta_{12} - 3,187\beta_{13} + 3,312\beta_{23} \quad (13)$$

onde: y é a variável dependente, sendo y_1 o diâmetro médio, y_2 o índice de polidispersão e y_3 o potencial zeta, β_1 é o coeficiente de regressão para a concentração de nanopartículas, β_2 para o tempo de agitação e β_3 para a proporção O/A, e β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes para avaliação da interação entre concentração de nanopartículas e tempo de agitação, concentração de nanopartículas e proporção O/A e proporção O/A e tempo de agitação, respectivamente.

Na Tabela 24 e nos gráficos de superfície-resposta nas Figuras 46, 47 e 48, é possível observar que o tempo de agitação exerceu um efeito negativo significativo sobre o diâmetro médio e índice de polidispersão, indicando que quanto menor o tempo de agitação, maiores os valores de diâmetro médio e índice de polidispersão. As diferentes interações entre os fatores analisados não influenciaram significativamente as respostas.

Nem a concentração de partículas e nem a proporção óleo/água tiveram algum impacto significativo, entretanto seu efeito foi importante para contribuir com o ajuste do modelo. Foi selecionada para as demais caracterizações somente a emulsão *pickering* com 2% (% m.v⁻¹) de nanopartículas, 0,5/99,5 de proporção óleo/água e com maior tempo de agitação (5 minutos), que corresponde a EP3.

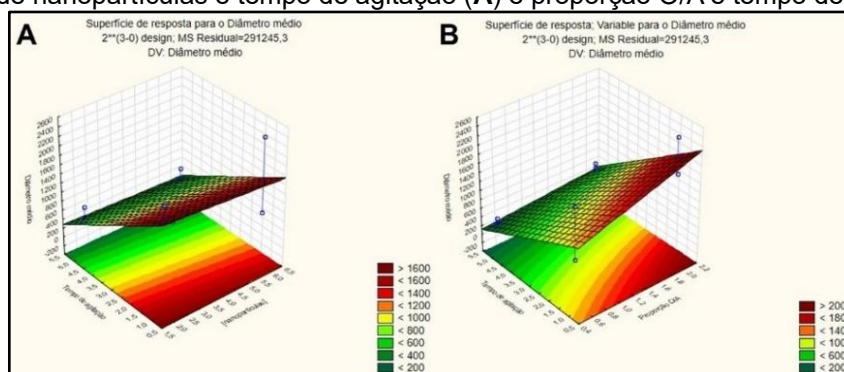
TABELA 24 - Coeficientes de regressão fatorial para as variáveis resposta

Coeficientes	Diâmetro médio	Índice de polidispersão	Potencial zeta
β_1	-69,025	-0,034	5,087
β_2	-578,000*	-0,174*	-3,562
β_3	223,525	0,034	-2,937
β_{12}	19,225	-0,029	-5,712
β_{13}	243,550	-0,001	-3,187
β_{23}	-101,225	0,029	3,312
R^2	0,759	0,895	0,772

Fonte: A autora

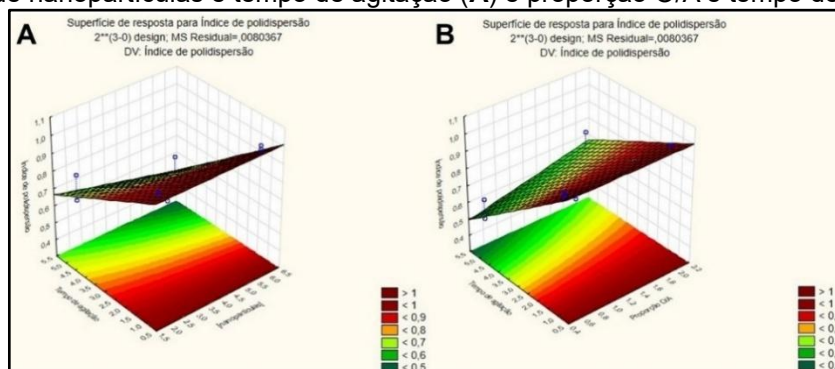
Notas: β_1 : [NPS]; β_2 : Tempo de agitação; β_3 : [O/A]; β_{12} : Interação entre [NPs] e tempo de agitação; β_{13} : Interação entre [NPs] e [O/A]; β_{23} : Interação entre tempo de agitação e [O/A]. * Influência significativa nos resultados ($p < 0,05$).

FIGURA 46 – Superfície de resposta para diâmetro médio de partícula em função das variáveis concentração de nanopartículas e tempo de agitação (A) e proporção O/A e tempo de agitação (B)



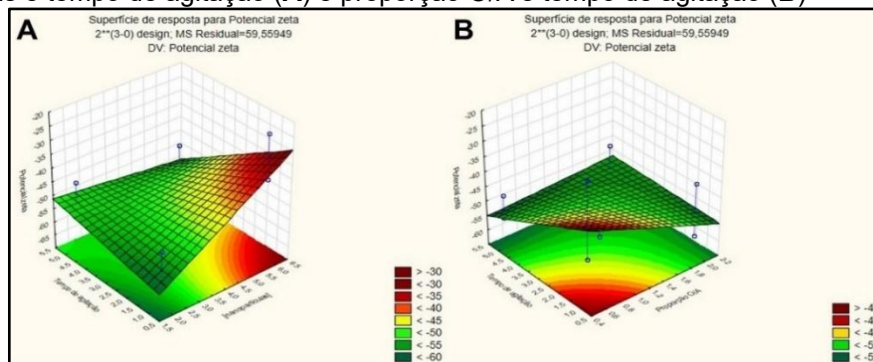
Fonte: A autora

FIGURA 47 – Superfície de resposta para índice de polidispersão em função das variáveis concentração de nanopartículas e tempo de agitação (A) e proporção O/A e tempo de agitação (B)



Fonte: A autora

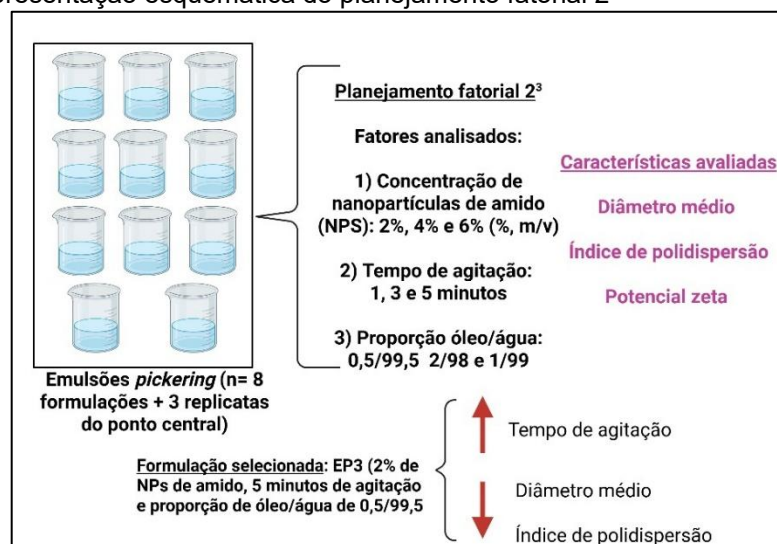
FIGURA 48 – Superfície de resposta para potencial zeta em função das variáveis concentração de nanopartículas e tempo de agitação (A) e proporção O/A e tempo de agitação (B)



Fonte: A autora

A Figura 49 ilustra, de forma resumida, os fatores selecionados para o planejamento fatorial, bem como os parâmetros que foram considerados para a escolha da emulsão *pickering* EP3.

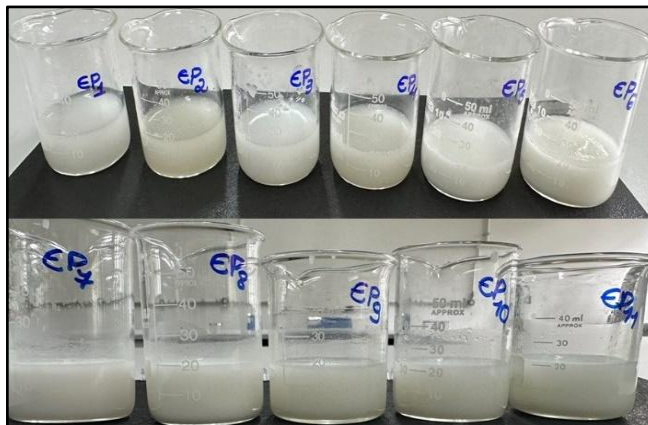
FIGURA 49 – Representação esquemática do planejamento fatorial 2^3



Fonte: A autora

As emulsões *pickering* obtidas apresentaram coloração branca, conforme está na Figura 50. Nas formulações que tiveram valores de índice de polidispersão $> 0,7$ foi possível observar a presença de coalescência logo após o preparo da emulsão. Nas formulações com maior concentração de extrato (10%), as emulsões passaram da coloração branca para uma coloração amarela, que é a cor do extrato incorporado nas formulações.

FIGURA 50 – Fotos das onze formulações de emulsão *pickering* desenvolvidas durante o planejamento fatorial



Fonte: A autora

Assim como nos estudos de Ge *et al.* (2017) e Jiang *et al.* (2023), descritos abaixo, por mais que tenham apresentado algumas mudanças em relação à algumas condições do presente trabalho, como na velocidade de agitação, bem como no tempo de agitação, foi observado que também tiveram uma melhor resposta relacionada a estabilidade das emulsões, sem a observação dos sinais de instabilidade de coalescência ou separação de fases, quando foi usada a menor concentração de óleo, especialmente 0,5%, e a concentração de nanopartículas na faixa de 2-2,5%, confirmando com o que foi obtido neste trabalho.

Ge *et al.* (2017) preparam as formulações de emulsão *pickering* com nanopartículas de amido com volume total de 20 mL. As variações usadas foram suspensão de nanopartículas, que variou de 0,25 a 2% e fração de óleo 0,25-0,75. Foi feita a agitação em ultraturrax a 10000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Houve aumento no volume da fase emulsionada quando teve o aumento da proporção de óleo de 0,25 para 0,5% após 3 horas, portanto a concentração de 0,5% foi considerada como a proporção crítica de óleo para esse estudo. Em relação a concentração de nanopartículas, observou-se que a maior concentração de nanopartículas testada (2%) fez com que mais nanopartículas ficassem aderidas na interface óleo-água, promovendo uma maior estabilização do sistema.

Já as emulsões *pickering* desenvolvidas por Jiang *et al.* (2023) com nanopartículas de amido de quinoa, foi feita a variação de 0,5-2,5% de nanopartículas de amido, fração de óleo 0,5%, a variação de 0,25-0,75% de óleo com 2% de nanopartículas de amido e a variação de pH – 3-9 e força iônica de 0-200 mM, usando 2% de nanopartículas e 0,33% de óleo. Foi feita a agitação das emulsões em

ultraturrax a 10000 rpm por 3 minutos. Não houve a interferência da presença de cloreto de sódio na emulsão. O volume da fase emulsionada aumentou com o aumento da concentração de nanopartículas de quinoa de 0,5 a 2,5%. A separação de fases era visível em emulsões em concentrações mais baixas de nanopartículas (0,5; 1,0 e 1,5%). Com o aumento da fração volumétrica de óleo, as nanopartículas adsorvidas na interface óleo-água foram insuficientes para evitar a coalescência entre as gotículas de óleo, resultando no aumento de tamanho das gotículas.

Shao *et al.* (2018) desenvolveram emulsão *pickering* a partir de nanopartículas de amido de inhame. As concentrações das nanopartículas variaram 3%, 5%, 7% e 9% e a fração de óleo (MCT – triglicerídeo de cadeia média) com concentrações de 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6%. O cloreto de sódio foi incorporado nas emulsões nas concentrações 0; 0,02; 0,04 e 0,06 mM. Foi feita a agitação em ultraturrax a 12000 rpm por 2 minutos. A fração de óleo com 0,5% teve o menor aumento no tamanho das gotículas durante 28 dias de observação, o que confirma com o que foi encontrado no presente trabalho.

Nas emulsões convencionais, o tamanho das gotículas da emulsão diminui à medida que a concentração do tensoativo aumenta, até que a concentração crítica micelar seja atingida. Já nas emulsões *pickering*, a redução da concentração de amido reduz a densidade da camada de partículas coloidais na interface e a frequência de colisão entre as gotículas aumenta, podendo ocorrer floculação e coalescência (Shao *et al.*, 2018).

O pH final da emulsão *pickering* também influencia na sua estabilidade. No estudo de Jiang *et al.* (2023), a emulsão com pH 7 apresentou o menor tamanho de gota. A emulsão com pH 11 apresentou um tamanho de gota significativamente grande. Emulsões com valores de pH de 3 a 9 tiveram boa estabilidade em relação ao pH. Em pH 11, há grande quantidade de íons OH^- na fase aquosa, aumentando as ligações de hidrogênio com nanopartículas de amido e isso reduz a força eletrostática das nanopartículas ligadas na interface óleo-água, resultando na agregação de gotículas de óleo (Jiang *et al.*, 2023). Devido a isso, houve a necessidade do ajuste de pH com ácido cítrico da emulsão *pickering* desenvolvida no presente trabalho para pH= 6,0.

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura da Emulsão *Pickering* desenvolvida

Algumas características importantes que as nanopartículas presentes na emulsão *pickering* devem apresentar, para manter a estabilização da emulsão por um tempo maior, incluem a molhabilidade, que é dependente do ângulo de contato na interface óleo-água. Outra característica importante de ser avaliada é o tamanho das partículas, que exerce um efeito na sua energia de dessorção, além de influenciar no mecanismo de estabilização das emulsões *pickering* (Guevara-Guerrero *et al.*, 2022).

Foi demonstrado que partículas sólidas em tamanhos micrométricos ou nanométricos podem formar uma barreira por meio de adsorção na interface óleo-água para melhorar a estabilidade da emulsão. O tamanho esférico das nanopartículas também permite com que estas formem uma barreira com maior coesão na interface óleo-água (Zhou *et al.*, 2023).

Na análise de microscopia da emulsão *pickering* selecionada (2% de nanopartículas, tempo de agitação de 5 minutos e proporção óleo/água igual a 0,5/99,5) é possível observar a presença de nanopartículas esféricas com tamanhos individuais medidos pelo próprio *software* do equipamento, variando de 366 a 386 nm (Figura 51), um tamanho menor do que foi obtido na análise por *DLS* (448,6 nm), provavelmente devido a leitura de nanopartículas aglomeradas na análise do diâmetro médio pelo equipamento em que ocorre o espalhamento dinâmico da luz.

Mesmo apresentando uma variação no tamanho de partículas sólidas obtidas, alguns autores relataram que as emulsões *pickering* desenvolvidas apresentaram uma boa estabilidade, como é o caso de Lu *et al.* (2018), os quais obtiveram nanopartículas com diâmetro médio de 700 nm, já Choi *et al.* (2020) conseguiram diâmetro médio de 30 nm para as nanopartículas de amido. Shao *et al.* (2018) desenvolveram nanopartículas de amido de taro com diâmetro médio de 460 nm, semelhante ao que foi obtido no presente de trabalho, as quais permitiram a obtenção de emulsões *pickering* estáveis, com eficiência de encapsulação de 67% de polifenóis de chá.

FIGURA 51 – Fotomicrografia das partículas, em tamanho nanométrico, presentes na emulsão *pickering*, em aumento de 41000x



Fonte: A autora

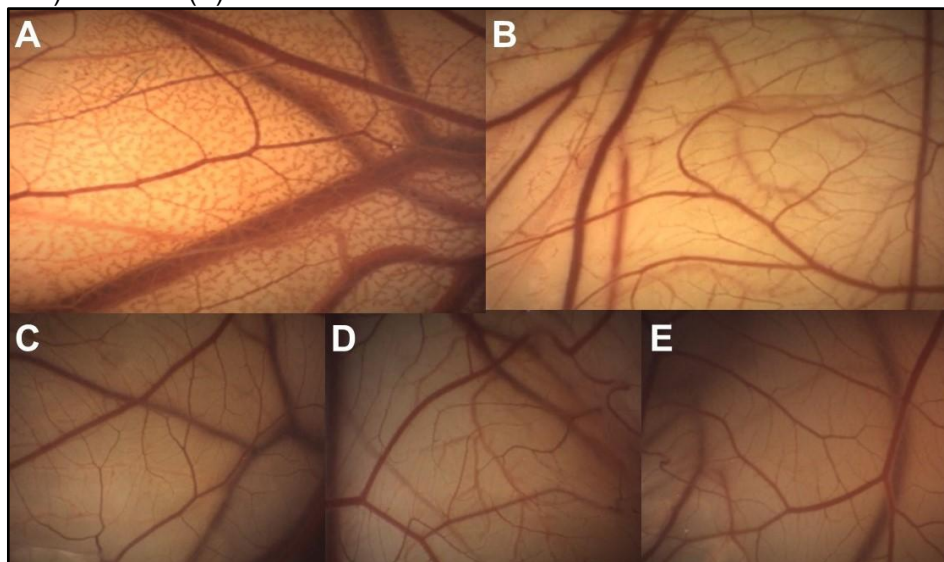
Portanto, em comparação com os dados da literatura, as nanopartículas de amido obtidas no presente trabalho são consideradas adequadas para a estabilização de emulsões *pickering*, considerando somente seus tamanhos e formatos, visualizados na análise de microscopia eletrônica de varredura. Porém, além dessas características, seria necessário a avaliação de outros parâmetros necessários para a confirmação da estabilidade, como o ângulo de contato das partículas e a visualização de imagens das gotículas de óleo dispersas na emulsão (Ruan *et al.*, 2022).

5.3.4 Avaliação *In Vitro* da Irritação Ocular da Emulsão *Pickering* com e sem Extrato de Bagaço de Malte por *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM)*

Durante os 5 minutos do teste *HET-CAM* foi possível observar a presença de hiperemia, hemorragia e coagulação somente para o controle positivo (solução de dodecil sulfato de sódio a 1%), conforme apresentado na Figura 52. Já para o controle negativo (solução de salina isotônica) e para as emulsões *pickering* Controle (sem extrato), com 5% e 10% de extrato, não foi possível observar nenhum dos sinais vasculares descritos anteriormente, permitindo concluir que as formulações são consideradas seguras para aplicações em regiões vascularizadas, como a região

ocular ou mesmo em mucosas. O controle positivo apresentou hiperemia em ≤ 30 segundos e hemorragia entre $30 \text{ segundos} < T \leq 2 \text{ minutos}$, portanto sendo considerado irritante.

FIGURA 52 – Imagens obtidas durante o teste *HET-CAM* para controle positivo – SDS 1% (% , m.v⁻¹) (A), controle negativo – salina (B), EP Controle (C), EP com 5% (% , m.m⁻¹) de EBMP (D) e EP com 10% (% , m.m⁻¹) de EBMP (E)



Fonte: A autora

5.4 CONCLUSÃO

No planejamento fatorial 2^3 , o maior tempo de agitação influenciou significativamente em menor tamanho de partícula e menor índice de polidispersão. Devido a isso, a emulsão *pickering* selecionada foi a EP3, que apresentou a menor concentração de nanopartículas (2%) e menor proporção O/A (0,5/99,5), porém com maior tempo de agitação, uma vez que quanto menor o tamanho de partículas e mais monodispersas estas se apresentarem, mais coesas essas partículas ficam na interface óleo-água e consequentemente maior a estabilidade da emulsão.

Já no teste *HET-CAM*, não foi possível observar nenhum sinal de irritação nas emulsões *pickering* Controle e com extrato (nas concentrações de 5% e 10%), ao contrário do tensoativo dodecil sulfato de sódio. A presença e o aumento da concentração de extrato não interferiram na toxicidade das amostras. Além de serem formulações consideradas seguras, não apresentam tensoativos na sua composição, que podem ser irritantes. Portanto, a emulsão *pickering* desenvolvida apresenta-se como uma alternativa de formulação cosmética sustentável, biodegradável e

compatível com áreas vascularizadas, como a região dos olhos, com potencial antioxidante e prebiótico para aplicação em cremes ou sérums faciais.

CONCLUSÃO

Os extratos de bagaços de malte tipo Pilsen (EBMP) e a mistura de Centeio (EBMC) foram os dois selecionados para a realização das análises de caracterização, pois apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais e consequentemente a maior inibição principalmente dos radicais ABTS•+. Devido a maior produção mundial da cerveja e consequentemente do bagaço de malte tipo Pilsen, somente este foi selecionado para incorporação nas formulações desenvolvidas. O EBMP não mostrou-se citotóxico em concentrações inferiores a 5 mg.mL⁻¹ e apresentou ação prebiótica para *Lactobacillus acidophilus*. Além disso, o extrato não inibiu o crescimento de microrganismos que fazem parte da microbiota cutânea, como *Staphylococcus epidermidis*, evitando o desequilíbrio dessa microbiota local e o surgimento de consequentes irritações.

Os filmes de amido/PVA com 5% e 10% (% m.m⁻¹) de extrato de bagaço de malte foram obtidos com sucesso e foi possível observar que o aumento da concentração de extrato fez com que os filmes se tornassem mais rígidos e menos flexíveis. Os filmes se tornaram mais opacos e menos permeáveis ao vapor d'água em concentrações maiores de extrato (10%), portanto o filme de escolha seria com 5% de extrato. A liberação dos compostos fenólicos dos filmes foi total, atingindo a 100% em 2 horas de teste, para a amostra com 5% (% m.m⁻¹) de extrato e 4 horas para a amostra com 10% (% m.m⁻¹) de extrato em meio tampão pH 5,5 na temperatura de 32 °C (condições que simulam uma pele jovem e saudável).

Nas nanopartículas, o aumento da concentração de extrato reduziu a estabilidade e a eficiência de encapsulação das nanopartículas, sendo a nanopartícula com 5% (% m.m⁻¹) de extrato a formulação selecionada para aplicação cosmética. Na microscopia, foi possível observar que as nanopartículas obtidas apresentaram formato esférico. A estrutura semi-cristalina do amido nativo foi transformada em estrutura amorfa após a obtenção das nanopartículas.

Para a emulsão *pickering* foi escolhida a EP3, que consistiu em 2% (% m.v⁻¹) de nanopartículas de amido, 5 minutos de agitação e 0,5/99,5 de proporção óleo/água, uma vez que somente o tempo de agitação interferiu significativamente no diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas (maior o tempo de agitação, menor o diâmetro médio e índice de polidispersão). No teste *HET-CAM*, não foi observado nenhum sinal vascular relacionado a toxicidade das amostras.

Tendo em vista os resultados observados, foi possível concluir que o extrato de bagaço de malte é uma alternativa promissora a ser utilizado em formulações cosméticas sustentáveis e biodegradáveis como antioxidante e prebiótico, representando assim uma alternativa de baixo custo, sustentável e garantindo a valorização deste subproduto.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ATY, A. M.; BARAKAT, A. Z.; BASSUINY, R. I.; MOHAMED, S. A. Statistical optimization, characterization, antioxidant and antibacterial properties of silver nanoparticle biosynthesized by saw palmetto seed phenolic extract. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42675-0>. Acesso em: 02 fev. 2024.
- ABDO, J. M.; SOPKO, N. A.; MILNER, S. M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. **Wound Medicine**, [s. l.], v. 28, n. January, p. 100179, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>. Acesso em: 12 mar. 2022.
- ABEDI-FIROOZJAH, R.; CHABOOK, N.; ROSTAMI, O.; HEYDARI, M.; KOLAHDOUZ-NASIRI, A.; JAVANMARDI, F.; ABDOLMALEKI, K.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. PVA/starch films: An updated review of their preparation, characterization, and diverse applications in the food industry. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 118, n. December 2022, p. 107903, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107903>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- ABEYNAYAKE, R.; ZHANG, S.; YANG, W.; CHEN, L. Development of antioxidant peptides from brewers' spent grain proteins. **Lwt**, [s. l.], v. 158, n. August 2021, p. 113162, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113162>. Acesso em: 22 ago. 2023.
- ADAMCZYK-GROCHALA, J.; WNUK, M.; DUDA, M.; ZUCZEK, J.; LEWINSKA, A. Treatment with modified extracts of the microalga planktochlorella nurekis attenuates the development of stress-induced senescence in human skin cells. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 4, 2020.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. **Anvisa**, [s. l.], v. 2, p. 1–74, 2012.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, [s. l.], v. 11, n. September, p. 12–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>. Acesso em: 06 abr. 2022.
- ALMEIDA, A. da R.; GERALDO, M. R. F.; RIBEIRO, L. F.; SILVA, M. V.; MACIEL, M. V. de O. B.; HAMINIUK, C. W. I. Compostos bioativos do bagaço de malte: Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante in vitro. **Acta Scientiarum - Technology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 269–277, 2017.
- ALMENDINGER, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D. Malt and beer-related by-products as potential antioxidant skin-lightening agents for cosmetics. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 17, n. June, p. 100282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100282>. Acesso em: 12 maio 2022.
- ALONSO-RIAÑO, P.; DIEZ, M. T. S.; BLANCO, B.; BELTRÁN, S.; TRIGUEROS, E.; BENITO-ROMÁN, O. Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: Kinetic study, extract characterization, and concentration.

Antioxidants, [s. l.], v. 9, n. 3, 2020.

ANSAF, R. B.; ZIEBART, R.; GUDAPATI, H.; SIMOES TORIGOE, R. M.; VICTORELLI, S.; PASSOS, J.; WYLES, S. P. 3D bioprinting - a model for skin aging. **Regenerative Biomaterials**, [s. l.], v. 10, n. June, 2023.

ANVISA. Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde de Base Nanotecnológica - Guia nº 63/2023 – versão 2. [s. l.], 2023.

ANVISA, A. N. de V. S.-M. da S. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União nº141, de 25 de julho de 2017**, [s. l.], v. 2017, p. 1–21, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 06 fev. 2022.

ARNAL-FORNÉ, M.; MOLINA-GARCÍA, T.; ORTEGA, M.; MARCOS-GARCÉS, V.; MOLINA, P.; FERRÁNDEZ-IZQUIERDO, A.; SEPULVEDA, P.; BODÍ, V.; RÍOS-NAVARRO, C.; RUIZ-SAURÍ, A. Changes in human skin composition due to intrinsic aging: a histologic and morphometric study. **Histochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 162, n. 4, p. 259–271, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00418-024-02305-w>>. Acesso em: 24 set. 2024.

BACHMANN, S. A. L.; CALVETE, T.; FÉRIS, L. A. Potential applications of brewery spent grain: Critical an overview. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2022.

BARTHE, M.; BAVOUX, C.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; CUCEU-PETRENCI, C.; FORRERYD, A.; HANSSON, A. C.; JOHANSSON, H.; LEMKINE, G. F.; THÉNOT, J. P.; OSMAN-PONCHET, H. Safety testing of cosmetic products: Overview of established methods and new approach methodologies (nams). **Cosmetics**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1–18, 2021.

BECKER, D.; STEGMÜLLER, S.; RICHLING, E. Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides, and oxylipins. **Food Science and Nutrition**, [s. l.], n. November 2022, p. 2298–2320, 2022.

BEGUM, M. H. A.; HOSSAIN, M. M.; GAFUR, M. A.; KABIR, A. N. M. H.; TANVIR, N. I.; MOLLA, M. R. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol–starch composites reinforced with pulp. **SN Applied Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 9, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42452-019-1111-2>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

BENINCA, C. Emprego de técnicas termoanalíticas nas análises de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas. **Dissertação**, [s. l.], p. 76, 2008.

BENÍTEZ, J. M.; MONTÁNS, F. J. The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. **Computers and Structures**, [s. l.], v. 190, p. 75–107, 2017.

BIRSAN, R. I.; WILDE, P.; WALDRON, K. W.; RAI, D. K. Recovery of polyphenols from brewer's spent grains. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1–12, 2019.

BONIFÁCIO-LOPES, T.; M. G. CASTRO, L.; VILAS-BOAS, A.; CAMPOS, D.; TEIXEIRA, J. A.; PINTADO, M. Impact of gastrointestinal digestion simulation on brewer's spent grain green extracts and their prebiotic activity. **Food Research International**, [s. l.], v. 165, n. January, 2023.

BONIFÁCIO-LOPES, T.; VILAS-BOAS, A.; MACHADO, M.; COSTA, E. M.; SILVA, S.; PEREIRA, R. N.; CAMPOS, D.; TEIXEIRA, J. A.; PINTADO, M. Exploring the bioactive potential of brewers spent grain ohmic extracts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 76, n. September 2021, 2022.

BONIFÁCIO-LOPES, T.; VILAS BOAS, A. A.; COSCUETA, E. R.; COSTA, E. M.; SILVA, S.; CAMPOS, D.; TEIXEIRA, J. A.; PINTADO, M. Bioactive extracts from brewer's spent grain. **Food & Function**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 8963–8977, 2020. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D0FO01426E>>. Acesso em: 08 out. 2021.

BRAND, M. A.; DE BARNASKY, R. R. S.; CARVALHO, C. A.; BUSS, R.; WALTRICK, D. B.; JACINTO, R. C. Thermogravimetric analysis for characterization of the pellets produced with different forest and agricultural residues. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 48, n. 11, 2018.

CALDONAZO, A.; ALMEIDA, S. L.; BONETTI, A. F.; LAZO, R. E. L.; MENGARDA, M.; MURAKAMI, F. S. Pharmaceutical applications of starch nanoparticles: A scoping review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 181, p. 697–704, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.061>>. Acesso em: 16 jun. 2023.

CARVALHO, M. J.; PEDROSA, S. S.; MENDES, A.; AZEVEDO-SILVA, J.; FERNANDES, J.; PINTADO, M.; OLIVEIRA, A. L. S.; MADUREIRA, A. R. Anti-Aging Potential of a Novel Ingredient Derived from Sugarcane Straw Extract (SSE). **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 1, 2024.

CASTANHO, M. N.; DE SOUZA DO PRADO, K.; DE PAIVA, J. M. F. Developing thermoplastic corn starch composites filled with brewer's spent grain for applications in biodegradable films. **Polymer Composites**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 811–826, 2022.

CASTRO, L. E. N.; COLPINI, L. M. S. All-around characterization of brewers' spent grain. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 247, n. 12, p. 3013–3021, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00217-021-03860-5>>. Acesso em: 09 set. 2021.

CAZEDEY, E. C. L.; CARVALHO, F. C.; FIORENTINO, F. A. M.; GREMIÃO, M. P. D.; SALGADO, H. R. N. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 759–766, 2009.

CHANG, Y.; YAN, X.; WANG, Q.; REN, L.; TONG, J.; ZHOU, J. High efficiency and low cost preparation of size controlled starch nanoparticles through ultrasonic treatment and precipitation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 227, p. 369–375, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.111>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

CHAVAN, P.; SINHMAR, A.; NEHRA, M.; THORY, R.; PATHERA, A. K.; SUNDARRAJ, A. A.; NAIN, V. Impact on various properties of native starch after synthesis of starch nanoparticles: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 364, n. June,

p. 130416, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130416>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

CHEN, H.; JIANG, Y.; ZHANG, B.; FANG, Y.; LIN, Q.; DING, Y. Application of Pickering emulsions stabilized by corn, potato and pea starch nanoparticles: Effect of environmental conditions and approach for curcumin release. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 238, n. January, p. 124115, 2023. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124115>>. Acesso em: 12 jul. 2024.

CHEN, Y.; LIN, Q.; WANG, J.; MU, J.; LIANG, Y. Proteins, polysaccharides and their derivatives as macromolecular antioxidant supplements: A review of in vitro screening methods and strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 224, n. August 2022, p. 958–971, 2023. b.

CHETRARIU, A.; DABIJA, A. Pre-treatments used for the recovery of brewer's spent grain-a minireview. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 304–312, 2020.

CHIN, S. F.; PANG, S. C.; TAY, S. H. Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 1817–1819, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.012>>. Acesso em: 12 jul. 2023.

CORRÊA, G. de O. P.; MARCATO, D. C.; RAMOS, W. S.; CORRÊA, M. A.; CICALLELLI, R. M. B.; ISAAC, V. L. B. In vitro evaluation of the cytotoxicity and eye irritation potential of preservatives widely used in cosmetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 58, p. 1–12, 2022.

CZAJA, T. P.; VICKOVIC, D.; PEDERSEN, S. J.; HOUGAARD, A. B.; AHRNÉ, L. Spectroscopic characterisation of acidified milk powders. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 142, 2023.

DE ANDRADE, P. S.; BALDONE LARA, B. R.; DE SOUZA NASCIMENTO, B.; DIAS, M. V. Cassava starch films: effect of polyvinyl alcohol on films' water diffusion, permeation and sorption behavior and mechanical properties. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 1431–1446, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13726-022-01086-0>>. Acesso em: 12 dez. 2022.

DE LIMA MARSIGLIA, W. I. M.; OLIVEIRA, L. de S. C.; LUCAS JACINTO ALMEIDA, R.; SANTOS, N. C.; DA SILVA NETO, J. M.; SANTIAGO, Â. M.; DE MELO, B. C. A.; HONORATO DA SILVA, F. L. Thermal stability of total phenolic compounds and antioxidant activities of jaboticaba peel: Effect of solvents and extraction methods. **Journal of the Indian Chemical Society**, [s. l.], v. 100, n. 5, 2023.

DE OLIVEIRA, N. R.; FORNACIARI, B.; MALI, S.; CARVALHO, G. M. Acetylated Starch-Based Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Studies of Interaction With Antioxidants. **Starch/Stärke**, [s. l.], v. 70, n. 3–4, p. 1–10, 2018.

DELAVARI, M. M.; STIHARU, I. Preparation and Characterization of Eco-Friendly Transparent Antibacterial Starch/Polyvinyl Alcohol Materials for Use as Wound-Dressing. **Micromachines**, [s. l.], v. 13, n. 6, 2022.

GARCÍA-GURROLA, A.; ESCOBAR-PUENTES, A. A.; RINCÓN, S.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; ZEPEDA, A. Succinylated Starch Nanocapsules Loaded with the

Polyphenolic Extract from Arugula (*Eruca sativa*) Leaves: Colloidal, Chemical, and Structural Properties. **Starch/Staerke**, [s. l.], v. 73, n. 11–12, p. 1–8, 2021.

GE, S.; XIONG, L.; LI, M.; LIU, J.; YANG, J.; CHANG, R.; LIANG, C.; SUN, Q. Characterizations of Pickering emulsions stabilized by starch nanoparticles: Influence of starch variety and particle size. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 234, p. 339–347, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.150>>. Acesso em: 13 fev. 2023.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, 2021.

GINTING, H. S.; FACHRIAL, E.; NYOMAN, I.; LISTER, E.; AMANSYAH, A. Anti-Aging Activities of Asparagus Gel Ethanol Extract in Cosmetic Gel Agent for Facial Skin Pengaruh Ekstrak Etanol Asparagus sebagai Sediaan Kosmetik Gel Anti-Penuaan Terhadap Kulit Wajah. [s. l.], v. 53, n. 3, p. 119–125, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.15395/mkb.v53n3.314>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

GOMES, M. L. S.; KLEIN, T.; SIMIONATTO, M.; NADAL, J. M.; ZANIN, S. M. W.; BORSATO, D. M.; FARAGO, P. V. A simple RP-HPLC/UV method for determination of cilostazol in polymeric nanoparticles suspensions: Development and validation. **Latin American Journal of Pharmacy**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 803–809, 2015.

GONG, L.; CHI, J.; ZHANG, Y.; WANG, J.; SUN, B. In vitro evaluation of the bioaccessibility of phenolic acids in different whole wheats as potential prebiotics. **Lwt**, [s. l.], v. 100, n. July 2018, p. 435–443, 2019.

GUEVARA-GUERRERO, B.; BELTRÁN, C. A.; MONTERO-MONTERO, J. C.; VALDÉS-RESTREPO, M. P. Encapsulação de compostos bioativos por emulsão Pickering: revisão. **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2022.

GUO, B.; LIU, C.; GROSSMANN, L.; WEISS, J. Pickering emulsion stabilized by hydrolyzed starch: Effect of the molecular weight. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 612, p. 525–535, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.12.185>>. Acesso em: 16 jul. 2023.

HASSAN, N. A.; DARWESH, O. M.; SMUDA, S. S.; ALTEMIMI, A. B.; HU, A.; CACCIOLA, F.; HAOUJAR, I.; ABEDELMAKSOUD, T. G. Recent Trends in the Preparation of Nano-Starch Particles. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 17, p. 1–24, 2022.

HEDAYATI, S.; NIAKOUSARI, M.; MOHSENPOUR, Z. Production of tapioca starch nanoparticles by nanoprecipitation-sonication treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 143, p. 136–142, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.003>>. Acesso em: 24 maio 2023.

IADECOLA, R.; CICCORITTI, R.; CECCANTONI, B.; BELLINCONTRO, A.; AMORIELLO, T. Optimization of Phenolic Compound Extraction from Brewers' Spent Grain Using Ultrasound Technologies Coupled with Response Surface Methodology. **Sustainability (Switzerland)**, [s. l.], v. 14, n. 6, 2022.

IKRAM, S.; HUANG, L. Y.; ZHANG, H.; WANG, J.; YIN, M. Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 2017.

JAÍZIA DOS SANTOS ALVES, M.; RODRIGUES MONTEIRO, A.; AYALA VALENCIA, G. Antioxidant Nanoparticles Based on Starch and the Phenolic Compounds from Propolis Extract: Production and Physicochemical Properties. **Starch/Staerke**, [s. l.], v. 74, n. 7–8, p. 1–9, 2022.

JIANG, F.; DU, C.; ZHAO, N.; JIANG, W.; YU, X.; DU, S. kui. Preparation and characterization of quinoa starch nanoparticles as quercetin carriers. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 369, n. August 2021, p. 130895, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130895>>. Acesso em: 16 abr. 2023.

JIANG, F.; ZHU, Y.; HU, W. X.; LI, M.; LIU, Y.; FENG, J.; LV, X.; YU, X.; DU, S. kui. Characterization of quinoa starch nanoparticles as a stabilizer for oil in water Pickering emulsion. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 427, n. June, p. 136697, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136697>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; DE MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of Paullinia cupana var. sorbilis (guaraná). **Talanta**, [s. l.], v. 88, p. 502–506, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.023>>. Acesso em: 02 fev. 2022.

KUMARI, S.; YADAV, B. S.; YADAV, R. B. Synthesis and modification approaches for starch nanoparticles for their emerging food industrial applications: A review. **Food Research International**, [s. l.], v. 128, n. October 2019, p. 108765, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108765>>. Acesso em: 27 abr. 2023.

LECH, M.; LABUS, K. The methods of brewers' spent grain treatment towards the recovery of valuable ingredients contained therein and comprehensive management of its residues. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 183, p. 494–511, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.05.032>>. Acesso em: 06 out. 2022.

LEE, D. H.; OH, J. H.; CHUNG, J. H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. **Journal of Dermatological Science**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 174–181, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.016>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

LIU, Y.; YANG, G.; ZOU, D.; HUI, Y.; NIGAM, K.; MIDDELBERG, A. P. J.; ZHAO, C. X. Formulation of Nanoparticles Using Mixing-Induced Nanoprecipitation for Drug Delivery. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 59, n. 9, p. 4134–4149, 2020.

LOTFOLLAHI, Z. The anatomy, physiology and function of all skin layers and the impact of ageing on the skin. **Wound Practice and Research**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 6–10, 2024.

LU, X.; WANG, Y.; LI, Y.; HUANG, Q. Assembly of Pickering emulsions using milled starch particles with different amylose/amylopectin ratios. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 84, n. May, p. 47–57, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.045>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

LU, X.; XIAO, J.; HUANG, Q. Pickering emulsions stabilized by media-milled starch particles. **Food Research International**, [s. l.], v. 105, n. March 2017, p. 140–149,

2018.

LUZARDO-OCAMPO, I.; FLORES-ZAVALA, D.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A. K.; WALL-MEDRANO, A.; OLIVAS-AGUIRRE, F. J.; LOARCA-PIÑA, G.; GAYTÁN-MARTÍNEZ, M. Sensory evaluation and in vitro prebiotic effect of (poly)phenols and dietary fiber-rich mango bagasse-enriched confections. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 465, n. November 2024, 2025.

MACIAS-GARBETT, R.; SERNA-HERNÁNDEZ, S. O.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; PARRA-SALDÍVAR, R. Phenolic Compounds From Brewer's Spent Grains: Toward Green Recovery Methods and Applications in the Cosmetic Industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [s. l.], v. 5, n. June, p. 1–10, 2021.

MARKU, D.; WAHLGREN, M.; RAYNER, M.; SJÖÖ, M.; TIMGREN, A. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 428, n. 1–2, p. 1–7, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.031>>. Acesso em: 09 maio 2023.

MINAKAWA, A. F. K.; FARIA-TISCHER, P. C. S. Simple ultrasound method to obtain starch micro- and nanoparticles from cassava , corn and yam starches. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. January, p. 11–18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.015>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers ' spent grain : generation , characteristics and potential applications. [s. l.], v. 43, p. 1–14, 2006.

NIAZMAND, R.; RAZAVIZADEH, B. M. Ferula asafoetida: chemical composition, thermal behavior, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and gum hydroalcoholic extracts. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 2148–2159, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04724-8>>. Acesso em: 16 jun. 2022.

NOOR, N.; GANI, A.; JHAN, F.; ASHRAF SHAH, M.; UL ASHRAF, Z. Ferulic acid loaded pickering emulsions stabilized by resistant starch nanoparticles using ultrasonication: Characterization, in vitro release and nutraceutical potential. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 84, n. February, p. 105967, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105967>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

OGAWA, C. Y. L.; SATO, F. Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos. [s. l.], p. 1–69, 2016.

OLIVEIRA, A. G. de L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. de F.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 153–159, 2012.

PABBATHI, N. P. P.; VELIDANDI, A.; POGULA, S.; GANDAM, P. K.; BAADHE, R. R.; SHARMA, M.; SIROHI, R.; THAKUR, V. K.; GUPTA, V. K. Brewer's spent grains-based biorefineries: A critical review. **Fuel**, [s. l.], v. 317, n. February, p. 123435, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123435>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

PATIL, S.; BHARIMALLA, A. K.; MAHAPATRA, A.; DHAKANE-LAD, J.;

ARPUTHARAJ, A.; KUMAR, M.; RAJA, A. S. M.; KAMBLI, N. Effect of polymer blending on mechanical and barrier properties of starch-polyvinyl alcohol based biodegradable composite films. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 44, n. PA, p. 101352, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101352>>. Acesso em: 15 mar. 2022.

PATRÍCIA, V.; DA ROCHA, M. Study of the cytotoxicity of raw materials of cosmetic and topical pharmaceutical formulations. **Study of the cytotoxicity of raw materials of cosmetic and topical pharmaceutical formulations**, [s. l.], p. 1–82, 2015.

PEREIRA, L. M.; PORTAPILLA, G. B.; BRANCINI, G. T. P.; POSSATO, B.; BRONZON DA COSTA, C. M.; ABREU-FILHO, P. G.; WAINWRIGHT, M.; YATSUDA, A. P.; BRAGA, G. Ú. L. The potential of phenothiazinium dyes as cytotoxicity markers in cisplatin-treated cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–17, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-023-36721-0>>. Acesso em: 13 fev. 2024.

PETRÓN, M. J.; ANDRÉS, A. I.; ESTEBAN, G.; TIMÓN, M. L. Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 98, n. September 2020, 2021.

PETROV IVANKOVIĆ, A.; MILIVOJEVIĆ, A.; ĆOROVIĆ, M.; SIMOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; JANSEN, P.; VUKOIČIĆ, A.; VAN DEN BOGAARD, E.; BEZBRADICA, D. In vitro evaluation of enzymatically derived blackcurrant extract as prebiotic cosmetic ingredient: extraction conditions optimization and effect on cutaneous microbiota representatives. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–15, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40538-023-00502-8>>. Acesso em: 18 jun. 2024.

PIAZZON, A.; FORTE, M.; NARDINI, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 19, p. 10677–10683, 2010.

QIN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X.; LIU, J. Development of active and intelligent packaging by incorporating betalains from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel into starch/polyvinyl alcohol films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 100, n. August 2019, p. 105410, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105410>>. Acesso em: 15 mar. 2022.

RADEMACHER, M.; ZINN, M. K.; BEINIO, R.; BOCKMÜHL, D. P. A New Model to Investigate the Effects of Cosmetics on Skin Microorganisms In Vitro. **Cosmetics**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2022.

RAHMAN, M. J.; MALUNGA, L. N.; ESKIN, M.; ECK, P.; THANDAPILLY, S. J.; THIYAM-HOLLANDER, U. Valorization of Heat-Treated Brewers' Spent Grain Through the Identification of Bioactive Phenolics by UPLC-PDA and Evaluation of Their Antioxidant Activities. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. April, p. 1–8, 2021.

RODRÍGUEZ-DAZA, M. C.; PULIDO-MATEOS, E. C.; LUPIEN-MEILLEUR, J.; GUYONNET, D.; DESJARDINS, Y.; ROY, D. Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. June, 2021.

RUAN, S.; TANG, J.; QIN, Y.; WANG, J.; YAN, T.; ZHOU, J.; GAO, D.; XU, E.; LIU,

D. Mechanical force-induced dispersion of starch nanoparticles and nanoemulsion: Size control, dispersion behaviour, and emulsified stability. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 275, n. May 2021, 2022.

SADEGHI, R.; DANIELLA, Z.; UZUN, S.; KOKINI, J. Effects of starch composition and type of non-solvent on the formation of starch nanoparticles and improvement of curcumin stability in aqueous media. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 76, p. 122–130, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2017.05.020>>. Acesso em: 29 ago. 2023.

SHAO, P.; ZHANG, H.; NIU, B.; JIN, W. Physical stabilities of taro starch nanoparticles stabilized Pickering emulsions and the potential application of encapsulated tea polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 2032–2039, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.076>>. Acesso em: 29 ago. 2023.

SILVA, R. N. P. Da; DIAS, J. F.; KOBLITZ, M. G. B. Cervejas: relação entre estilos; compostos fenólicos e capacidade antioxidante. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e42210313471, 2021.

SIN, L. T.; RAHMAN, W. A. W. A.; RAHMAT, A. R.; KHAN, M. I. Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol-cassava starch blends through DSC. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 224–226, 2010.

SPINELLI, S.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Microencapsulation of extracted bioactive compounds from brewer's spent grain to enrich fish-burgers. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 100, p. 450–456, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.09.005>>. Acesso em: 02 dez. 2021.

STOKES, W. S.; CASATI, S.; STRICKLAND, J.; PARIS, M. Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests. **Current Protocols in Toxicology**, [s. l.], n. SUPPL. 36, p. 1–20, 2008.

VAN DE VELDE, F.; MÉNDEZ-GALARRAGA, M. P.; ALBARRACÍN, M.; GARZÓN, A. G.; AQUINO, M.; CIAN, R. E.; VINDEROLA, G.; DRAGO, S. R. Exploring the effects of barley (*Hordeum vulgare* L.) germination on chemical composition, phytic acid, and potential malt prebiotic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 138, n. November 2024, 2025.

WANG, T.; WU, C.; FAN, G.; LI, T.; GONG, H.; CAO, F. Ginkgo biloba extracts-loaded starch nano-spheres: Preparation, characterization, and in vitro release kinetics. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 106, p. 148–157, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.012>>. Acesso em: 30 maio 2023.

WILSON, S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, [s. l.], v. 327, n. November, p. 32–46, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.003>>. Acesso em: 26 fev. 2024.

YASSUE-CORDEIRO, P. H.; ZANDONAI, H.; GENESI, B. P. Development of Chitosan / Silver Sulfadiazine / Zeolite Composite Films for Wound Dressing. [s. l.], 2019.

YE, F.; MIAO, M.; JIANG, B.; CAMPANELLA, O. H.; JIN, Z.; ZHANG, T. Elucidation

of stabilizing oil-in-water Pickering emulsion with different modified maize starch-based nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 229, p. 152–158, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.062>>. Acesso em: 29 ago. 2023.

YU, X.; LIN, L.; MEI, L.; SUN, C.; ZHU, Z.; DU, X.; CHEN, P. Development, characterization, and antioxidant evaluation of corn starch-based composite films containing tea polyphenols. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 139, n. 15, p. 1–12, 2022.

ZAGO, E.; TILLIER, C.; DE LEENER, G.; NANDASIRI, R.; DELPORTE, C.; BERNAERTS, K. V.; SHAVANDI, A. Sustainable production of low molecular weight phenolic compounds from Belgian Brewers' spent grain. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 17, n. December 2021, p. 100964, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100964>>. Acesso em: 26 jun. 2023.

ZHANG, Y.; LI, Y.; REN, X.; ZHANG, X.; WU, Z.; LIU, L. The positive correlation of antioxidant activity and prebiotic effect about oat phenolic compounds. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 402, n. June 2022, p. 134231, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134231>>. Acesso em: 08 maio 2025.

ZHOU, J.; GUO, M.; QIN, Y.; WANG, W.; LV, R.; XU, E.; DING, T.; LIU, D.; WU, Z. Advances in Starch Nanoparticle for Emulsion Stabilization. **Foods**, [s. l.], v. 12, n. 12, 2023.

ZHU, F. Starch based Pickering emulsions: Fabrication, properties, and applications. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 85, n. June 2018, p. 129–137, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.012>>. Acesso em: 29 ago. 2023.

ZUORRO, A.; IANNONE, A.; LAVECCHIA, R. Water-organic solvent extraction of phenolic antioxidants from brewers' spent grain. **Processes**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019.