

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Potencial Antioxidante e Anti-inflamatório do Extrato Nanoencapsulado de
Araçá Vermelho (*Psidium cattleianum*) em Tecido Cerebral e Cultura
Primária de Astrócitos**

Emilly Fiuza Rodrigues

Pelotas, 2025

Emilly Fiuza Rodrigues

**Potencial Antioxidante e Anti-inflamatório do Extrato Nanoencapsulado de
Araçá Vermelho (*Psidium cattleianum*) em Tecido Cerebral e Cultura
Primária de Astrócitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Roselia Maria Spanevello

Coorientador: Nathalia Stark Pedra

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

R696p Rodrigues, Emilly Fiuza

Potencial antioxidante e anti-inflamatório do extrato nanoencapsulado de araçá vermelho (*Psidium cattleianum*) em tecido cerebral e cultura primária de astrócitos [recurso eletrônico] / Emilly Fiuza Rodrigues ; Roselia Maria Spanevello, orientadora ; Nathalia Stark Pedra, coorientadora. — Pelotas, 2025.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Nanocápsulas. 2. Neuroproteção. 3. Fruto. 4. Polifenóis. 5. Astrócitos. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Pedra, Nathalia Stark, coorient. III. Título.

CDD 616.84

Emilly Fiuza Rodrigues

Potencial Antioxidante e Anti-inflamatório do Extrato Nanoencapsulado de
Araçá Vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) em Tecido Cerebral e Cultura
Primária de Astrócitos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre
em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10 de outubro de 2025

Banca examinadora:

Profa. Dra. Roselia Maria Spanevello (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do
Sul

Profa. Dra. Paloma Taborda Birmann
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Jucimara Baldissarelli
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade
Federal do Santa Maria

“Não são as perdas nem as quedas que podem fazer fracassar nossas vidas, senão a falta de coragem para levantar e seguir em frente”.
(Samael Aun Weor)

Resumo

RODRIGUES, Emilly Fiuza. **Potencial Antioxidante e Anti-inflamatório do Extrato Nanoencapsulado de Araçá Vermelho (*Psidium cattleianum*) em Tecido Cerebral e Cultura Primária de Astrócitos**. 2025. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

O araçá vermelho (*Psidium cattleianum*) destaca-se pelo seu elevado teor de compostos fenólicos, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Entretanto, a baixa biodisponibilidade e estabilidade desses compostos podem limitar sua eficácia biológica. A nanotecnologia surge como uma estratégia promissora para potencializar sua eficácia e aplicabilidade terapêutica. Este estudo investigou os efeitos do extrato livre e nanoencapsulado de araçá-vermelho sobre parâmetros oxidativos e inflamatórios em tecido cerebral de ratos e em cultura primária de astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS). As nanocápsulas revestidas com zeína contendo 0%, 30% (100 e 200 µg/mL) e 50% (v/v) (100 e 200 µg/mL) de extrato de *P. cattleianum*, assim como o extrato livre (100 e 200 µg/mL), foram avaliadas em um protocolo de estresse oxidativo *in vitro*, induzido por peróxido de hidrogênio e sulfato ferroso, em tecido cerebral de ratos. No protocolo de cultivo celular, os astrócitos foram tratados com o extrato livre (100 µg/mL) ou nanoencapsulado de 50% (100 µg/mL) por 72 horas e expostos ao LPS por 3 horas. Nestas células, foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo, atividade da acetilcolinesterase (AChE) e níveis de interleucina-10 (IL-10). No modelo *in vitro* de estresse oxidativo, após uma hora de incubação, tanto o extrato livre quanto o nanoencapsulado reduziram os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobartitúrico (TBARS) de forma semelhante. Em relação aos níveis de nitrito, o extrato nanoencapsulado mostrou-se mais eficaz que o extrato livre. Após três horas de incubação, o extrato nanoencapsulado apresentou maior efetividade na redução dos níveis de TBARS em comparação ao extrato livre. Em astrócitos, o LPS reduziu a viabilidade celular e os níveis de IL-10, promoveu dano oxidativo e aumentou a atividade da AChE. Ambos os tratamentos (extrato livre e nanoencapsulado) preveniram essas alterações, sendo que o extrato nanoencapsulado demonstrou maior eficácia na prevenção das alterações da atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), AChE e dos níveis de IL-10. Esses achados evidenciam o potencial antioxidante, anti-inflamatório e glioprotetor do extrato de araçá vermelho, reforçando a nanotecnologia como estratégia promissora para potencializar as atividades biológicas de compostos bioativos no contexto da neuroinflamação.

Palavras-chave: Nanocápsulas; Neuroproteção; Fruto; Polifenóis, Astrócitos, antioxidante

Abstract

RODRIGUES, Emilly Fiuza. **Antioxidant and Anti-inflammatory Potential of the Nanoencapsulated Extract of Red Araca (*Psidium cattleianum*) in Brain Tissue and Primary Astrocyte Culture**. 2025. 72 f. Dissertation (Master's in Biochemistry and Bioprospecting) – Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

Red araca (*Psidium cattleianum*) stands out for its high content of phenolic compounds, which are known for their antioxidant and anti-inflammatory properties. However, the low bioavailability and stability of these compounds may limit their biological effectiveness. Nanotechnology emerges as a promising strategy to enhance their efficacy and therapeutic applicability. This study investigated the effects of the free and nanoencapsulated extracts of red strawberry guava on oxidative and inflammatory parameters in rat brain tissue and in primary astrocyte cultures exposed to lipopolysaccharide (LPS). Zein-coated nanocapsules containing 0%, 30% (100 and 200 µg/mL), and 50% (v/v) (100 and 200 µg/mL) of *P. cattleianum* extract, as well as the free extract (100 and 200 µg/mL), were evaluated in an in vitro oxidative stress protocol induced by hydrogen peroxide and ferrous sulfate in rat brain tissue. In the cell culture protocol, astrocytes were treated with the free extract (100 µg/mL) or the 50% nanoencapsulated extract (100 µg/mL) for 72 hours and exposed to LPS for 3 hours. In these cells, oxidative stress parameters, acetylcholinesterase (AChE) activity, and interleukin-10 (IL-10) levels were assessed. In the in vitro oxidative stress model, after one hour of incubation, both the free and nanoencapsulated extracts similarly reduced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels. Regarding nitrite levels, the nanoencapsulated extract was more effective than the free extract. After three hours of incubation, the nanoencapsulated extract showed greater effectiveness in reducing TBARS levels compared to the free extract. In astrocytes, LPS reduced cell viability and IL-10 levels, promoted oxidative damage, and increased AChE activity. Both treatments (free and nanoencapsulated extracts) prevented these alterations, with the nanoencapsulated extract demonstrating greater effectiveness in preventing changes in catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity, AChE activity, and IL-10 levels. These findings highlight the antioxidant, anti-inflammatory, and glioprotective potential of red strawberry guava extract, reinforcing nanotechnology as a promising strategy to enhance the biological activities of bioactive compounds in the context of neuroinflammation.

Keywords: Nanocapsules; Neuroprotection; Fruit; Polyphenols; Astrocytes; Antioxidant

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1. Potencial bioativo do arará vermelho	13
3.2 Estresse oxidativo	14
3.2.1 Geração de espécies reativas	14
3.3 Mecanismos antioxidantes	17
3.4 Estresse oxidativo e inflamação no SNC	18
3.4.1 Papel da enzima AChE na modulação da neuroinflamação	19
3.4.2 Papel da IL-10 na modulação da neuroinflamação	20
3.5 Nanocápsulas	20
3.5.1Técnica de <i>Electrospraying</i>	21
3.5.2 Zeína.....	22
4. MANUSCRITO	24
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO

O araçá, de nome científico *Psidium cattleianum* Sabine é uma pequena fruta nativa do Brasil. A planta, pertencente à família *Myrtaceae*, é amplamente distribuída desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul e possui capacidade de se adaptar facilmente a diferentes condições climáticas e tipos de solo. O araçá é uma fruta com sabor levemente ácido e adocicado, podendo se apresentar em dois diferentes morfotipos quando maduro, o amarelo e o vermelho. As frutas podem ser consumidas *in natura* ou de forma processada como doces, sucos e chás (Munieweg *et al.*, 2023).

O fruto de *P. cattleianum* é rico em compostos bioativos, incluindo ácido ascórbico, carotenoides e terpenoides (Munieweg *et al.*, 2023), sendo os compostos fenólicos ou polifenóis seus constituintes majoritários. Estes podem ser classificados em três grupos principais: ácidos fenólicos, flavonoides e não flavonoides (Swallah, 2020). Entre os ácidos fenólicos presentes no fruto, destacam-se os ácidos gálico, elágico, vanílico e p-cumárico. No grupo dos flavonóides, encontram-se a quercetina, mirecitina, catequina e kaempferol, enquanto os compostos não flavonoides incluem os taninos, como vescalagina e castalagina (Lacorte *et al.*, 2023; Mallmann, 2020).

A presença desses compostos bioativos tem despertado o interesse da comunidade científica devido aos seus potenciais benefícios à saúde humana. Estudos indicam que esses compostos possuem ação citotóxica contra células cancerígenas, além de apresentarem atividades antifúngica (Munieweg *et al.*, 2023), antimicrobiana (Filho *et al.*, 2022), antidiabética (Cardoso *et al.*, 2023) e, principalmente, antioxidante (Filho *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2020). Os polifenóis, provenientes do metabolismo secundário vegetal, são reconhecidos por sua capacidade de combater diversas doenças, devido à sua ação na prevenção da formação de radicais livres e na neutralização dos danos oxidativos que essas moléculas podem causar (Sharifi-rad *et al.*, 2020; Swallah, 2020).

Durante os processos biológicos naturais, diversos compostos pró-oxidantes são constantemente gerados. O organismo dispõe de um sistema antioxidante endógeno, constituído predominantemente pelas enzimas CAT, SOD, glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GSH), que regulam o

equilíbrio redox, evitando o acúmulo excessivo de espécies reativas (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023). No entanto, quando esse equilíbrio é rompido, ocorre o estresse oxidativo, que pode desencadear danos às células, comprometendo a integridade da membrana plasmática, inativando enzimas essenciais, interferindo na divisão celular e causando danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (Sharifi-rad *et al.*, 2020). Além disso, o estresse oxidativo pode bloquear a geração de energia e favorecer o desenvolvimento de doenças metabólicas e crônicas, incluindo diferentes tipos de câncer, bem como a neuroinflamação (Oliveira *et al.*, 2020; Sharifi-rad *et al.*, 2020; Aminjan *et al.*, 2019).

A elevada atividade metabólica no sistema nervoso central (SNC) torna neurônios, astrócitos e micróglia altamente vulneráveis ao estresse oxidativo (Wróbel-Biedrawa *et al.*, 2022). Os astrócitos exercem funções essenciais, como a modulação das respostas inflamatórias, mas em condições patológicas podem contribuir para a liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios amplificando a neuroinflamação (Zhao *et al.*, 2024; Olufunmilayo, Gerke-Duncan & Holsinger, 2023; Alvez, *et al.*, 2021). Em contrapartida, moduladores anti-inflamatórios, como IL-10 e a acetilcolina (ACh), são fundamentais na regulação da resposta glial, sendo que a enzima AChE constitui um alvo estratégico por controlar a disponibilidade de ACh e, conseqüentemente regular a neuroinflamação (Salkeni, Naing, 2023; Pacheco *et al.*, 2018; Alvez *et al.*, 2021).

O estilo de vida moderno, caracterizado por uma alimentação desequilibrada, sedentarismo, exposição a metais pesados, radiação, aditivos alimentares e poluição ambiental, contribui significativamente para o desenvolvimento do estresse oxidativo (Kostoff *et al.*, 2020). Diante desse cenário, cresce a busca por produtos naturais como alternativas terapêuticas, tanto pelo potencial de promoção da saúde quanto pelo valor econômico associado ao aproveitamento sustentável de recursos vegetais (Lacorte *et al.*, 2023).

Para otimizar a estabilidade, a biodisponibilidade e a bioatividade dos constituintes bioativos extraídos dessas matrizes naturais, a nanotecnologia tem sido aplicada, especialmente por meio do uso de nanocápsulas, estruturas esféricas que carregam em seu núcleo agentes terapêuticos. Essas estruturas microscópicas protegem os compostos ativos da degradação, aumentam sua

solubilidade e permitem uma liberação controlada, maximizando a eficácia dos fitoterápicos (De Oliveira, Araújo, Mosqueira, 2023; Guillén-Meléndez *et al.*, 2023).

Dentro dessa abordagem, o uso de produtos naturais como material encapsulante tem se destacado. Um exemplo é a zeína, principal proteína de armazenamento do milho, que pode ser convertida em nanopartículas por diferentes técnicas, incluindo métodos baseados em eletrofiação e dessolvatação. Essa proteína vegetal é capaz de encapsular moléculas bioativas através de ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas conferindo maior estabilidade aos compostos e simulando sistemas naturais. Tendo em vista que de estudos sobre *P. cattleianum* encapsulado ainda são escassos na literatura, torna-se promissora a aplicação da nanotecnologia neste contexto, permitindo assim, ampliar sua funcionalidade, além de possibilitar novas estratégias para o desenvolvimento de terapias inovadoras e sustentáveis (Gali, Pirozzi, Donsi, 2023).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos *in vitro* do extrato livre e nanoencapsulado de araçá vermelho em parâmetros inflamatórios e oxidantes em córtex cerebral de ratos e em cultura primária de astrócitos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante do extrato livre e nanoencapsulado de araçá vermelho em parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos em um modelo *in vitro* de dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e sulfato ferroso ($FeSO_4$).
- Investigar a citotoxicidade do extrato livre e nanoencapsulado de araçá vermelho em cultura primária de astrócitos expostas ou não ao LPS.
- Avaliar os efeitos do extrato de araçá vermelho livre e nanoencapsulado sobre parâmetros de estresse oxidativo em cultura primária de astrócitos expostas ao LPS.
- Avaliar a atividade da enzima AChE em cultura primária de astrócitos exposta ao LPS e tratadas com extrato livre e nanoencapsulado de araçá vermelho.
- Avaliar os níveis de IL-10 em cultura primária de astrócitos expostas ao LPS e tratadas com extrato livre e nanoencapsulado de araçá vermelho.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Potencial bioativo do araçá vermelho

O araçá é um fruto apresentado na forma de uma pequena baga, pertencente à família *Myrtaceae* (Munieweg *et al.*, 2023). Popularmente, é conhecido por diversos nomes, como araçá, araçá-do-campo, goiaba-morango, goiaba-cereja, goiaba-cattley, araçá-amarelo, araçá-vermelho, araçá-de-comer, araçá-da-praia, araçá-de-coroa e araçá-do-mato (Elsayed *et al.*, 2023; Correia *et al.*, 2022; Rosário *et al.*, 2021).

A família *Myrtaceae* é composta por aproximadamente 121 gêneros e 5.800 espécies (Farias *et al.*, 2020), sendo amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, com predominância significativa na Mata Atlântica. Dentro dessa família, destaca-se o gênero *Psidium*, originário das Américas tropicais e subtropicais abrangendo a espécie *cattleianum* (Correia *et al.*, 2022). A planta encontra-se na forma de árvores ou arbustos, estando amplamente distribuída no território brasileiro, além de ser encontrado no Uruguai (Machado *et al.*, 2023). Possui notável capacidade de adaptação a distintas condições climáticas o que contribui para sua ampla ocorrência geográfica (Munieweg *et al.*, 2023).

Em relação ao cultivo, o araçá é geralmente encontrado em hortas domésticas (Rosário *et al.*, 2021). Esses frutos são caracterizados por seu pequeno tamanho, formato ovoide, polpa translúcida e sabor que varia do doce ao levemente ácido. Cada fruto contém numerosas sementes, que podem variar de 22 a 250 por unidade (Correia *et al.*, 2022). Em seu aspecto morfológico, o epicarpo pode apresentar coloração amarela ou vermelha. Os frutos com epicarpo e endocarpo vermelhos são menos frequentes, sendo que aproximadamente 80% apresentam endocarpo branco ou creme (Machado *et al.*, 2023). Estudos apontam que as variedades vermelhas concentram maiores teores de compostos fenólicos, o que aumenta seu valor nutricional e funcional (Beltrame *et al.*, 2023).

O fruto de *P. cattleianum* é reconhecido por sua riqueza em compostos bioativos. Estudos já demonstraram que o extrato do araçá vermelho apresenta concentrações expressivas de quercetina e ácido elágico (Pereira *et al.*, 2020).

Além disso, em menores quantidades, são encontrados os ácidos fenólicos gálico, vanílico e p-cumárico, os flavonoides miricetina, catequina e kaempferol, bem como as antocianinas cianidina, malvidina e delphinidina (Mallmann *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2020). O elevado potencial bioativo desses compostos fenólicos deve-se, principalmente, à presença de grupos hidroxila em suas estruturas químicas, os quais contribuem para a estabilização de radicais livres (Zandoná *et al.*, 2020). Os polifenóis, metabólitos originados das rotas biossintéticas do chiquimato e/ou acetato-malonato, apresentam notável diversidade estrutural e estão amplamente presentes em alimentos de origem vegetal (Gentile *et al.*, 2023).

Apesar do seu expressivo potencial fitoquímico, o araçá ainda é uma espécie vegetal pouco explorada cientificamente. No entanto, seus frutos têm ganhado destaque devido à abundância de compostos fenólicos com comprovadas atividades anti-inflamatórias, citotóxicas, antiproliferativas e neuroprotetoras (Filho *et al.*, 2022; Wróbel-Biedrawa *et al.*, 2022). Além disso, o consumo do araçá tem sido associado à prevenção de síndrome metabólica (Oliveira *et al.*, 2018), bem como à sua elevada capacidade antioxidante (Cardoso *et al.*, 2023; Machado *et al.*, 2023; Pereira *et al.*, 2020).

3.2 Estresse oxidativo

3.2.1 Geração de espécies reativas

O estresse oxidativo é o resultado de um acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Essa condição surge devido a um desequilíbrio entre a geração dessas espécies reativas e a capacidade do sistema antioxidante celular em neutralizá-las (Nishimura *et al.*, 2021).

A propensão do oxigênio a participar de reações que levam à formação de radicais livres está relacionada à sua configuração eletrônica, que inclui dois elétrons desemparelhados em sua camada mais externa. Essa característica o torna apto a aceitar elétrons de outras moléculas, oxidando-as enquanto é simultaneamente reduzido (Teleanu *et al.*, 2022; Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023). Dentre as principais EROs destacam-se o oxigênio singlete (O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e o H_2O_2 , uma ERO não radicalar (Tabela 1) (Haider, Jaskani, Fang, 2021).

Embora exerçam funções fundamentais na fisiologia celular, como a regulação da homeostase por meio da sinalização redox, a defesa contra patógenos, facilitação do dobramento proteico e a produção de adenosina trifosfato (ATP), o excesso de EROs pode danificar as estruturas celulares, como DNA, ácido ribonucleico (RNA), proteínas e lipídios. Esses danos estabelecem o quadro de estresse oxidativo, caracterizado pela falência dos mecanismos reguladores que normalmente mantêm o equilíbrio entre processos oxidativos e antioxidantes (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023; Nishimura *et al.*, 2021).

A principal fonte de espécies reativas são as mitocôndrias, uma vez que a maioria dos radicais livres são formados como subproduto das reações da cadeia de transporte de elétrons. Esse sistema é responsável pela geração de ATP por meio da fosforilação oxidativa, processo que envolve uma série coordenada de reações de transferência de elétrons, durante as quais ocorre a produção de EROs (Ionescu-Tucker, Cotman, 2021; Nolfi-Donagan, Braganza, Shiva, 2020).

A fosforilação oxidativa se dá através da passagem de elétrons por cinco complexos (I a V), localizados na membrana mitocondrial interna. Os complexos I e II iniciam o processo ao oxidar NADH em NAD^+ e FADH_2 em FAD^+ , respectivamente. Os elétrons são então transferidos para o complexo III por meio da coenzima Q, e posteriormente para o citocromo c (Nishimura *et al.*, 2021). Uma vez que é reduzido, o citocromo c transporta elétrons do Complexo III para o Complexo IV. No complexo IV, encontram-se grupos heme e átomos de cobre, onde o oxigênio molecular se liga recebendo quatro elétrons e é então, reduzido à duas moléculas de água. Durante esse processo, os complexos I, III e IV bombeiam prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, estabelecendo um gradiente eletroquímico. O complexo V (ATP sintase) utiliza esse gradiente para sintetizar ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Nolfi-Donagan, Braganza, Shiva, 2020; Nishimura *et al.*, 2021). A formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ocorrer como subproduto do transporte eletrônico, envolvendo o vazamento de elétrons individuais dos complexos I, II e III da cadeia, levando à redução parcial do oxigênio molecular podendo, portanto, gerar a produção anormal de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e posteriormente, H_2O_2 e $\text{OH}^{\bullet}$, contribuindo

diretamente para o estresse oxidativo (Ionescu-Tucker, Cotman, 2021; Nishimura *et al.*, 2021; Nolfi-Donagan, Braganza, Shiva, 2020).

Os radicais $O_2^{\bullet-}$ reagem com outro radical superóxido em uma reação de dismutação, na qual um radical é oxidado a O_2 enquanto o outro é reduzido a H_2O_2 (Tvrdá, Benko, 2020). Pode ainda, ser gerado através de processos enzimáticos mediados por enzimas como NADPH oxidase, xantina oxidase e peroxidases (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023). O H_2O_2 , por sua vez, é produzido por várias oxidases, incluindo D-aminoácidos oxidases e a própria xantina oxidase. Frequentemente a partir do H_2O_2 é gerado $OH^{\bullet}$ na presença de íons metálicos, particularmente o Fe^{2+} , que atua como catalisador na reação de Fenton. O $OH^{\bullet}$ também pode ser formado pela reação de Haber Weiss, que compreende interações entre $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Esse radical livre é considerado o mais reativo em sistemas biológicos (Tvrdá, Benko, 2020).

Tabela 1. Principais espécies reativas de oxigênio.

Espécie	Reação Bioquímica
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Formado pela redução univalente do oxigênio molecular: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Formado pela dismutação do superóxido: $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Radical hidroxila ($OH^{\bullet}$)	Formado na reação de Fenton: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$ e na reação de Harber-Weiss: $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH^{\bullet} + O_2$

Fonte: Adaptado de Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023.

Além dos processos endógenos que impulsionam o estresse oxidativo, também podem ocorrer mecanismos responsáveis pela geração de radicais livres. Nesses processos, moléculas de oxigênio reagem com compostos orgânicos em resposta à exposição das células a fatores exógenos, como

xenobióticos, radiação ionizante, infecções virais e bacterianas, dieta inadequada, consumo de álcool e tabagismo (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023).

3.3 Mecanismos antioxidantes

Uma barreira antioxidante apropriada é necessária para limitar a concentração de espécies reativas a um nível fisiológico. Sendo assim, as enzimas antioxidantes atuam convertendo as EROs em espécies mais estáveis, representando um importante mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, bem como está ilustrado na Figura 1. Esse sistema é composto majoritariamente pelas enzimas SOD, CAT e GPx (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023).

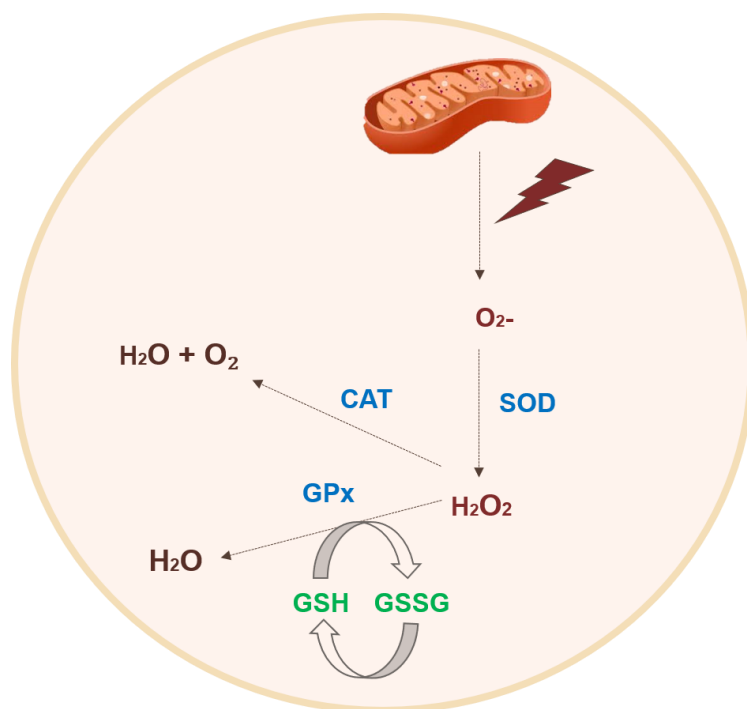


Figura 1. Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx.
Fonte: Autoria própria.

A SOD atua na defesa do organismo contra agentes oxidantes biológicos. Essa enzima contém metais de transição e está presente em todos os organismos que dependem de oxigênio. Sua função consiste em converter duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , contribuindo para a manutenção do equilíbrio redox celular (Jomova *et al.*, 2024).

A CAT exerce predominantemente uma atividade catalítica através da dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Além disso, pode decompor peroxinitrito (ONOO^-), oxidar óxido nítrico (NO) em dióxido de nitrogênio (NO_2) e metabolizar espécies reativas de sulfeto (Glorieux, Calderón, 2024). A GPx é uma família de enzimas antioxidantes que apresenta diferentes isoformas, ela atua em conjunto com a SOD e a CAT para formar a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo. A GPx catalisa a redução de hidroperóxidos, como o H_2O_2 , em H_2O por meio da oxidação da GSH em sua forma oxidada (GSSH) (Jomova *et al.*, 2024).

O sistema antioxidante pode ser ainda, não enzimático incluindo substâncias como a GSH, vitaminas A, E e C, tioredoxina (Trx), flavonoides, proteínas como a albumina, ceruloplasmina e metalotioneína e oligoelementos. Estes, exercem influência direta no sequestro das EROs reduzindo assim seus efeitos deletérios (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023).

3.4 Estresse oxidativo e inflamação no SNC

O SNC é formado por milhões de neurônios e células gliais conectados entre si, compondo uma rede complexa que está em constante atividade, desempenhando um papel fundamental na regulação das funções do organismo. O comprometimento da integridade funcional dos neurônios e células gliais está relacionado ao surgimento de várias doenças neurológicas (Gentile *et al.*, 2023).

O estresse oxidativo é amplamente reconhecido como um dos principais mecanismos associados à neurodegeneração, podendo afetar funções como memória, aprendizagem e cognição. Esses danos estão relacionados com o acúmulo de EROs, disfunção mitocondrial e ativação de processos inflamatórios (Gentile *et al.*, 2023; Nishimura *et al.*, 2021;). O tecido cerebral é altamente susceptível ao dano oxidativo pois apresenta elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados propensos à peroxidação lipídica, à abundância de íons metálicos pró-oxidativos e à capacidade limitada dos sistemas antioxidantes enzimáticos (Wróbel-Biedrawa *et al.*, 2022).

O SNC possui alta demanda energética, o que exige intensa atividade mitocondrial devido a sua elevada taxa metabólica. Isso torna neurônios, astrócitos e micróglia mais suscetíveis à produção excessiva de EROs. Os

astrócitos são células gliais importantes em processos relacionados ao desenvolvimento cerebral, manutenção, modulação da transmissão sináptica, suporte trófico para neurônios e oligodendrócitos e defesa contra lesões. Ainda, desempenham um papel essencial na imunidade inata e nas respostas inflamatórias do SNC (Zhao *et al.*, 2024; Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023; Alvez, *et al.*, 2021).

3.4.1 Papel da enzima AChE na modulação da neuroinflamação

Um dos mecanismos investigados nas últimas décadas para o controle da neuroinflamação é a sinalização mediada pela ACh. Esse neurotransmissor, liberado por neurônios colinérgicos, exerce suas funções por meio da ativação de receptores muscarínicos e nicotínicos, modulando processos neuronais e imunológicos no SNC. A enzima AChE desempenha um papel essencial na neurotransmissão colinérgica, sendo responsável pela rápida hidrólise do neurotransmissor ACh. Alterações na atividade dessa enzima estão associadas a diversas condições patológicas, como doença de Alzheimer, onde a inibição da AChE é uma estratégia terapêutica para aumentar os níveis de ACh e melhorar a função cognitiva (Ferreira, Vieira *et al.*, 2016).

Os receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChRs) são expressos em astrócitos, e evidências da literatura indicam que sua ativação reduz a secreção de citocinas inflamatórias induzida pelo LPS por meio da inibição da via de sinalização do NF- κ B (Patel *et al.*, 2017). Além disso, a ativação desses receptores aumenta a expressão de Nrf2, apontando para um potencial efeito antioxidante do $\alpha 7$ nAChR em astrócitos (Patel *et al.*, 2017). Esses achados sugerem que a ativação do $\alpha 7$ nAChR em astrócitos pode exercer um papel neuroprotetor, atenuando a inflamação e o estresse oxidativo.

Em consonância, dados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que astrócitos expostos ao LPS apresentaram um aumento na atividade da AChE, associado a maior dano oxidativo e elevação nos níveis de citocinas inflamatórias (Lopez *et al.*, 2021). Esse aumento da atividade da AChE pode reduzir a disponibilidade de ACh contribuindo para o agravamento do estresse oxidativo e da resposta inflamatória destacando assim o papel crucial desta enzima no contexto da neuroinflamação.

Complementando esses achados, Oliveira e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com extrato de arará vermelho em um modelo *in vivo* de síndrome metabólica preveniu o aumento da atividade da AChE, evidenciando suas propriedades neuroprotetoras. Assim, a investigação de compostos capazes de modular esses mecanismos surge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas neuroprotetoras.

3.4.2 Papel da IL-10 na modulação da neuroinflamação

A IL-10 é uma citocina imunossupressora sendo considerada um modulador anti-inflamatório da ativação glial (Salkeni, Naing, 2023). Essa citocina é capaz de inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ , contribuindo para o controle da neuroinflamação excessiva e a prevenção de danos neuronais (Porro *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo pode ativar vias inflamatórias em astrócitos, estimulando a liberação de mediadores inflamatórios. Como astrócitos e microglia mantêm comunicação constante, as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos astrócitos podem ativar a microglia, propagando o estado neuroinflamatório (Olufunmilayo, Gerke-Duncan, Holsinger, 2023).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de frutos vermelhos, em que foram capazes de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias e reestabelecer o equilíbrio redox celular tanto em tecido cerebral quanto em culturas primárias de astrócitos (De Mello *et al.*, 2023; Spohr *et al.*, 2023; Pacheco *et al.*, 2018;). Ainda, no estudo de Alami e colaboradores (2023) foi reportado que os polifenóis da romã exercem efeitos no combate à inflamação induzida por A β 1-42, evidenciado por um aumento na expressão da IL-10 em astrócitos humanos U373-MG.

3.5 Nanocápsulas

A nanotecnologia tem sido consolidada como uma estratégia para aprimorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de compostos bioativos. Neste contexto, destaca-se a nanoencapsulação, técnica na qual substâncias ativas são envoltas por uma matriz formada por um material

secundário, resultando na formação de nanoestruturas com diâmetro entre 1 nm e 1000 nm. Essa redução de escala aumenta significativamente a relação superfície-volume, favorecendo a interação com o meio biológico e, como consequência, promovendo maior absorção e eficácia terapêutica (Grabska-Kobylecka *et al.*, 2023).

As nanopartículas apresentam propriedades que favorecem seu desempenho farmacológico em relação a moléculas maiores. Por essa razão, diversas pesquisas têm se concentrado na modificação de parâmetros como tamanho, forma, área superficial e composição química dessas partículas, com o objetivo de potencializar suas aplicações médicas (Yusuf *et al.*, 2023).

Diversos sistemas de liberação em nanoescala têm sido utilizados para encapsular moléculas (Luduvico *et al.*, 2024) e extratos (de Oliveira *et al.*, 2021; Feridoni, Shurmasti, 2020) incluindo nanocápsulas, nanoesferas, micelas, ciclodextrinas, nanopartículas lipídicas sólidas e lipossomas. Esses sistemas oferecem proteção contra degradação enzimática e condições adversas no trato gastrointestinal, além de permitirem o controle da liberação de sua carga no local de absorção, o que pode reduzir efeitos tóxicos em órgãos periféricos e preservar a atividade biológica do composto encapsulado (Grabska-Kobylecka *et al.*, 2023).

3.5.1 Técnica de *Electrospraying*

Entre os métodos de encapsulamento está a técnica de *electrospraying*, também conhecida como eletropulverização ou atomização eletrohidrodinâmica, que consiste na utilização de força eletrostática para a obtenção de micro e nanoestruturas (Tanhaei *et al.*, 2021). No processo eletrohidrodinâmico, o fluido é impulsionado com vazão controlada através de um capilar condutor, sobre o qual se aplica uma alta tensão. Essa aplicação promove forças eletrostáticas repulsivas no interior do fluido. Quando tais forças excedem a tensão superficial do fluido, um jato eletricamente carregado é emitido na direção de um eletrodo coletor, normalmente aterrado. Durante o percurso até o coletor, o solvente se volatiliza rapidamente devido à alta razão superfície/volume, além da influência das forças repulsivas, o que culmina na

formação e deposição de material seco sobre o coletor (Gómez-Mascaraquea, Lopez-Rubio, 2019). Esse mecanismo encontra-se representado na Figura 1.

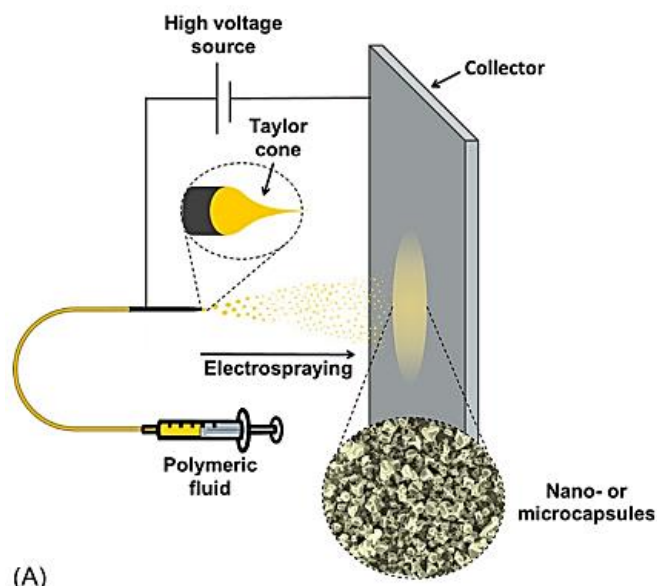


Figura 2. Representação do processo de *electrospraying*. Fonte: Adaptado de Gómez-Mascaraquea, Lopez-Rubio, 2019.

A morfologia, tamanho da partícula, viscosidade e densidade do material formado, bem como alta condutividade elétrica para a formação estável do jato depende dos parâmetros operacionais como voltagem, fluxo e distância do coletor. Assim, a técnica permite a obtenção de nanopartículas como matrizes que fornecem proteção potencial á fármacos, contra fatores ambientais (Campos *et al.*, 2023).

3.5.2 Zeína

A zeína é uma proteína vegetal extraída do milho (*Zea mays L.*), pertencente ao grupo das prolaminas que são insolúveis em meio aquoso, sua principal composição é de ácido glutâmico, leucina, prolina e alanina, com uma quantidade relativamente alta de aminoácidos apolares (Campos *et al.*, 2023). Essa proteína tem se mostrado promissora para a síntese de nanopartículas

devido às suas propriedades, incluindo reprodutibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de fixar fármacos e ligantes hidrofóbicos e hidrofílicos em sua superfície, em comparação com outras nanopartículas proteicas (Campos *et al.*, 2023). As propriedades únicas do polímero de zeína permitiram o encapsulamento de diferentes bioativos, incluindo luteína (Li *et al.*, 2020), quercetina (Camióñ *et al.*, 2023), ácido tânico (Simões *et al.*, 2024) e ácido gálico (Xu, Wei, Xue, 2023).

O interesse pela zeína deve-se ainda, à sua solubilidade em etanol, um solvente com características físico-químicas mais adequadas ao processamento eletro-hidrodinâmico em comparação à água. O etanol apresenta menor condutividade elétrica, tensão superficial e ponto de ebulição, fatores que favorecem a formação de partículas uniformes e facilitam a evaporação do solvente, além de ser permitido para aplicações alimentícias (Gómez-Mascaraquea, Lopez-Rubio, 2019). Além disso, as nanopartículas à base de proteínas são importantes na nanotecnologia porque esses nanocarreadores são biodegradáveis, não antigênicos e metabolizáveis, além de apresentarem diversas possibilidades de funcionalização e modificação de superfície para fixação covalente de fármacos (Campos *et al.*, 2023).

O potencial antioxidante de formulações baseadas em nanotecnologia utilizando o polímero zeína é evidenciado no estudo de Zou e colaboradores (2021) onde foi produzido nanopartículas de zeína contendo quercetina. Em comparação com a quercetina livre, observou-se *in vitro* um maior potencial antioxidante e uma redução na produção de espécies reativas de oxigênio intracelular pela linhagem celular de hepatoblastoma com a quercetina encapsulada. Ademais, Tavares e colaboradores (2021) encapsularam o ácido elágico em nanopartículas de zeína e demonstraram que o ácido elágico apresenta uma alta e imediata atividade antioxidante enquanto as nanopartículas de zeína carregadas com ácido elágico, uma atividade antioxidante sustentada. Ainda, o encapsulamento de nanopartículas de zeína apresenta alta eficiência de encapsulamento, boa retenção e distribuição das moléculas, ação potencializada e proteção contra degradação no sistema digestivo (Campos *et al.*, 2023).

4. MANUSCRITO

Os resultados apresentados nesta dissertação estão estruturados na forma de manuscrito científico de acordo com as normas da revista *BioNanoScience* (fator de impacto 3.2).

**Nanoencapsulation potentiates the antioxidant and anti-inflammatory effects of
Psidium cattleianum extract in primary astrocyte cultures exposed to
lipopolysaccharide**

Emilly Fiuza Rodrigues^a, Larissa Menezes da Silveira^b, Mayara Sandrielly Soares de Aguiar^a, Julia Eisenhardt de Mello^a, Francieli Moro Stefanello^b, Cristina Jansen Alves^c, Elessandra da Rosa Zaverze^c, Nathalia Stark Pedra^a, Roselia Maria Spanevello^{a*}

^aLaboratory of Neurochemistry, Inflammation and Cancer, Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

^bBiomarkers Laboratory, Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

^cLaboratory of Biopolymers and Nanotechnology in Food (BioNano), Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

* Corresponding author

Roselia Maria Spanevello – Email: rspanevello@gmail.com

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos/Bioquímica, Prédio 29, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n, CEP 9601090, Caixa Postal 354, Pelotas, RS, Brazil

Phone: +55 53 32757355

Abstract

Psidium cattleianum is a fruit rich in phenolic compounds, recognized for its antioxidant and anti-inflammatory properties, which provide significant therapeutic potential in conditions associated with oxidative stress and inflammation in the central nervous system (CNS). In this context, astrocytes play a central role in neuroinflammation, modulating the immune response in the CNS through the release of cytokines and free radicals, which can contribute to both neuroprotection and neuronal damage. However, the limited bioavailability and stability of the phenolic compounds from *P. cattleianum* may reduce their biological efficacy. This study evaluated the effects of free and nanoencapsulated of *P. cattleianum* extract on oxidative and inflammatory parameters in rat brain tissue and in primary astrocyte cultures exposed to lipopolysaccharide (LPS). The nanocapsules, coated with zein and containing 0%, 30% (100 and 200 µg/mL), and 50% (v/v) (100 and 200 µg/mL) of hydroalcoholic extract, as well as the free extract (100 and 200 µg/mL), were tested in *in vitro* oxidative stress protocols induced by hydrogen peroxide and ferrous sulfate. In the cell culture experiments, astrocytes were treated with free extract (100 µg/mL) or 50% nanoencapsulated extract (100 µg/mL) for 72 hours and exposed to LPS for 3 hours. In these cells, oxidative stress parameters, acetylcholinesterase (AChE) activity, and interleukin-10 (IL-10) levels were assessed. In the *in vitro* oxidative stress protocol, after one hour of incubation, both free and nanoencapsulated extracts reduced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels similarly. Regarding nitrite levels, the nanoencapsulated extract proved more effective than the free extract. After three hours of incubation, the nanoencapsulated extract showed greater effectiveness in reducing TBARS levels compared with the free extract (200 µg/mL). LPS exposure reduced astrocyte viability and IL-10 levels, induced oxidative damage, and increased AChE activity. Both the free and nanoencapsulated extracts were able to prevent these alterations; however, the nanoencapsulated extract demonstrated greater efficacy in preventing changes in catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity, AChE activity, and IL-10 levels. These findings highlight the glioprotective potential of the *P. cattleianum* extract, reinforcing nanotechnology as a promising strategy to enhance the biological activity of bioactive compounds in the context of neuroinflammation.

Keywords: Nanocapsules; Nanoencapsulation; Neuroprotection; Fruit; Polyphenols, astrocytes

1. Introduction

Psidium cattleianum is a fruit rich in phenolic compounds with well-documented biological activities, including anti-inflammatory, neuroprotective, and antioxidant effects [1,2,3,4], as well as anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic properties [1]. Although the free extract exhibits notable effects, its limited solubility, stability, and bioavailability can restrict efficacy. Incorporating these compounds into nanostructured delivery systems provides an effective strategy to enhance their stability, absorption and potentially biological activities [5].

Among the available techniques, nanoencapsulation via electrospraying stands out for producing stable nanoparticles suitable for food and pharmaceutical applications [6,7]. Zein, a plant protein extracted from corn, has proven to be a versatile nanocarrier due to its biocompatibility, high encapsulation efficiency, stability, protection against degradation in the digestive tract, and potential for the controlled release of bioactive compounds [8].

In the brain context, astrocytes are the most abundant glial cells in central nervous system (CNS) and play a critical role in maintaining brain homeostasis [9]. They contribute to neuronal protection by providing antioxidant support primarily through the regulation of the Nrf2 pathway, which controls the expression of numerous antioxidant genes [10]. Beyond these physiological functions, astrocytes are also key modulators of neuroinflammation. Following CNS injury, they become activated and release a variety of molecules, including reactive species and cytokines, which can either exacerbate or mitigate inflammatory responses [11].

Oxidative stress is closely linked to neuroinflammation and plays a central role in the onset and progression of neurodegenerative disorders [12,13]. It arises from an imbalance between the production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and the capacity of antioxidant defenses to neutralize them [12]. Major ROS, including singlet oxygen, superoxide anion, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide, can cause significant damage to brain tissue when present in excess [14]. Under pathological conditions, oxidative stress activates inflammatory pathways, promoting the release of pro-inflammatory cytokines. This process triggers astrogliosis and amplifies neuroinflammation through astrocyte–microglia interactions [15,16]. Conversely, anti-inflammatory modulators such as IL-10 and acetylcholine (ACh) play a fundamental role in regulating the glial response. The enzyme AChE is a strategic therapeutic target

because it regulates the availability of ACh and, consequently, modulates neuroinflammatory processes [17].

Thus, the aim of the present study was to investigate the effects of hydroalcoholic *P. cattleianum* extract, in both free and nanoencapsulated forms, on cell viability, oxidative stress parameters, AChE activity, and IL-10 levels in primary astrocyte cultures exposed to the LPS, a potent inducer of inflammation. Additionally, we also evaluated the effects of both free and nanoencapsulated extract on brain tissue homogenates in an *in vitro* oxidative stress model induced by hydrogen peroxide and ferrous sulfate.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

LPS from *Escherichia coli* (O127:B8), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium bicarbonate (NaHCO_3), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sulforhodamine B (SRB), Coomassie Brilliant Blue G, and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide were purchased from Synth® (Brazil). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fungizone, penicillin/streptomycin, 0.5% trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade.

2.2 *P. cattleianum* extract

P. cattleianum fruits were obtained from Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA) in Pelotas, RS, Brazil (31° 40' 50.6" S; 52° 26' 23.1" W). After collection, the fruits were stored at -20 °C, protected from light, until use. The *P. cattleianum* extract was prepared following Bordignon et al. [18]. Briefly, 30 g of chopped fruit were macerated with 1 L of 70% ethanol (pH 1.0) and sonicated for 30 min at 25 °C. The mixture was filtered, and the extraction was repeated four times on the residue with fresh ethanol. The combined filtrate was adjusted to pH 4.0 and stored at -20 °C in the dark. Afterwards, the extract was concentrated via rotary evaporation at 37 °C with gradual adjustment of rotation speed (60–100 rpm) and pressure (165–110 bar) until dripping ceased. The resulting extract was then stored at -80 °C, protected from light, until lyophilization. The phytochemical composition of the *P. cattleianum* extract

was previously characterized by our research group. The total phenolic content was 16.72 ± 0.26 mg/g of dried extract, while the total flavonoid content was 15.24 ± 2.09 mg/g. The extract contained 2.48 ± 0.09 mg/g of anthocyanins, with cyanidin-3-O-glucoside identified as major component [1].

2.3 *P. cattleianum* nanocapsules

For nanocapsule preparation, the hydroalcoholic extract was first lyophilized without prior rotary evaporation. A 9% (v/v) zein solution was then prepared in 70% ethanol under continuous stirring. Polymeric mixtures containing the crude extract and zein solution were formulated in the following volume ratios: 0/100 (empty zein nanocapsules), 30/70 (30% extract), and 50/50 (50% extract), following Radünz et al. [19]. Electrospraying was performed in a horizontal chamber equipped with a high-voltage power supply, infusion pump, and metallic collector. The process was conducted at ~ 18 °C and $\sim 40\%$ relative humidity, using a flow rate of 1 mL/h, a 10 cm distance between the needle and collector, +16 kV at the needle tip, and -8 kV at the collector. A 1 mL syringe with a 0.45 mm needle was employed, yielding the final product as a fine powder. The analysis of the average diameter showed sizes within the nanometric range, with the following values: empty nanocapsule: 760 nm; 30% *P. cattleianum* nanocapsule: 480 nm; 50% *P. cattleianum* nanocapsule: 320 nm. Encapsulation efficiency (50% extract – 87.0%).

2.4 Animals

Neonatal (1–2 days old) and adult (60 days old) male Wistar rats were used in this study. All animals were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas and housed under a controlled temperature (22 ± 2 °C) with a standard 12 h light/dark cycle. All experimental procedures were approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee of the Federal University of Pelotas (protocol CEUA 035420/2022-89) and conducted in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research (DCBA) and the standards of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

2.5 *In vitro* antioxidant potential of free and nanoencapsulated *P. cattleianum* extract in brain tissue

In this experimental protocol, five adult male rats were used. The animals were previously anesthetized using isoflurane and euthanized. The brains were carefully removed and the cerebellum was discarded, and the remaining brain tissue was homogenized in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) supplemented with KCl (140 mM). The homogenates were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4 °C, and the resulting supernatant was used for oxidative stress analyses, as described by De Mello *et al.* [20] with minor modifications. To induce oxidative stress *in vitro*, 20 µL of hydrogen peroxide (H₂O₂, 5 mM) and 10 µL of ferrous sulfate (FeSO₄, 20 µM) were added to 440 µL of brain tissue homogenate. For antioxidant potential assessment, 25 µL of free and nanoencapsulated extract solutions (100 and 200 µg/mL; 30% and 50%, respectively), 25 µL of empty zein nanocapsules (200 µg/mL), and 30 µL of ascorbic acid (AA, 0.1 mol/L, diluted in DMSO) were tested. Samples were incubated at 37 °C for 1 and 3 hours. Ascorbic acid was used as the standard antioxidant. The experimental conditions were defined as follows: Control (C), homogenates not exposed to H₂O₂ + FeSO₄; Induced Control (IC), homogenates exposed to H₂O₂ + FeSO₄, AA, extract free or extract nanocapsules and zein nanocapsules. After the time of 1 and 3 hours the incubation, the samples were used to evaluate the levels of TBARS and nitrites. Protein concentration in the samples was determined according to the method of Lowry *et al.* [21], using bovine serum albumin as the standard.

2.6 Evaluation of free and nanoencapsulated *P. cattleianum* extract in astrocytes culture exposed to LPS

2.6.1 Primary astrocyte culture

Primary astrocyte cultures were prepared as described by Gottfried *et al.* [22]. Neonatal Wistar rats were euthanized, after which the encephalon was removed and the cerebral cortex dissected. Cortical tissue was mechanically dissociated by pipetting in a balanced saline solution (pH 7.4) containing calcium and magnesium to obtain a cell suspension. The suspension was centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and the pellet was resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, pH 7.6) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were seeded into 6- and 96-well plates previously

coated with poly-L-lysine. Four hours after plating, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and fresh medium was added. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 20 days, allowing cell confluence and maturation, with medium replaced every 4 days. All procedures were performed in three independent experiments (n = 3).

2.6.2 Astrocyte exposure to LPS and treatment with free and nanoencapsulated *P. cattleianum* extracts

P. cattleianum extracts, in both free and nanoencapsulated (50%) forms, as well as zein, were initially dissolved in DMSO (10 mg/mL) and subsequently diluted in DMEM supplemented with 10% FBS to achieve final concentrations of 50, 100, and/or 200 µg/mL [23]. To assess their potential in preventing neuroinflammation, primary astrocyte cultures were pretreated with either the free or nanoencapsulated extracts, or with zein. After 72 h of exposure, cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) for 3 h to induce the inflammatory response [23,24,25]. Control cells received only DMSO (0.05%).

In this culture, cell viability as well as oxidative and inflammatory parameters were evaluated. For biochemical analyses, cell cultures were carefully washed twice with sterile water to remove residual medium. Cellular lysates were then prepared manually using a cell scraper and centrifuged at 1000 rpm for 10 min [26]. The resulting pellet was discarded, and the supernatant was collected for the determination of AChE activity, oxidative stress markers, and IL-10 levels. Protein concentration in the samples was determined according to the method of Lowry *et al.* [21], using bovine serum albumin as the standard.

2.6.3 Cell viability assay

Cell viability was assessed using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay, which evaluates cellular metabolic activity through the reduction of the MTT salt to formazan crystals, catalyzed by mitochondrial dehydrogenase enzymes [27]. For this purpose, the cultures were first washed with CMF and then incubated with an MTT solution (0.5 mg/mL per well) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 90 minutes. After this period, the medium was carefully removed, and the formed formazan crystals were solubilized in DMSO. The

optical density (OD) was measured at a wavelength of 492 nm using a microplate reader. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Cell viability was expressed relative to the control group according to the following equation: Cell viability (%) = (OD of treated cells / OD of control) $\times$ 100.

2.6.4 AChE Activity

AChE activity in primary astrocyte cultures was evaluated using the spectrophotometric as previously described [26]. The assay is based on the reaction that produces the yellow (DTNB anion, with its formation monitored by measuring absorbance at 412 nm every 30 seconds over a period of 2 minutes at 27 °C. Results were expressed as μ mol of AcSCh/h/mg of protein.

2.6.5 Determination of IL-10 levels

IL-10 levels were assessed in the cell culture supernatant using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. IL-10 concentration was determined according to the manufacturer's instructions and expressed in pg/mL.

2.6.6 Evaluation of oxidative stress parameters

In brain tissues and cells culture were evaluated oxidative stress parameters. The levels of TBARS were evaluated following the protocol described by Esterbauer and Cheeseman [28]. Samples supernatant were mixed with trichloroacetic acid (10 %) followed by centrifugation. The supernatant was collected and mixed with thiobarbituric acid (TBA) (0.67%) and incubated at 100°C for 30 min. TBARS levels were determined by absorbance at 535 nm. The results were expressed as nmol TBARS/mg protein.

Nitrite levels were quantified using the method of Stuehr and Nathan [29], in which nitrite in an acidic medium reacts with sulfanilamide to form a diazo intermediate, which subsequently reacts with N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) to produce a red-colored compound. Absorbance was measured at 540 nm, and nitrite concentrations were determined using a sodium nitrite standard curve, with results expressed as μ M nitrite/ mg of protein. Total thiol (SH) content was determined following the method of Aksenov and Markesbery [30], based on the reaction of thiols DTNB, forming 1,3,5-trinitrobenzene (TNB), and results were reported as nmol TNB/mg protein.

SOD activity was determined according to the method described by Misra and Fridovich [31], which assesses the inhibition of adrenaline auto-oxidation in an alkaline,

superoxide-dependent medium. Results were expressed as SOD units/ mg of protein. CAT activity was measured following the method of Aebi [32], based on the decomposition of H_2O_2 in the samples. Absorbance was recorded at 240 nm, and results are reported as CAT units/mg of protein.

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with GraphPad Prism 8 software (Prism GraphPad Software, San Diego, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Measured values are presented as mean $\pm$ SEM.

3. Results

3.1 Free and encapsulated *P. cattleianum* extracts in brain tissue exposed to oxidant medium *in vitro*

Brain samples exposed to H_2O_2 combined with FeSO_4 by 1 hour showed a significant increase in TBARS levels (TBARS/mg/protein) (CI group: 17.01 ± 1.793 ; $P < 0.0001$) compared to the control (8.154 ± 0.532). The extract free in both concentrations 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ (9.754 ± 0.938 and 10.14 ± 0.908 respectively; $P < 0.0001$) and nanoencapsulated (7.152 ± 0.184 and 7.316 ± 0.1552 for 30% respectively; 7.216 ± 0.338 and 7.264 ± 0.197 for 50%; $P < 0.0001$) prevented the increase in TBARS levels when compared to CI group. The results were similar to antioxidant standard AA (5.952 ± 0.342). Additionally, zein also prevented the TBARS levels (7.990 ± 0.354 ; $P < 0.0001$) (Figure 1A).

Similarly, nitrite levels (μM nitrite/mg/protein) were also increased in cerebral tissue exposed to H_2O_2 combined with FeSO_4 (6.925 ± 0.4846) when compared to control (4.314 ± 0.3091 $P < 0.0004$). Only free extract in the concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$ was capable to prevent this alteration ($P < 0.0001$). Nanoencapsulated (100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) extract also prevent the increase in nitrite levels (3.769 ± 0.1073 ; 3.260 ± 0.3773 μM for 30% in their respective concentrations; 4.062 ± 0.3213 μM and 3.526 ± 0.2719 μM for 50% in their respective concentrations $P < 0.0001$) when compared to CI. Similar effect was obtained when zein was used (4.070 ± 0.1696 μM $P < 0.0001$) (Figure 1B). The effects of free and nanoencapsulated were similar the AA (3.699 ± 0.2374).

Analysis of SH content, expressed in TNB/mg protein, showed an increase in the levels in the CI group (82.85 ± 4.360) in relation to control (47.34 ± 3.109 $P < 0.0001$). Treatment with AA (62.79 ± 6.448 $P < 0.0393$), free extract at 200 $\mu\text{g/mL}$ (57.48 ± 5.477 $P < 0.0032$), 30% nanocapsules at both concentrations (41.99 ± 3.283 ; 43.86 ± 2.839 $P < 0.0001$), 50% nanocapsules at both concentrations (37.63 ± 1.827 ; 41.27 ± 1.847 $P < 0.0001$), and zein (43.30 ± 0.5394 $P < 0.0001$) prevented this alteration. Nanocapsules containing 50% extract (100 and 200 $\mu\text{g/mL}$) and 30% (100 $\mu\text{g/mL}$) were more effective in preventing this alteration compared to AA. Moreover, 50% nanocapsules (100 and 200 $\mu\text{g/mL}$), 30% nanocapsules (100 and 200 $\mu\text{g/mL}$), and zein showed superior effects compared to the free extract (100 $\mu\text{g/mL}$), while the 50% nanocapsule (100 $\mu\text{g/mL}$) was more effective than the free extract at 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1 C).

Brain samples exposed by 3 hours with H_2O_2 combined with FeSO_4 showed an increase in TBARS levels (21.19 ± 0.577 $P < 0.0001$) when compared to control (12.33 ± 0.348). Treatment with AA (11.04 ± 0.248 $P < 0.0001$), free extract (100 $\mu\text{g/mL}$) (12.03 ± 0.5108 $P < 0.0001$), nanoencapsulated extract (12.61 ± 0.939 ; 11.70 ± 0.534 (30%); 12.19 ± 0.455 ; 13.93 ± 0.630 (50%)) at both concentrations $P < 0.0001$), and zein (16.06 ± 1.524 $P < 0.0067$) prevented this increase (Figure 2A). In contrast, nitrite levels increased only in the group CI and nanoencapsulated extract (30% 100 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 2B). An increase in SH levels was observed in CI group (89.26 ± 3.944 TNB/mg protein) were significantly increased compared to the control group (74.41 ± 3.944 $P < 0.0482$). Treatment with nanoencapsulated extract 30% (200 $\mu\text{g/mL}$) (67.33 ± 1.506) and 50% (100 $\mu\text{g/mL}$) (67.39 ± 1.840) reduced SH content ($P < 0.0005$) (Figure 2C).

3.2 Effects of free and nanoencapsulated red araca extract on astrocyte viability exposed to LPS

First, we showed that neither the free nor the nanoencapsulated form of *P. cattleianum* extract induced cytotoxicity in primary astrocyte cultures after 72 h of treatment (Figure 3). On the other hand, LPS exposure markedly reduced astrocyte viability to 31.41% compared to the control group ($P < 0.0001$). The concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ of free *P. cattleianum* extract also reduced the cell viability to 20%. On the other hand, both free and the nanoencapsulated forms of araca extract (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) and zein increased cell viability when compared to the LPS group. No significant effect was

observed at the highest concentration tested of extract nanoencapsulated form (200 µg/mL) (Figure 4).

3.3 Nanoencapsulated *P. cattleianum* extract prevents the increase of AChE activity in primary astrocyte cultures exposed to LPS

LPS increased the AChE activity in astrocytes (0.312 ± 0.034 µmol of AcSch/h/mg of protein) compared to the control (0.120 ± 0.005 $P < 0.0004$). Treatment with *P. cattleianum* free (0.208 ± 0.0104 $P < 0.0295$) and nanoencapsulated (0.1107 ± 0.0148 $P < 0.0003$) forms, as well as with zein (0.089 ± 0.0228 $P < 0.0001$) prevented these effects. Furthermore, the nanoencapsulated extract and zein formulations exhibited greater efficacy in preventing AChE elevation compared to the free extract ($P < 0.040$ and $P < 0.0128$, respectively) (Figure 5).

3.4 Nanoencapsulated *P. cattleianum* extract protects against LPS-induced oxidative stress in astrocytes

LPS increased the nitrite levels in astrocyte (16.15 ± 2.043 µM nitrite/mg/protein; $P < 0.001$) when compared to control cells (3.255 ± 0.4733). *P. cattleianum* free (4.084 ± 1.236 µM nitrite/mg/protein µM $P < 0.0016$) and nanoencapsulated (3.851 ± 0.606 µM nitrite/mg/protein; $P < 0.0014$) prevented this change (Figure 6A). LPS decreased the SH levels (TNB/mg protein) (6.742 ± 0.337) in relation to control cells (19.35 ± 2.386 $P < 0.0081$) and only *P. cattleianum* nanoencapsulated (17.49 ± 3.416 $P < 0.0221$) and zein (17.98 ± 1.453 ; $P < 0.016$) prevented this reduction (Figure 6B). Regarding antioxidant enzyme activities, a decreased in SOD activity was induced by LPS (78.31 ± 4.011 units/mg of protein) compared to control cells (120.1 ± 4.143 units/mg of protein $P < 0.0039$), and only treatment with *P. cattleianum* nanoencapsulated protected against this change (115.2 ± 4.299 units/mg of protein $P < 0.0092$) (Figure 6C). Free (2.585 ± 0.263 units/mg of protein; $P < 0.0083$) and nanoencapsulated extract (4.554 ± 0.299 units/mg of protein $P < 0.0001$) were able to prevent the LPS-induced reduction in CAT activity (0.5300 ± 0.06813 units/mg of protein). Moreover, the nanocapsule was more effective in preventing this alteration compared to the free extract ($P < 0.0110$) (Figure 6D).

3.5 Nanoencapsulated *P. cattleianum* extract prevents LPS-induced changes in IL-10 levels in astrocytes

Regarding IL-10 levels, exposure to LPS (9.387 ± 1.201 pg/mL) caused a significant decrease in astrocytes when compared to control (51.32 ± 7.893 pg/mL $P < 0.0290$). Notably, only the nanoencapsulated *P. cattleianum* increased the IL-10 levels (90.20 ± 9.821 pg/mL; $P < 0.0003$) (Figure 7).

4. Discussion

This study employed two complementary experimental models: (I) an *in vitro* model of oxidative stress in brain tissue, in which combined exposure to H_2O_2 and $FeSO_4$ triggers Fenton-type reactions, lipid peroxidation, and nitrosative imbalance, thereby reproducing biochemical processes characteristic of CNS pathologies [20,33]; and (II) a neuroinflammation model using primary astrocyte cultures exposed to LPS, in which cell viability, cholinergic activity (AChE), oxidative stress markers (nitrite levels, sulfhydryl groups, and SOD and CAT activity), and the anti-inflammatory response (IL-10 levels) were evaluated.

It is well established in the literature that polyphenol-rich extracts are associated with therapeutic potential in CNS-related disorders [20,33,34]. *P. cattleyanum* fruit extract is particularly notable for its high content of flavonoids (e.g., quercetin), phenolic acids (e.g., ellagic and gallic acid), and anthocyanins, especially cyanidin derivatives such as cyanidin-3-O-glucoside [1,4]. These molecules exert multifaceted actions: they neutralize free radicals, chelate transition metals and reduce radical formation through the Fenton reaction, thereby promoting the expression of antioxidant enzymes and suppressing pro-inflammatory mediators [35,36,37]. Recent evidence suggests that cyanidin-3-glucoside can attenuate processes associated with ferroptosis by limiting free iron accumulation and lipid peroxidation [38,39].

However, the instability of anthocyanins under environmental factors such as light, pH, and temperature limits their practical application [40]. To overcome these limitations, nanoencapsulation has emerged as a promising strategy to protect phenolic compounds, control their release, and improve their bioavailability and interaction with target cells. In this context, zein-based nanostructures, derived from corn protein, have demonstrated considerable potential [41-43]. Thus, comparing *P. cattleyanum* fruit extract with its nanoencapsulated formulation provides valuable insights into how pharmaceutical stabilization can potentiate its biological effects.

Building upon this rationale, it becomes crucial to elucidate how such nanostructured systems interact with neural cells, particularly under conditions of

oxidative and inflammatory stress. Astrocytes, given their central role in maintaining redox balance and modulating neuroinflammatory responses, represent a valuable cellular model for these investigations. Understanding their response to bioactive compounds and nanocarriers not only informs potential neuroprotective mechanisms but also contributes to the development of targeted strategies against neurodegenerative processes.

In the acute oxidative stress model (1 h exposure to $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$), a marked increase in TBARS levels was observed, a classical marker of lipid peroxidation, suggesting $\bullet\text{OH}$ generation through the Fenton reaction and subsequent membrane lipid oxidation [44]. Treatment with both free and nanoencapsulated *P. cattleyanum* extract was effective in preventing this effect. In fact, previous studies have described that phenolics present in *P. cattleyanum* fruits may act by neutralizing reactive species, protecting membranes, chelating iron, and thereby reducing the progression of Fenton-type reactions [1, 2, 45,46]. Moreover, the nanoencapsulated formulation may enhance this effect. The analysis of nitrite levels and sulfhydryl groups further corroborated these findings. The reduction in nitrites indicates modulation of the iNOS/peroxynitrite pathway [47], while the preservation of SH groups reflects protection of protein cysteine residues and maintenance of the glutathione reserve, the major intracellular antioxidant [48].

Considering that the one-hour period may not have been sufficient for the release of bioactive compounds from *P. cattleyanum*, in this study, brain tissue samples were also incubated with $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$, free extract, and nanoencapsulated extract for a period of three hours. After this time the protective effect of the extract is particularly in its nanoencapsulated form remained evident in the lipid peroxidation axis, as indicated by reduced TBARS levels. Moreover, nanocapsules, especially the 50% formulation (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), restored sulfhydryl group levels. Therefore, while the AA and free extract groups lost their effects, the nanocapsules enhances antioxidant efficacy by protecting and sustaining the bioavailability of phenolic compounds. This formulation also outperformed the 30% version, likely due to its higher phenolic content [49].

Furthermore, the 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration proved to be more effective, this may be related to a hormetic behavior, in which the dose–response relationship is not linear but rather biphasic. Therefore, better effects may occur at lower concentrations. Several phytochemicals, including curcumin, resveratrol, and tomatidine, have been reported to exert beneficial effects at low concentrations and may become harmful at higher levels [50,51].

Regarding the experiments with astrocytes, our results showed that LPS reduced cell viability, decreased SOD and CAT activities as well as thiol content, increased nitrite levels, and elevated AChE activity [24,25]. These alterations have been associated with TLR4 activation, which initiates NF- κ B-mediated pro-inflammatory cascades, resulting in excessive production of pro-inflammatory cytokines as well as ROS and RNS. This combined oxidative and inflammatory milieu compromises the metabolic and structural integrity of astrocytes, leading to functional impairment and the perpetuation of neuroinflammation [52].

While none of the formulations induced cytotoxicity in healthy astrocytes, the 100 μ g/mL concentration demonstrated the most pronounced protective effect on cell viability. Also the better results using 50% extract nanoencapsulated formulation supported its choice for subsequent experiments aimed at evaluating anti-inflammatory and antioxidant activities. The results demonstrated that *P. cattleianum* extract particularly the nanoencapsulated formulation, effectively mitigated key aspects of LPS-induced damage: it reduced nitrite levels, prevented thiol depletion, and restored SOD and CAT activities. Notably, only the nanoformulation preserved SOD and CAT activity and thiol levels. These findings are consistent with previous reports on phenolic nanostructures, which enhanced astrocyte protection under inflammatory stress by preserving antioxidant defenses [24, 53].

Moreover, the maintenance of IL-10 levels observed in this study represents a highly relevant finding in the context of neuroinflammation. IL-10 is a key anti-inflammatory regulator in the CNS, limiting excessive inflammatory responses through activation of the JAK/STAT3 pathway and induction of regulatory gene expression, thereby contributing to the restoration of tissue homeostasis [54].

Astrocytes express relatively high levels of the IL-10 receptor. Upon IL-10 stimulation, astrocytes secrete TGF- β , a mediator that can attenuate microglial activation and reduce the release of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β and IL-6. This astrocyte-microglia crosstalk is considered crucial for the regulation of inflammation in neural tissue, as pharmacological blockade of TGF- β signaling restores pro-inflammatory responses [55]. Here, we demonstrated that nanostructured *P. cattleianum* extract exerts a more pronounced effect in elevating IL-10 levels compared with the free extract.

The effect of the nanosystems used in this study may be explained by two main factors. First, the bioactive profile of *P. cattleianum*: El-Deeb *et al.* [56] demonstrated that extracts of this species contain high levels of phenolic compounds such as quercetin,

kaempferol, and gallic acid, associated with significant antioxidant and anti-inflammatory activity. These metabolites reduced pro-inflammatory mediators in LPS-challenged macrophages, favoring a regulatory environment compatible with IL-10 upregulation. Second, the use of zein as an encapsulation matrix enhanced these effects, as zein protects phenolics from degradation and promotes controlled release, prolonging their action in the glial microenvironment [56].

ACh, a neurotransmitter released by cholinergic neurons, exerts its effects through muscarinic and nicotinic receptors and is rapidly terminated by the activity of AChE [57]. Astrocytes express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChRs), and studies have shown that their activation can suppress LPS-induced secretion of inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B signaling. In addition, $\alpha 7$ nAChR stimulation promotes Nrf2 expression, indicating also a potential antioxidant role in astrocytes [58]. Corroborating our findings, previous data from our research group demonstrated that astrocytes exposed to LPS exhibited increased AChE activity, which was associated with oxidative damage and elevated IL-6 levels [25]. This rise in AChE activity induced by LPS may decrease ACh availability, thereby contributing to enhanced inflammatory responses and underscoring the critical role of this enzyme in the context of neuroinflammation. Importantly, *P. cattleyanum* extract, particularly in its nanoencapsulated form, demonstrated a more pronounced ability to inhibit AChE activity, suggesting a protective mechanism that may help preserve cholinergic signaling and attenuate both oxidative stress and inflammatory processes in astrocytes.

In conclusion, our findings underscore the enhanced biological efficacy of *P. cattleyanum* extract when delivered in a nanoencapsulated formulation. By improving stability, bioavailability, and targeted cellular interactions, nanoencapsulation not only preserved antioxidant defenses, IL-10 levels, and acetylcholine signaling in astrocytes but also potentiated the extract's ability to mitigate LPS-induced oxidative and inflammatory insults. These results highlight the potential of nanostructured phenolic compounds as a promising strategy to amplify the therapeutic effects of natural bioactive agents in CNS disorders characterized by neuroinflammation. However, it is important to emphasize that these findings are based on *in vitro* models, which, despite their relevance for mechanistic insights, do not fully replicate the complexity of the CNS *in vivo*. Therefore, additional studies employing animal models are essential to validate the translational potential of these nanoformulations.

Statements and Declarations

Acknowledgements: We would like to thank the veterinarian from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Anelize de Oliveira Campello Felix, for her assistance with the animals.

Funding: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Finance code 001. R.M.S is recipient of CNPq fellowship (310472/2021-0).

Competing Interests: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author contributions: **Emilly F. Rodrigues:** conceptualization, formal analysis, data curation, investigation, methodology; Writing - original draft and Writing – review & editing; **Larissa M. da Silveira:** data curation, investigation, methodology; **Mayara. S. P. de Aguiar:** data curation, investigation, methodology; **Julia E. de Mello:** curation, investigation, methodology; **Francieli M. Stefanello:** funding acquisition and project administration; **Cristina J. Alves:** methodology; **Elessandra R. Zaverze:** methodology; **Nathalia S. Pedra:** supervision, methodology, writing - original draft; and writing - review & editing. **Roselia M. Spanevello:** funding acquisition; investigation; methodology; project administration; supervision; validation; visualization; writing - original draft; and writing - review & editing.

Data Availability: Please contact the authors for data request.

Ethics approval: All animal procedures were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas (CEUA 035420/2022-89), and were conducted in accordance the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities and the National Council of Control of Animal Experimentation.

Consent to participate: Not applicable.

Consent to publish: Not applicable.

References

- [1] Oliveira PS, Chaves VC, Soares MSP, Bona NP, Mendonça LT, Carvalho FB, Gutierrez JM, Vasconcellos FA, Vizzotto M, Vieira A, Spanevello RM, Reginatto FH, Lencina CL, Stefanello FM (2018). Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. *Metab Brain Dis* 33:1551-1562. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0262-y>
- [2] Cardoso JS, Cardoso Teixeira F, De Mello JE, Soares De Aguiar MS, Souto Oliveira P, Torchelsen Saraiva J, Vizzotto M, Borelli Grecco F, Lencina CL, Spanevello RM, Tavares RG, Stefanello FM (2023) *Psidium cattleianum* fruit extract prevents systemic alterations in an animal model of type 2 diabetes mellitus: comparison with metformin effects. *Biomarkers* 28:238-248. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2022.2163695>
- [3] Machado PG, Londero DS, Barcia MT, Ballus CA (2023) Exploring Anthocyanin and Free and Bound Phenolic Compounds from Two Morphotypes of Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by LC-ESI-QqQ-MS/MS. 28:3230. <https://doi.org/10.3390/foods12173230>
- [4] Dos Santos Pereira E, Vinholes J, Camargo M, Nora R, Crizel R, Chaves F, Vizzotto, M 2020. Characterization of araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine): Phenolic composition, antioxidant activity and inhibition of α -amylase and α -glucosidase. *Food Bioscience* 37: 100665. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100665>
- [5] Grabska-Kobyłecka I, Szpakowski P, Król A, Książek-Winiarek D, Kobyłecki A, Głąbiński A, Nowak D (2023) Polyphenols and Their Impact on the Prevention of Neurodegenerative Diseases and Development. *Nutrients* <https://doi.org/10.3390/nu15153454>
- [6] Tanhaei A, Mohammadi M, Hamishehkar H, Hamblin MR (2021) Electrospraying as a novel method of particle engineering for drug delivery vehicles. *J Control Release* 330:851-865. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.059>
- [7] Gómez-Mascaraque L, Lopez-Rubio A (2019) Production of food bioactive-loaded nanoparticles by electrospraying. In: *Nanoencapsulation of food ingredients by specialized equipment*. Academic Press, p. 107-149
- [8] Campos L, Neto F, Noronha C, Ferreira M, Cavalcanti I, Santos-Magalhães S (2023) Zein nanoparticles for drug delivery: Preparation methods and biological applications. *Int J Pharm* 635:122754. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122754>

- [9] Vasile F, Dossi E, Rouach N (2017) Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222:2017-2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- [10] Baxter PS, Hardingham GE. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med* 100:147-152. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.027>
- [11] Colombo E, Farina C (2016) Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37:608-620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- [12] Nishimura Y, Kanda Y, Sone H, Aoyama H (2021) Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2021:6685204. <https://doi.org/10.1155/2021/6685204>
- [13] Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu II, Radu CI, Vladăcenco O, Roza E, Costăchescu B, Grumezescu AM, Teleanu RI (2022) An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 23:5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>
- [14] Pisoschi AM, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 97:55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- [15] Olufunmilayo EO, Gerke-Duncan MB, Holsinger RMD (2023) Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants* 18: 517. <https://doi.org/10.3390/antiox12020517>
- [16] Zhao Y, Huang Y, Cao Y, Yang J (2024) Astrocyte-Mediated Neuroinflammation in Neurological Conditions. *Biomolecules*. 25:1204. <https://doi.org/10.3390/biom14101204>
- [17] Salkeni M. A. Naing A. Interleukin-10 in cancer immunotherapy from bench to bedside. *Trends Cancer*, 14;9(9):716–725, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2023.05.003>.
- [18] Bordignon C, Francescatto V, Nienow A, Calvete E, Reginatto F (2009) Influence of the extraction solution pH on the content of anthocyanins in strawberry fruits. *Food Sci Technol* 29:183-188. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000100028>
- [19] Radünz M, Hackbart HCDS, Bona NP, Pedra NS, Hoffmann JF, Stefanello FM, Da Rosa Zavareze E (2020) Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells.

- [20] De Mello JE, Luduvico KP, Dos Santos A, Teixeira FC, de Souza Cardoso J, de Aguiar MSS, Cunico W, Vizzotto M, Stefanello F, Spanevello R (2023) Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia. *Metab Brain Dis* 38:1261-1272. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01175-w>
- [21] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.
- [22] Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res* 833:142-149. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01503-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01503-6).
- [23] Pacheco SM, Azambuja JH, de Carvalho TR, Soares MSP, Oliveira PS, da Silveira EF, Stefanello FM, Braganhol E, Gutierrez JM, Spanevello RM (2018) Glioprotective Effects of Lingonberry Extract Against Altered Cellular Viability, Acetylcholinesterase Activity, and Oxidative Stress in Lipopolysaccharide-Treated Astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 38:1107-1121. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0581-x>
- [24] Fachel FNS, Dal Prá M, Azambuja JH, Endres M, Bassani VL, Koester LS, Henriques AT, Barschak AG, Teixeira HF, Braganhol E (2020) Glioprotective Effect of Chitosan-Coated Rosmarinic Acid Nanoemulsions Against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Astrocyte Primary Cultures. *Cell Mol Neurobiol* 40:123-139. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00727-y>
- [25] Alvez FL, Bona NP, Pedra NS, da Silva DS, Cunico WJ, Stefanello FM, de Andrade CM, Soares MSP, Spanevello RM (2023) Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 43:283-297. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01177-1>
- [26] Pedra NS, Bona NP, de Aguiar MSS, Spohr L, Alves FL, Santos FDSD, Saraiva JT, Stefanello FM, Braganhol E, Spanevello RM (2022) Impact of gallic acid on tumor suppression: Modulation of redox homeostasis and purinergic response in in vitro and a preclinical glioblastoma model. *J Nutr Biochem* 110:109156. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109156>

- [27] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [28] Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-h)
- [29] Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169:1543-55. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.154>
- [30] Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 20:141-145. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6)
- [31] Misra H, Fridovich I (1972) The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
- [32] Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Met Enzymol* 105: 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- [33] Spohr L, de Aguiar MSS, Bona NP, Luduvico KP, Alves AG, Domingues WB, Blödorn EB, Bortolatto CF, Brüning CA, Campos VF, Stefanello FM, Spanevello RM (2023) Blueberry Extract Modulates Brain Enzymes Activities and Reduces Neuroinflammation: Promising Effect on Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior. *Neurochem Res* 43:846-861. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03813-8>
- [34] Soares M.S.P. et al. The proctetive action of Rubus sp. fruit extract against oxidative damage in mice exposed to lipopolysaccharide. *Neurochemical Research*, 46, 1129–1140, 2021. <https://doi.org/10.1007/ s11064-021-03248-7>
- [35] Aboonabi A, Singh I (2015) Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2 - ARE as an indicator and modulator of redox. *Biomed Pharmacother* 72: 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.03.008>
- [36] Ali T, Kim T, Rehman SU, Khan MS, Amin FU, Khan M, Ikram M, Kim MO (2018) Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 55:6076-6093. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0798-6>

- [37] Liu X, Tan X, Su Y, Zou L, Yuan W, Yu C (2025) Anthocyanin attenuates pulmonary arterial hypertension and associated heart failure via improving mitochondrial function through Nrf2-dependent mechanism. *Clin Exp Hypertens* 47:2503805. <https://doi.org/10.1080/10641963.2025.2503805>
- [38] Shan X, Lv ZY, Yin MJ, Chen J, Wang J, Wu QN (2021) The Protective Effect of Cyanidin-3-Glucoside on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2021:8880141. <https://doi.org/10.1155/2021/8880141>
- [39] Du YW, Li XK, Wang TT, Zhou L, Li HR, Feng L, Ma H, Liu HB (2023) Cyanidin-3-glucoside inhibits ferroptosis in renal tubular cells after ischemia/reperfusion injury via the AMPK pathway. *Mol Med* 29:42. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00642-5>
- [40] Yang Y, Yuan X, Xu Y, Yu Z 2015. Purification of anthocyanins from extracts of red raspberry using macroporous resin. *Int J. Food Prop* 18, 1046-1058
- [41] Kasaai M. R. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. *Trend Food Sci Technol* 79: 184-197, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.015>
- [42] Luduvico KP, Radünz M, Hackbart HCDS, Bona NP, Pedra NS, Chitolina Schetinger MR, Zavareze EDR, Spanevello RM, Stefanello FM (2024) Electrospraying and electrospinning of tannic acid-loaded zein: Characterization and antioxidant effects in astrocyte culture exposed to E. coli lipopolysaccharide. *Int J Biol Macromol* 267:131433. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131433>
- [43] Tadele D. T., Islam M. S., Mekonnen T.H (2025) Zein-based nanoparticles and nanofibers: Co-encapsulation, characterization, and application in food and biomedicine. *Trends Food Sci Technol* 155:104809. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104809>
- [44] Mariutti, L.R.B. Lipid Peroxidation (TBARS) in Biological Samples. In: Betim Cazarin, C.B. (eds) *Basic Protocols in Foods and Nutrition. Methods and Protocols in Food Science*. Humana, New York, NY, 2022. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2345-9_7.
- [45] Cavichioli N, Dalmagro AP, Sasse OR, Junges LH, Rebelo AM, Reinke CK, Zeni ALB (2022) Antidepressant-Like Effect and Phenolic Profile of Brazilian Native and Exotic Species from Psidium Genus. *Chem Biodivers* 19:e202200242. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200242>
- [46] Padilla-Hernández C, Silva-Jara J, Reyes-Becerril M, Fonseca-García A, Anaya-Esparza L, Orozco-Sánchez P, Rivera-Valdés J, López-Orozco M, Velázquez-Carriles V, Macías-Rodríguez M (2025) Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with

Psidium cattleianum Leaves Extracts as Reducing Agent: Influence of Extraction Method on Physicochemical and Biological Activities. *Physchem* 5: 17 <https://doi.org/10.3390/physchem5020017>

[47] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Re* 87:315-424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>

[48] Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>

[49] Bhardwaj N, Kundu S (2010) Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv* 28:325-347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>

[50] Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V. (2010) Resveratrol commonly displays hormesis: Occurrence and biomedical significance. *Human & Experimental Toxicology*. 29(12):980-1015. <https://doi.org/10.1177/0960327110383625>

[51] Calabrese E.J., Dhawan G., Kapoor R., Mattson M.P., Rattan S.I. (2019) Curcumin and hormesis with particular emphasis on neural cells. *Food Chem. Toxicol.*;129:399–404. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.053>

[52] Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP (2019) Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 20:2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>

[53] Simões W, Piccoli R, Dos Santos F, Saraiva J, Pedra N, Da Silva G, Goularte K, Luduvico K, Radünz M, Zavareze E, Spanevello R, Bona N, Stefanello F (2024) Antitumoral Activity of Electrospray-Nanoencapsulated Tannic Acid on C6 and U87MG Glioblastoma Cell Lines. *Bionanoscience* 14: 2886–2898. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01497-8>

[54] Saraiva M, Vieira P, O'Garra A (2020) Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med* 217:e20190418. <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>

[55] Norden DM, Fenn AM, Dugan A (2014) Godbout JP. TGFβ produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*. 62:881-95. <https://doi.org/10.1002/glia.22647>

[56] El-Deeb EM, Elsayed HE, Ateya HB, Taha HS, Elgindi MR, Abouelenein D, Caprioli G, Lai KH, Mustafa AM, Moharram FA (2024) Phenolic profiling and bioactivity assessment of in vitro propagated Psidium cattleianum Sabine: A promising study. *Heliyon* 10: e29379. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29379>

- [57] Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* 14:101-15. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>
- [58] Patel H, McIntire J, Ryan S, Dunah A, Loring R (2017) Anti-inflammatory effects of astroglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors are mediated by inhibition of the NF- κ B pathway and activation of the Nrf2 pathway. *J Neuroinflammation* 26:192. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0967-6>

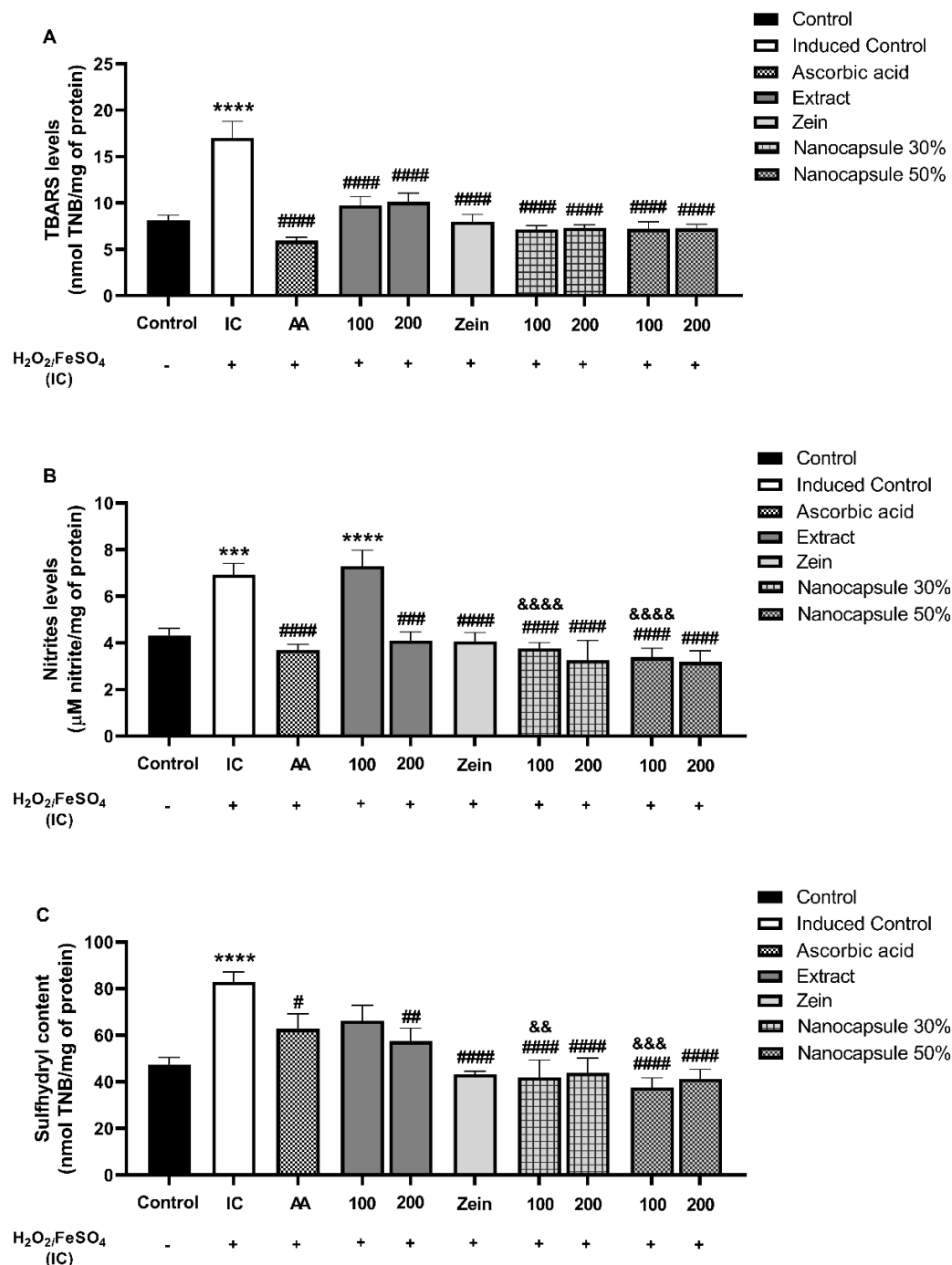


Figure 1 - Oxidative stress parameters (TBARS, nitrite and SH content) in brain homogenates incubated with H₂O₂ + FeSO₄ and treated with free extract (100 and 200 μg/mL), 50% nanoencapsulated *Psidium cattleianum* extract (100 and 200 μg/mL) and zein (200 μg/mL) for 1 hour. Values are expressed as mean ± SEM from three independent experiments (n = 3 in triplicate). Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test. *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ when compared to control. # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ and ##### $P < 0.0001$ when compared to induced group (IC). && $P < 0.01$; &&& $P < 0.001$ and &&&& $P < 0.0001$ when compared to the extract free in both concentrations.

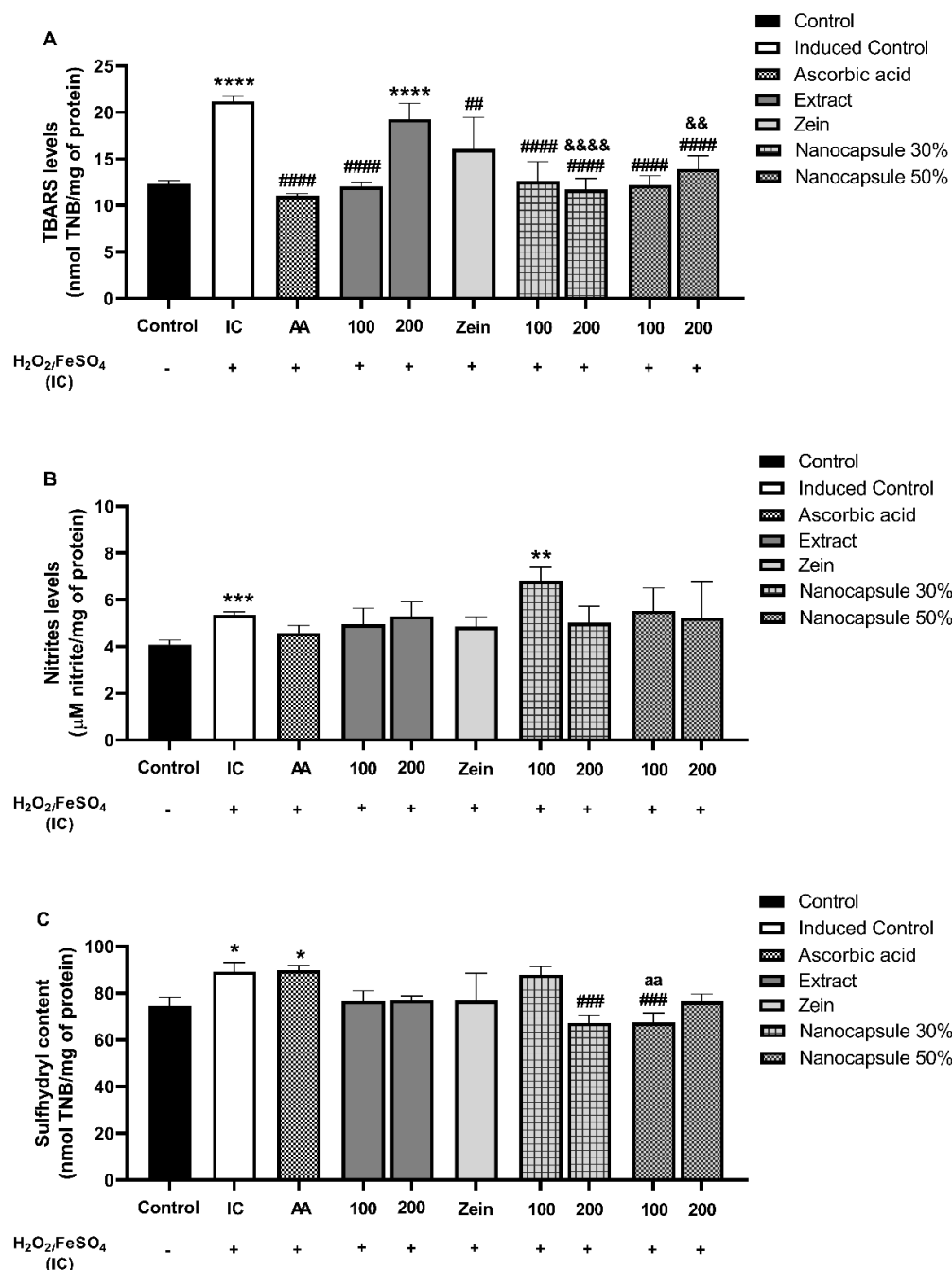


Figure 2 - Oxidative stress parameters (TBARS nitrite and SH content) in brain homogenates incubated with H₂O₂ + FeSO₄ and treated with free extract (100 and 200 μg/mL), 50% nanoencapsulated *Psidium cattleianum* extract (100 and 200 μg/mL) and zein (200 μg/mL) for 3 hours. Values are expressed as mean ± SEM from three independent experiments (n = 3 in triplicate). Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 and **** P < 0.0001 when compared to control group. ###P < 0.01; #### P < 0.001 and ##### P < 0.0001 when compared to IC. && P < 0.01 and &&&& P < 0.0001 when compared to extract free in both concentrations. aa P < 0.01 when compared to 30% nanocapsule group.

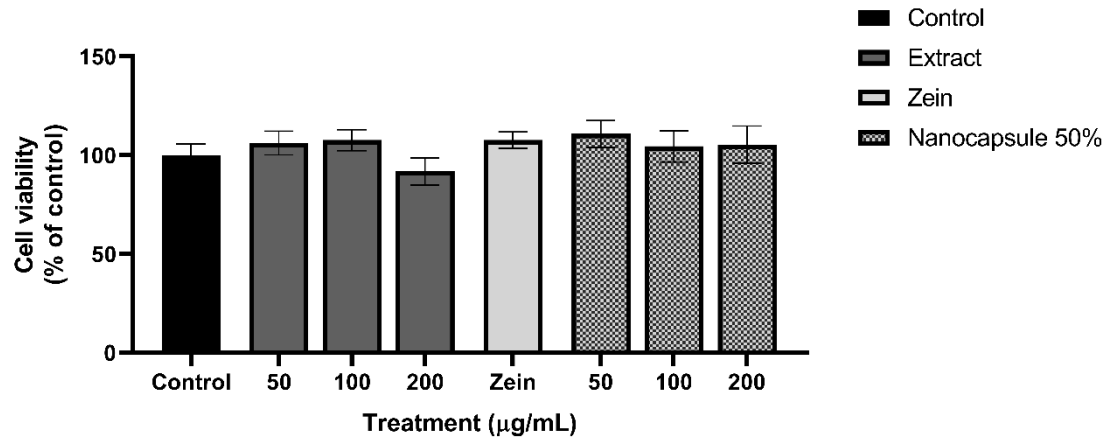


Figure 3 - Astrocyte viability after treatment with free extract (50, 100, and 200 µg/mL), 50% nanoencapsulated *Psidium cattleianum* extract (50, 100, and 200 µg/mL), or zein (200 µg/mL) for 72 h. Data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments, each performed in triplicate (n = 3).

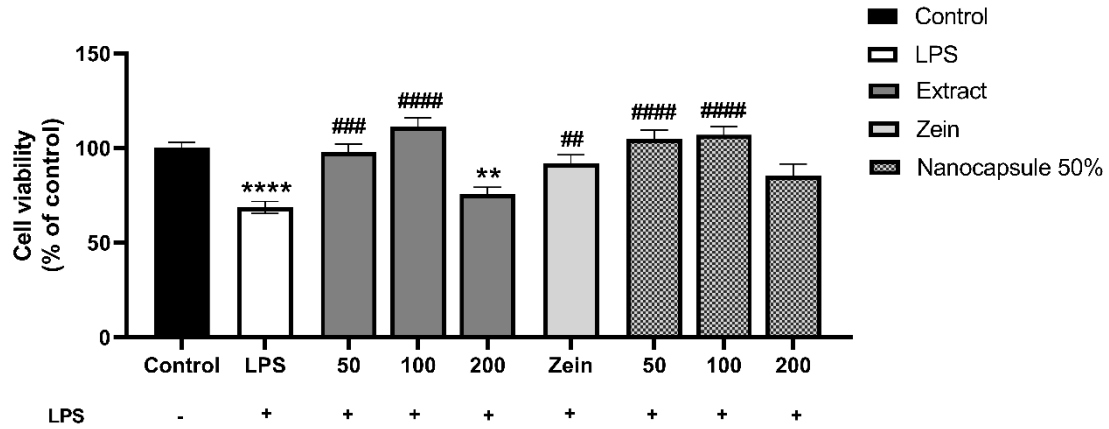


Figure 4 - Astrocyte viability after treatment with free extract (50, 100, and 200 µg/mL), 50% nanoencapsulated *Psidium cattleianum* extract (50, 100, and 200 µg/mL), or zein (200 µg/mL) for 72 h, followed by exposure to LPS (1 µg/mL) for 3 h. Data are presented as mean ± SEM from three independent experiments (n = 3), each performed in triplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. **P < 0.01 and **** P < 0.0001 when compared to control cells. ## P < 0.01; ###P < 0.001 and #### P < 0.0001 when compared to LPS group.

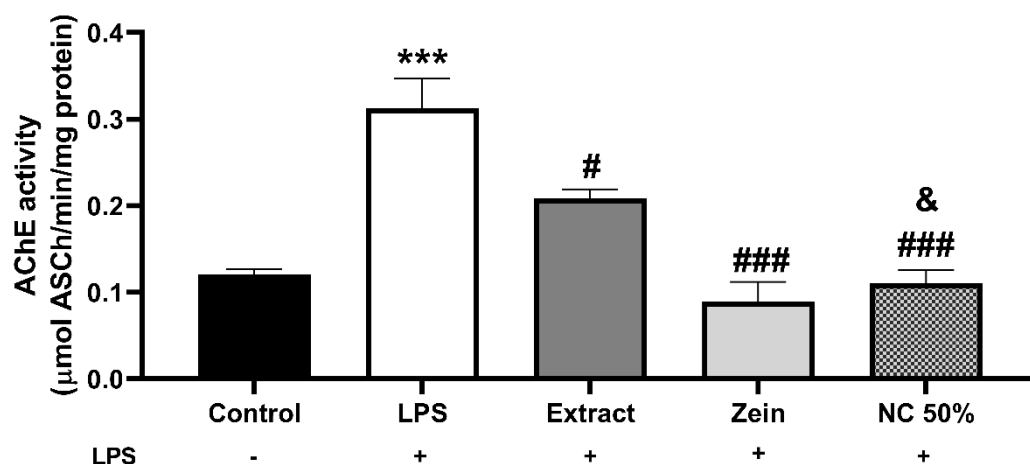


Figure 5 – AChE activity in astrocytes after treatment with free extract (100 μg/mL), 50% nanoencapsuled *Psidium cattleianum* extract (100 μg/mL) and zein (100 μg/mL) for 72 h, followed by exposure to LPS (1 μg/mL) for 3 h. Data are presented as mean ± SEM from three independent experiments (n = 3), each performed in triplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. *** $P < 0.001$ when compared to control cells. # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ when compared to LPS group. & $P < 0.05$ when compared to free extract.

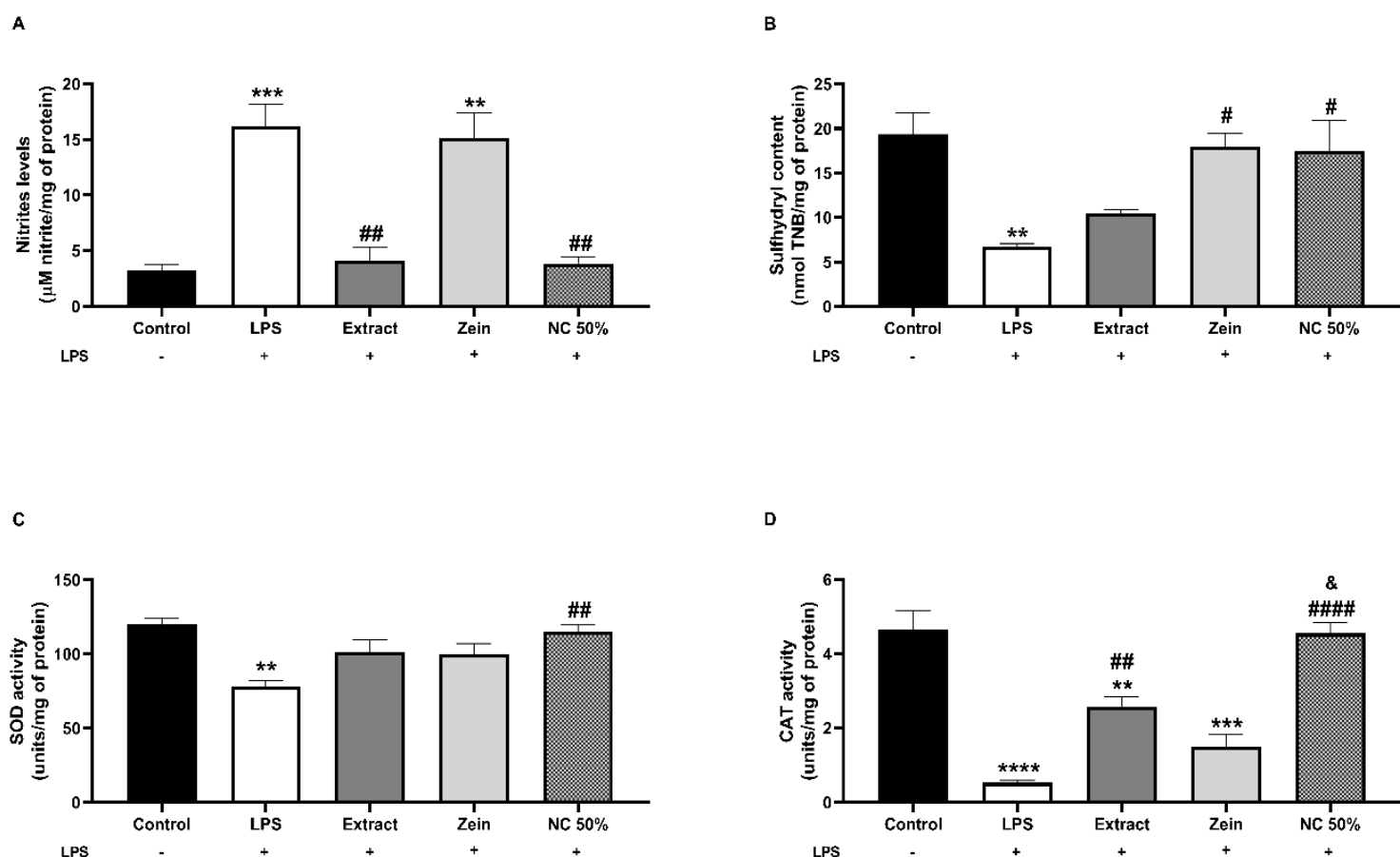


Figure 6 – Oxidative stress parameters in astrocytes after treatment with free extract (100 µg/mL), 50% nanoencapsuled *Psidium cattleianum* extract (100 µg/mL) and zein (100 µg/mL) for 72 h, followed by exposure to LPS (1 µg/mL) for 3 h. Nitrite levels (A), sulphydryl content (B), SOD (C) and CAT activities (D). Data are presented as mean ± SEM from three independent experiments (n = 3), each performed in triplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ when compared to control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; and #### $P < 0.0001$ when compared to LPS group. & $P < 0.05$ when compared to compared to free extract.

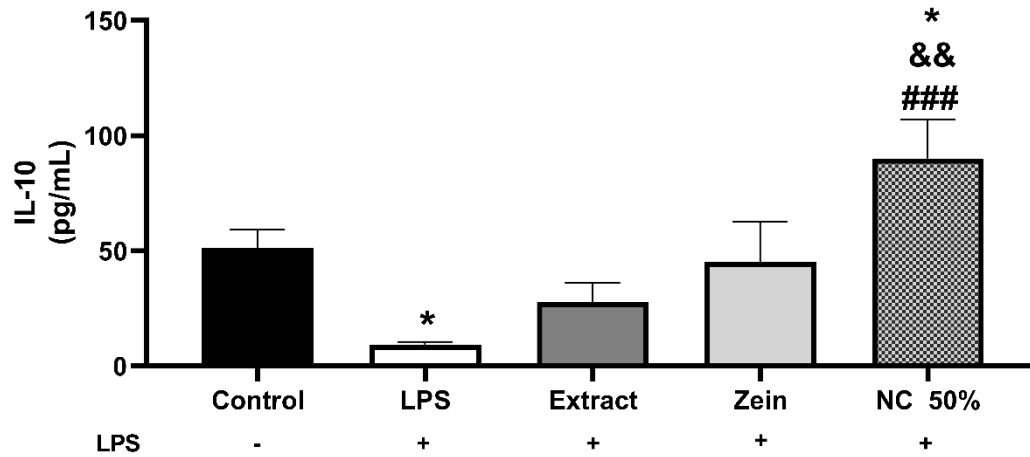


Figure 7 - IL-10 levels in astrocytes after treatment with free extract (100 $\mu\text{g/mL}$), 50% nanoencapsuled *Psidium cattleianum* extract (100 $\mu\text{g/mL}$) and zein (100 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h, followed by exposure to LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 3 h. Data are presented as mean $\pm$ SEM from three independent experiments ($n = 3$), each performed in triplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * $P < 0.05$ when compared to control cells ### $P < 0.001$ when compared to LPS group. && $P < 0.01$ when compared to compared to free extract.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que o extrato de *Psidium cattleianum* apresenta efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, possivelmente devido a presença de compostos bioativos como quercetina, ácidos elágico, gálico e cianidina-3-O-glicosídeo (Oliveira *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2020). Esses compostos são capazes de neutralizar radicais livres, quelar metais de transição, reduzir a formação de radicais via reação de Fenton e modular vias de sinalização como Nrf2 e NF-κB, estimulando a expressão de enzimas antioxidantes (Liu *et al.*, 2025; Ali *et al.*, 2018; Aboonabi, Singh, 2015). Ainda, El-Deeb e colaboradores (2024) demonstraram que compostos bioativos presentes no extrato de *P. cattleianum* também são capazes de reduzir mediadores pró-inflamatórios em macrófagos expostos ao LPS.

As ações biológicas do extrato de araçá vermelho podem ser potencializadas com a utilização de nanocarreadores. O processo de nanoencapsulação diminui a instabilidade de compostos como as antocianinas frente a fatores ambientais como luz, pH e temperatura (Yang *et al.*, 2015). Nesse sentido, a nanoencapsulação surge como estratégia eficiente para proteger compostos fenólicos, controlar sua liberação e intensificar a interação com células-alvo. Adicionalmente, nanoestruturas produzidas a partir da zeína, têm se mostrado promissoras nesse contexto (Kasaai, 2018; Luduvico *et al.*, 2024; Tadele, Islam, Mekonnen, 2025). O uso da zeína como matriz de encapsulação é capaz de potencializar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, uma vez que pôde proteger os polifenóis da degradação e permitir liberação controlada, prolongando sua ação (El-Deeb *et al.*, 2024).

É bem estabelecido na literatura que os compostos fenólicos possuem ações neuroprotetoras em diferentes modelos experimentais (De Mello *et al.*, 2023; Spohr *et al.*, 2022; Soares *et al.*, 2021). A neuroinflamação associada ao estresse oxidativo constitui um dos principais mecanismos patogênicos em doenças neurodegenerativas (Rekatsina *et al.*, 2020). A produção contínua de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio provoca danos as biomoléculas, sustentando ciclos de ativação glial e levando ao comprometimento da função cerebral (Dash *et al.*, 2024).

Em condições fisiológicas, os astrócitos desempenham papel essencial no status redox do SNC removendo radicais livres, sintetizando e regenerando a glutatona, além de auxiliar na atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT (Valles *et al.*, 2023). Contudo, sob insultos oxidativos intensos, a capacidade protetora dos astrócitos pode diminuir fazendo com que eles contribuam para a amplificação do dano oxidativo e da resposta inflamatória (You *et al.*, 2017). Desta forma, compostos naturais surgem como candidatos promissores, uma vez que suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias podem restaurar o equilíbrio redox e diminuir a neuroinflamação consequentemente, protegendo o tecido neural.

Neste estudo, primeiramente foi avaliado o extrato livre e nanoencapsulado de *P. cattleianum* em tecido cerebral em um modelo de estresse oxidativo *in vitro*. A exposição combinada de H₂O₂ com FeSO₄ desencadeia reações do tipo Fenton, peroxidação lipídica e desequilíbrio nitrosativo, simulando danos oxidativos típicos de doenças do SNC (De Mello *et al.*, 2023; Spohr *et al.*, 2019).

Após uma hora de exposição a H₂O₂/FeSO₄, observou-se um aumento significativo nos níveis de TBARS, marcador de peroxidação lipídica, sugerindo a geração de •OH via reação de Fenton e consequente oxidação de lipídios de membrana (Mariutti, 2022). O tratamento com extrato de araquá na forma livre e nanoencapsulada (100 e 200 µg/mL), foram capazes de reduzir de forma semelhante esse aumento nos níveis de TBARS.

Dados da literatura já tem relatado que polifenóis presentes no araquá atuam neutralizando espécies reativas, protegendo membranas, quelando ferro e reduzindo a propagação de reações tipo Fenton (Padilla-Hernandez *et al.*, 2025; Cardoso *et al.*, 2023; Cavichioli *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2018). As análises de nitritos e do conteúdo tiólico total corroboraram com esses resultados. A redução de nitritos sugere modulação da via iNOS/peroxinitrito (Pacher, Beckman, Liadeut, 2007), enquanto a preservação dos grupos sulfidril indica proteção de cisteínas proteicas e manutenção dos níveis de glutatona, principal antioxidante intracelular (Forman, Zhang, Rinna, 2007).

Considerando que o período de uma hora pode não ter sido suficiente para a liberação dos compostos bioativos do araquá, neste estudo as amostras de tecido cerebral também foram incubadas com H₂O₂/FeSO₄, extrato livre e

extrato nanoencapsulado por um período de três horas. Dos parâmetros analisados (TBARS, nitritos e conteúdo tiólico) pode-se observar que extrato nanoencapsulado foi mais eficiente em reduzir os níveis de TBARS quando comparado ao extrato livre. As nanocápsulas, especialmente a formulação a 50% e a concentração de 100 µg/mL, neste tempo, restauraram os níveis de sulfidril, indicando maior eficácia antioxidante pela preservação e prolongamento da biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Esse efeito superior à formulação de 30% pode estar relacionado ao maior teor fenólico e ao menor tamanho de partícula, que favorecem a internalização celular (Bhardwaj, Kundu, 2010).

Já a baixa eficácia da concentração de 200 µg/mL pode estar relacionada com um comportamento hormésico, em que não há uma característica linear para dose-resposta, mas sim, bifásicas. Portanto, podem haver melhores efeitos em menores concentrações. Alguns fitoquímicos, incluindo a curcumina, o resveratrol e a tomatidina (Calabrese, Mattson, Calabrese, 2010; Calabrese et al., 2019; Fang et al., 2017) têm sido relatados como benéficos em baixas concentrações e pode se tornar prejudicial em níveis mais elevados. A zeína, por sua composição hidrofóbica, protege compostos fenólicos da degradação por luz, pH ou temperatura e facilita sua liberação sustentada, possíveis fatores que explicam o desempenho robusto da nano-formulação (Li, Yu, 2020; Patel *et al.*, 2010).

O efeito glioprotetor das formulações também foi evidenciado em cultura primária de astrócitos exposta ao LPS. Neste protocolo, verificou-se que o LPS causou uma redução da viabilidade celular, diminuição da atividade de SOD e CAT, aumento dos níveis de nitritos, elevação da atividade da AChE e diminuição dos níveis de IL-10 (Alvez *et al.*, 2021; Fachel *et al.*, 2020). Tais alterações estão associadas à ativação do receptor TLR4, que desencadeia cascatas pró-inflamatórias mediadas por NF-κB, resultando na produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias além de ROS e RNS. Esse ambiente inflamatório e oxidativo compromete a integridade estrutural e metabólica dos astrócitos, favorecendo disfunções e perpetuando a neuroinflamação (Batista *et al.*, 2019).

Embora as formulações não tenham induzido citotoxicidade em astrócitos saudáveis, a concentração de 100 µg/mL apresentou melhor efeito protetor sobre a viabilidade, justificando seu uso nos ensaios subseqüentes para avaliação das

atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. O extrato de araçá vermelho, especialmente na forma nanoencapsulada a 50%, reduziu os níveis de nitritos, preservou grupos tiol e preveniu as alterações na atividade da SOD e CAT induzidas pelo LPS. A nanoformulação mostrou proteção mais efetiva dessas enzimas, confirmando evidências anteriores de que nanossistemas fenólicos potencializam a defesa antioxidante dos astrócitos frente ao estresse inflamatório (Simões et al., 2024; Fachel et al., 2020).

Outro resultado de grande relevância foi o aumento nos níveis de IL-10 do extrato nanoencapsulado quando comparado ao extrato livre. A IL-10, uma das principais citocinas anti-inflamatórias no SNC, é responsável por controlar respostas inflamatórias excessivas através da ativação da via JAK/STAT3 e da indução de genes regulatórios, contribuindo assim para o restabelecimento da homeostase tecidual (Saraiva, Vieira, O'Garra, 2019). Astrócitos apresentam altos níveis de receptores para IL-10 e quando expostos à essa citocina secretam TGF- β , um mediador capaz de reduzir a ativação microglial e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6.

Assim, um aumento nos níveis de IL-10 em um ambiente inflamatório, como observado neste estudo, sugere um mecanismo crucial de regulação (Norden *et al.*, 2014). Ainda, o extrato de *P. cattleianum*, especialmente em sua forma nanoencapsulada, apresentou maior capacidade de inibir a atividade da AChE em astrócitos expostos ao LPS. Essa diminuição na atividade desta enzima, pode aumentar os níveis de acetilcolina, uma molécula com ações anti-inflamatórias.

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que tanto o extrato livre quanto o nanoencapsulado de *P. cattleianum* foram capazes de prevenir alterações induzidas em tecido cerebral em modelo *in vitro* de estresse oxidativo, bem como em astrócitos expostos ao LPS. No entanto, a formulação nanoencapsulada destacou-se por sua maior eficácia em restaurar a atividade das enzimas antioxidantes, da acetilcolinesterase e em aumentar os níveis de IL-10, evidenciando um papel mais robusto na proteção celular contra os danos oxidativos e inflamatórios em astrócitos expostos ao LPS. Tais efeitos podem

estar relacionados à maior estabilidade, biodisponibilidade e às interações celulares direcionadas dos compostos bioativos quando em sua forma nanoencapsulada. Esse estudo reforça o potencial dos compostos fenólicos nanoestruturados como uma estratégia promissora para ampliar os efeitos terapêuticos de agentes naturais em doenças neurológicas associadas à neuroinflamação.

7. REFERÊNCIAS

Aboonabi A., Singh I. **Chemopreventive role of anthocyanins in atherosclerosis via activation of Nrf2–ARE as an indicator and modulator of redox.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 72, 30-36, 2015. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.03.008.

Alami M., et al. **In Vitro Assessment of the Neuroprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Polyphenols Against Tau Phosphorylation, Neuroinflammation, and Oxidative Stress.** Nutrients, 16, 21, 3667, 2024. DOI: 10.3390/nu16213667.

Ali, T. et al. **Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.** Molecular Neurobiology, 55, 6076–6093, 2018. DOI:10.1007/s12035-017-0798-6.

Alvez, F. L. et al. **Effect of Thiazolidin-4-one Against Lipopolysaccharide—Induced Oxidative Damage, and Alterations in Adenine Nucleotide Hydrolysis and Acetylcholinesterase Activity in Cultured Astrocytes.** Cellular and Molecular Neurobiology, 2021. DOI:10.1007/s10571-021-01177-1.

Aminjan, H. H. et al., **Targeting of oxidative stress and inflammation through ROS/NF-kappaB pathway in phosphine-induced hepatotoxicity mitigation.** Life Sciences, 232, 116607, 2019. DOI:10.1016/j.lfs.2019.116607.

Batista C.R.A. et al. **Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration.** International Journal of Molecular Science, 20, 2293, 2019. DOI:10.3390/ijms20092293.

Bhardwaj N., Kundu S. C. **Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique.** Biotechnology Advances, 28, 3, 325-347, 2010. DOI:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.

Beltrame, B. M. et al. **Two morphotypes versus two chemotypes of *Psidium cattleianum*: Chemical and pharmacological comparison and a rational approach for marker selection.** Journal of Chromatography B: Analytical

Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 30, 1199, 123247, 2022. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123247.

Bona N. P. et al. **Protective action of *Cecropia pachystachya* extract and enriched flavonoid fraction against memory deficits, inflammation and oxidative damage in lipopolysaccharide challenged mice.** Journal of Ethnopharmacology, 318, Part B, 117080, 2024. DOI:10.1016/j.jep.2023.117080.

Cai, L. et al. **Plant-derived compounds: A potential source of drugs against Tobacco mosaic virus.** Pesticide Biochemistry and Physiology, 169, 2020. DOI: 10.1016/j.pestbp.2020.104589.

Campión, R. et al. **Zein-based nanospheres and nanocapsules for the encapsulation and oral delivery of quercetin.** International Journal of Pharmaceutics, 643, 123216, 2023. DOI:10.1016/j.ijpharm.2023.123216.

Campos L. A. A. et al. **Zein nanoparticles for drug delivery: Preparation methods and biological applications.** International Journal of Pharmaceutics, Volume 635, 122754, 2023. DOI:10.1016/j.ijpharm.2023.122754.

Cardoso, J. S. et al. **Psidium cattleianum fruit extract prevents systemic alterations in an animal model of type 2 diabetes mellitus: comparison with metformin effects.** Biomarkers 28,2, 238-248, 2023. DOI: 10.1080/1354750X.2022.2163695.

Cavichioli N. et al. **Antidepressant-Like Effect and Phenolic Profile of Brazilian Native and Exotic Species from *Psidium* Genus.** Chemistry and Biodiversity, 19, 11, 2022. DOI:10.1002/cbdv.202200242.

Correia V. T. V. et al. **An Integrative Review on the Main Flavonoids Found in Some Species of the Myrtaceae Family: Phytochemical Characterization, Health Benefits and Development of Products.** Plants, 11, 20, 2796, 2022. DOI:10.3390/plants11202796.

Dash U. C, et al. **Estresse oxidativo e inflamação na patogênese de doenças neurológicas: mecanismos e implicações.** Acta Pharmaceutica Sinica B, 15,1,15–34, 2024. Doi:10.1016/j.apsb.2024.10.004.

De Mello et al. **Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia.** Metabolic Brain Disease, 38, 1261–1272, 2023. DOI:10.1007/s11011-023-01175-w.

De Oliveira, G. L. R. et al. **Antioxidant stability enhancement of carotenoid rich-extract from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.) nanoencapsulated in gelatin under different storage conditions.** Food Chemistry, 348, 2021. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129055

De Oliveira, M. A., Araújo, R. S., Mosqueira, V. C. F. **PEGylated and functionalized polylactide-based nanocapsules: An overview.** International Journal of Pharmaceutics, 636, 5, 2023. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122760.

Desagher S., Glowinski J., Premont J. **Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity.** Journal of Neuroscience, 16, 8, 2553-2562, 1996. DOI:10.1523/JNEUROSCI.16-08-02553.1996.

Du Y. et al. **Cyanidin-3-glucoside inhibits ferroptosis in renal tubular cells after ischemia/reperfusion injury via the AMPK pathway.** Molecular Medicine, 29, 42, 2023. DOI: 10.1186/s10020-023-00642-5.

Duan L., Yu X. **Fibroblasts: New players in the central nervous system?** Fundamental Research, 4, 2, 262-266, 2024. DOI: 10.1016/j.fmre.2023.01.014.

El-Deeb E. M. et al. **Phenolic profiling and bioactivity assessment of in vitro propagated *Psidium cattleianum* Sabine: A promising study.** Heliyon, 10, 8, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e29379.

Elsayed H.E. et al. **Essential oils of *Psidium cattleianum* Sabine leaves and flowers: Anti-inflammatory and cytotoxic activities.** Frontiers in Chemistry, 11, 1120432, 2023. DOI: 10.3389/fchem.2023.1120432.

Fachel, F.N.S. et al. **Glioprotective Effect of Chitosan-Coated Rosmarinic Acid Nanoemulsions Against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Astrocyte Primary Cultures.** Cellular and Molecular Neurobiology, 40, 123–139, 2020. DOI:10.1007/s10571-019-00727-y.

Farias D. P. et al. **A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims.** Food Chemistry, 306, 15, 125630, 2020. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125630.

Feridoni, S. B., Shurmasti, D. K. **Effect of the nanoencapsulated sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract with carboxymethylcellulose on quality and shelf life of chicken nugget.** Food Science & Nutrition, 8, 7, 3704-3715, 2020. Doi: 10.1002/fsn3.1656.

Fernandes S. P. et al. **Inactivation of astrocytic glutamine synthetase by hydrogen peroxide requires iron.** Neuroscience Letters, 490, 1, 18, 27-30, 2011. DOI:10.1016/j.neulet.2010.12.019.

Filho, A. V. et al. **Brazilian Agroindustrial Wastes as a Potential Resource of Bioactive Compounds and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities.** Molecules, 27, 20, 6876, 2022. DOI: 10.3390/molecules27206876.

Forman H. J., Zhang H., Rinna A. **Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis.** Molecular Aspects of Medicine, 30, Issues 1–2, 1-12, 2009. DOI:10.1016/j.mam.2008.08.006.

Gali L., Pirozzi A., Donsì F. **Biopolymer- and Lipid-Based Carriers for the Delivery of Plant-Based Ingredients.** Pharmaceutics, 13, 15, 3, 927, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15030927.

Gentile, M.T. et al. **Neuro-Nutraceutical Polyphenols: How Far Are We?** Antioxidants, 21, 12, 3, 539, 2023. DOI: 10.3390/antiox12030539.

Glorieux, C., Calderon, P.B. **Targeting catalase in cancer,** Redox Biology, 77, 103404, 2024. DOI: 10.1016/j.redox.2024.103404.

Gómez-Mascaraque, L. G., Lopez-Rubio, A. **Production of food bioactive-loaded nanoparticles by electrospraying.** Nanoencapsulation in the Food Industry, 3, 3, 107-149, 2019. DOI:10.1016/B978-0-12-815671-1.00003-2.

Grabska-Kobyłecka I. et al. **Polyphenols and Their Impact on the Prevention of Neurodegenerative Diseases and Development.** Nutrients, 15, 15, 3454, 2023. DOI: 10.3390/nu15153454.

Haider M. S., Jaskani M. J., Fang J. **Overproduction of ROS: underlying molecular mechanism of scavenging and redox signaling.** Biocontrol Agents and Secondary Metabolites: Applications and Immunization for Plant Growth and Protection, 14, 347-382, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-822919-4.00014-4.

Ionescu-Tucker A., Cotman C. W. **Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease.** Neurobiology of Aging, 107, 86-95, 2021. DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014.

Jomova K. et al. **Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging.** Archives of Toxicology, 97, 2499–2574, 2023. DOI: 10.1007/s00204-023-03562-9.

Jomova K. et al. **Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants.** Archives of Toxicology, 98, 5, 1323-1367, 2024. DOI: 10.1007/s00204-024-03696-4.

Kasaai M. R. **Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review.** Trends in Food Science & Technology, 79, 184-197, 2018. DOI:10.1016/j.tifs.2018.07.015.

Kirk T., Ahmed A., Rognoni E. **Fibroblast Memory in Development, Homeostasis and Disease.** Cells, 10, 11, 2840, 2021. Doi:10.3390/cells10112840.

Kostoff R. N. et al. **Adverse health effects of 5G mobile networking technology under real-life conditions.** Toxicology Letters, 232 35–40, 2020. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.01.020.

Li, H. et al. **Zein/soluble soybean polysaccharide composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of lutein.** Food Hydrocolloids, Volume 103, 105715, 2020. DOI:10.1016/j.foodhyd.2020.105715.

Li M., Yu M. **Development of a nanoparticle delivery system based on zein/polysaccharide complexes.** Journal of Food Science, 85, 12, 2020. DOI:10.1111/1750-3841.15535.

Liu X. et al. **Anthocyanin attenuates pulmonary arterial hypertension and associated heart failure via improving mitochondrial function through Nrf2-dependent mechanism.** Clinical and Experimental Hypertension, 47,1, 2025. DOI:10.1080/10641963.2025.2503805.

Luduvico, K. P. et al. **Electrospraying and electrospinning of tannic acid-loaded zein: Characterization and antioxidant effects in astrocyte culture exposed to E. coli lipopolysaccharide.** International Journal of Biological Macromolecules, 267, 1, 131433, 2024. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.131433.

Machado, P. G. et al. **Exploring Anthocyanin and Free and Bound Phenolic Compounds from Two Morphotypes of Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by LC-ESI-QqQ-MS/MS.** Foods, 12, 17, 3230, 2023. DOI: 10.3390/foods12173230.

Mallmann L.P. et al. **Comprehensive Identification and Quantification of Unexploited Phenolic Compounds from Red and Yellow Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by LC-DAD-ESI-MS/MS.** Food Research International, 131,108978, 2020. DOI:10.1016/j.foodres.2020.108978.

Mariutti, L.R.B. **Lipid Peroxidation (TBARS) in Biological Samples.** In: Betim Cazarin, C.B. (eds) Basic Protocols in Foods and Nutrition. Methods and Protocols in Food Science. Humana, New York, NY, 2022. DOI:10.1007/978-1-0716-2345-9_7.

Munieweg, F. R. et al. **Antiproliferative Cancer Cell and Fungicidal Effects of Yellow and Red Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) Fruit Extract.** Foods, 12, 23, 4307, 2023. DOI: 10.3390/foods12234307.

Nishimura Y. et al. **Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity.** Oxidative Medicine Cellular Longevity, 6685204, 2021. DOI: 10.1155/2021/6685204.

Nolfi-Donagan D., Braganza A., Shiva S. **Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement.** Redox Biology, 37, 101674, 2020. DOI:10.1016/j.redox.2020.101674.

Norden D. M. et al. **TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation.** *Glia*, 25, 62, 6, 881–895, 2014. DOI:10.1002/glia.22647.

Oliveira, P. S. et al. **Brazilian native fruit extracts act as preventive agents modulating the purinergic and cholinergic signalling in blood cells and serum in a rat model of metabolic syndrome.** *Physiology and Biochemistry*, 1–8, 2020. doi:10.1080/13813455.2020.1743723.

Oliveira, P. S. et al. **Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome.** *Metabolic Brain Disease*, 33, 5, 1551-1562, 2018. DOI: 10.1007/s11011-018-0262-y.

Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., Holsinger, D. R. M. **Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders.** *Antioxidants*, 12, 2, 517, 2023. DOI:10.3390/antiox12020517.

Pacheco S.M. et al. **Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 193-204, 2018. DOI:10.1016/j.jnutbio.2018.02.014.

Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. **Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease.** *Physiological Reviews*, 87, 1, 2007. DOI:10.1152/physrev.00029.2006.

Padilla-Hernández, C. I. et al. **Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with *Psidium cattleianum* Leaves Extracts as Reducing Agent: Influence of Extraction Method on Physicochemical and Biological Activities.** *Physchem*, 5, 17, 2025. DOI: 10.3390/physchem5020017.

Patel A. et al. **Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles.** *Soft Matter*, 24, 6, 6192-6199, 2010. DOI: 10.1039/C0SM00800A.

Pereira, E. S. et al. **Characterization of araçá fruits (*Psidium cattleianum* Sabine): Phenolic composition, antioxidant activity and inhibition of α -amylase and α glucosidase.** *Food Bioscience*, 37, 2020. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100665.

Qi, Y. et al. **Brain delivery of quercetin-loaded exosomes improved cognitive function in AD mice by inhibiting phosphorylated tau-mediated neurofibrillary tangles.** Drug Delivery, 27, 1, 745–755, 2020. DOI: 10.1080/10717544.2020.1762262.

Rekatsina M. et al. **Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review.** Advances in Therapy, 37, 113–139, 2020. DOI: 10.1007/s12325-019-01148-5.

Rosário F. M. et al. **Red araçá pulp microencapsulation by hydrolyzed pinhão starch, tara, and arabic gums.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 101, 5, 2052-2062, 2021. DOI:10.1002/jsfa.10825.

Salkeni M. A. Naing A. **Interleukin-10 in cancer immunotherapy from bench to bedside.** Trends Cancer, 14;9(9):716–725, 2023. DOI: 10.1016/j.trecan.2023.05.003.

Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. **Biology and therapeutic potential of interleukin-10.** Journal of Experimental Medicine, 217 (1): e20190418, 2020. DOI:10.1084/jem.20190418.

Shan X. et al. **The Protective Effect of Cyanidin-3-Glucoside on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through Ferroptosis.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 6:2021:8880141, 2021. DOI: 10.1155/2021/8880141.

Sharifi-Rad, M. et al. **Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases.** Frontiers in Physiology, 11, 694, 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.00694.

Silvestro, S., Bramanti, P., Mazzon, E. **Role of Quercetin in Depressive-Like Behaviors: Findings from Animal Models.** Applied Sciences, 11,15, 7116, 2021. DOI: 10.3390/app11157116.

Simões, W. S. et al. **Antitumoral Activity of Electrospray-Nanoencapsulated Tannic Acid on C6 and U87MG Glioblastoma Cell Lines.** Bionanoscience. 14, 2886–2898, 2024. DOI: 10.1007/s12668-024-01497-8.

Soares M.S.P. et al. **The proctetive action of Rubus sp. fruit extract against oxidative damage in mice exposed to lipopolysaccharide.** *Neurochemical Research*, 46, 1129–1140, 2021. DOI: 10.1007/ s11064-021-03248-7.

Spohr L. et al. **Blueberry Extract Modulates Brain Enzymes Activities and Reduces Neuroinflammation: Promising Effect on Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior.** *Neurochemical Research*, 48, 846–861, 2023. DOI: 10.1007/s11064-022-03813-8.

Tadele D. T., Islam M. S., Mekonnen T.H. **Zein-based nanoparticles and nanofibers: Co-encapsulation, characterization, and application in food and biomedicine.** *Trends in Food Science & Technology*, 155, 104809, 2025. DOI:10.1016/j.tifs.2024.104809.

Tanhaei, A. et al. **Electrospraying as a novel method of particle engineering for drug delivery vehicles.** *Journal of Controlled Release*, 330, 851-865, 2021. DOI:10.1016/j.jconrel.2020.10.059.

Tavares, W. de S. et al. **Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and antibacterial activities.** *Journal of Molecular Liquids*, 341, 116915, 2021. DOI:10.1016/j.molliq.2021.116915.

Tvrđá, E., Benko, F. **Free radicals: what they are and what they do.** *Pathology*, 3,13, 2020. DOI:10.1016/b978-0-12-815972-9.00001-9.

Valles S. L. et al. **Functions of Astrocytes under Normal Conditions and after a Brain Disease.** *International Journal of Molecular Science*, 24(9), 8434, 2023. DOI:10.3390/ijms24098434.

Wróbel-Biedrawa, D. et al. **A Flavonoid on the Brain: Quercetin as a Potential Therapeutic Agent in Central Nervous System Disorders.** *Life*, 12, 4 ,591, 2022. DOI: 10.3390/life12040591.

Xu, Y., Wei, Z., Xue, C. **Pickering emulsions stabilized by zein-gallic acid composite nanoparticles: Impact of covalent or non-covalent interactions on storage stability, lipid oxidation and digestibility.** *Food Chemistry*, 408, 135254, 2023. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.135254.

Yang Y. et al. **Purification of anthocyanins from extracts of red raspberry using macroporous resin.** International Journal of Food Properties, 18, 5, 1046-1058, 2015. DOI: 10.1186/s10020-023-00642-5.

You L. et al. **Astrocyte hepcidin is a key factor in LPS-induced neuronal apoptosis.** Cell Death and Disease, 8, 3, 2676, 2017. DOI: 10.1038/cddis.2017.93.

Yusuf, A. et al. **Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems.** Polymers, 15, 7, 1596, 2023. DOI:10.3390/polym15071596.

Zandoná, G. P. et al. **Extraction and characterization of phytochemical compounds from araçazeiro (Psidium cattleianum) leaf: Putative antioxidant and antimicrobial Properties.** Food Research International, 137, 109573, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109573.]

Zhao Y. et al. **Astrocyte-Mediated Neuroinflammation in Neurological Conditions.** Biomolecules, 14,10, 1204, 2024. DOI:10.3390/biom14101204.

Zou Y. et al. **Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility.** Food Hydrocolloids, 120, 106980, 2021. DOI:10.1016/j.foodhyd.2021.106980.

ANEXOS



PARECER Nº
PROCESSO Nº

1/2023/CEUA/REITORIA
23110.035420/2022-89

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação farmacológica de produtos naturais encapsulados pela técnica de electrospraying em modelo animal de comportamento tipo-depressivo**”, registrada com o nº **23110.035420/2022-89**, sob a responsabilidade de **Francieli Moro Stefanello** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas, em reunião de 23/09/2022.

Finalidade	(x) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	Início: 15/10/2022	Término: 15/10/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss <i>Rattus norvegicus</i> / Wistar	
Nº de animais	300 camundongos 36 ratos	
Idade	60 dias - camundongos	

	1-3 dias - ratos
Sexo	Machos - camundongos Não estipulado - ratos
Origem	Biotério Central - UFPeI

Código para cadastro nº **CEUA 035420/2022-89**

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior**, em 30/01/2023, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2031164** e o código CRC **539A7821**.

Referência: Processo nº 23110.035420/2022-89

SEI nº 2031164