



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

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama *in vitro*

MARINA CARVALHO SAMPAIO

BRASÍLIA

2017

MARINA CARVALHO SAMPAIO

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Profa. Dra.
Graziella Anselmo Joanitti

BRASÍLIA
2017

MARINA CARVALHO SAMPAIO

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama *in vitro*

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
(Orientadora)

Profa. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro
(Membro titular)

Profa. Dra. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão
(Membro titular)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
(Suplente)

Brasília, 22 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer principalmente à minha mãe Januária e à minha mãe do coração Emilia por me apoiarem nos momentos de ansiedade e por serem tão compreensivas.

O professor Ricardo Bentes me acolheu e me deu a oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Sem este voto de confiança, não teria feito todo o presente trabalho. Muito obrigada, professor!

À minha orientadora, professora Graziella, por ser tão paciente, pelos ensinamentos e também por sempre dar apoio nos momentos difíceis. Sua orientação foi fundamental neste caminho. Também devo agradecer ao grupo de alunos da professora, por ser um grupo unido, todos sempre dispostos a ajudar e também por ser um grupo tão alegre! Um especial agradecimento à Alicia, Patrícia e Victor por sempre estarem ao meu lado nos experimentos e desabafos.

À Dona Zélia, por sempre estar disponível para ajudar e sempre carinhosa. A senhora é um anjo do nosso laboratório.

Ao professor Juliano Chaker pela disposição e auxílio nos experimentos.

Aos professores Marcella, Susana e Marcelo por aceitarem gentilmente participar da banca examinadora do mestrado.

Aos meus amigos e colegas do laboratório. Aprendi muito com todos vocês!

Aos meus amigos que não trabalham no laboratório, mas que também acompanharam e me animaram durante todo o período do mestrado.

À UnB por disponibilizar as instalações e proporcionar o apoio intelectual para o trabalho.

Por fim, à CAPES, CNPq, INCT de Nanobiotecnologia e FAP-DF pelo financiamento do projeto e bolsa de estudo.

RESUMO

O câncer de mama representa a principal causa de mortalidade no Brasil e é a enfermidade com maior taxa de diagnósticos entre as mulheres no mundo. É uma doença que apresenta várias peculiaridades como a resistência às terapias. Há cerca de 20 subtipos e os tratamentos mais comuns são cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, ou são mutiladores ou levam a severos efeitos adversos e não são específicos, já que também atingem células saudáveis. Para contornar estes fatores, os nanomedicamentos estão em ampla fase de pesquisa e estudo. São medicamentos na escala nanométrica e, devido a características ópticas, físico-químicas, eletrônicas e à capacidade de se ligarem a anticorpos, são medicamentos inovadores para conduzir o princípio ativo até o sítio de ação. Nanoemulsões são um dos tipos de nanomedicamentos e podem ser empregadas como adjuvantes na terapia contra o câncer de mama, pois conseguem aumentar a biodistribuição e manter o nível estável da concentração de medicamentos no organismo. Como a flora brasileira é ainda pouco estudada para o desenvolvimento de medicamentos e por apresentar uma elevada taxa de antioxidantes, o óleo do fruto da palmeira de buriti (*Mauritia flexuosa*) foi avaliado no presente trabalho. Foram desenvolvidos quatro tipos de nanoemulsões à base deste óleo com sucesso e boa estabilidade a 4°C. Ensaio de viabilidade celular em células de câncer de mama apresentaram uma citotoxicidade bastante significativa da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (BuNE-) e da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido 1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (BuNE+DOTAP), enquanto que em células saudáveis de fibroblasto apresentaram um aumento da viabilidade celular. Portanto, demonstram um potencial para um novo medicamento cicatrizante. Corroborando com o ensaio de viabilidade celular em células de câncer de mama, o teste de exposição à fosfatidilserina demonstrou que estas nanoemulsões levam à morte celular por meio de apoptose ou apoptose tardia. Estas nanoemulsões não levaram à fragmentação do ADN, a alteração do potencial de membrana mitocondrial e lesão de membrana plasmática em células de câncer de mama. A BuNE- alterou o padrão do ciclo celular: houve um aumento de células na fase S enquanto que houve uma diminuição na quantidade de células na fase G2/M. Pode-se concluir do presente trabalho que nanoemulsões à base de buriti foram desenvolvidas com sucesso, são estáveis e apresentam um potencial para um novo tratamento adjuvante contra o câncer de mama.

Palavras-chave: nanobiotecnologia, nanomedicina, nova abordagem terapêutica, produto natural, buriti, *Mauritia flexuosa*, óleo, carcinoma de mama, cicatrização.

ABSTRACT

Breast cancer is the major cause of diagnosis among women worldwide and the major cause of mortality of Brazilian women. It is a disease that presents diverse peculiarities as the resistance to the therapies. The most common treatments are surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, they lead to severe adverse effects and are not specific to the cancer cells. To avoid these peculiarities, nanomedicine is the key. They are drugs at the nanometer scale and due to their physical, physicochemical, electronic and characteristics, they are innovative and can drive the drug directly to the cancer. Nanoemulsions, which are one of the tools of nanomedicine, can be used as adjuvants in breast cancer therapy because they can increase drug biodistribution. There are few studies about Brazilian flora for the development of new drugs. Buriti (*Mauritia flexuosa*), which is the most abundant palm in Brazil, was evaluated in the present study. Four types of nanoemulsions based on buriti oil were successfully developed and presented stability at 4 ° C. Cell viability assays in breast cancer cells showed a high cytotoxicity of buriti oil nanoemulsions (BuNE- and BuNE+DOTAP), whereas in fibroblasts, cell viability was higher. As a result, these nanoemulsions demonstrate a potential for a new cicatrization medicine. Corroborating with cell viability assay in breast cancer cells, Annexin V-FITC assay demonstrated that these nanoemulsions lead to cell death through apoptosis or late apoptosis. There were no DNA fragmentation, alteration of mitochondrial transmembrane potential nor lesion of plasma membrane in breast cancer cells. BuNE- altered the cell cycle pattern: there was an increase of cells in S phase whereas there was a reduction in the amount of cells in the G2 / M phase. It can be concluded that buriti oil nanoemulsions were developed successfully and are stable. In addition, they have the potential for a new adjuvant treatment against breast cancer.

Keywords: nanobiotechnology, nanodrug, natural medicine, buriti, *Mauritia flexuosa*, oil, breast cancer, healing process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais marcadores das células tumorais (“Hallmarks of cancer”)	3
Figura 2. Dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 no Brasil (exceto pele não melanoma)	4
Figura 3. Exemplos de nanoestruturas.....	6
Figura 4. Entrega passiva de nanopartículas na célula cancerígena.....	7
Figura 5. Entrega ativa de nanopartículas na célula cancerígena.....	8
Figura 6. Nanoemulsão óleo em água (O/A).....	9
Figura 7. Palmeira e fruto do buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>).. ..	10
Figura 8. Deacetilação da quitina para a formação de quitosana	12
Figura 9. Fórmula estrutural do DOTAP (“1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-trimethylammonium propane”).....	13
Figura 10. Fórmula estrutural do PEG “polyoxyl stearate”	14
Figura 11. Desenho experimental.....	17
Figura 12. Representação das soluções utilizadas nos ensaios biológicos	20
Figura 13. Fotos das nanoemulsões à base de óleo de buriti.....	27
Figura 14. Fotos dos brancos das nanoemulsões à base de óleo de buriti.....	28
Figura 15. Gráficos da análise de estabilidade das nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) armazenadas a 4°C e a Temperatura Ambiente	31
Figura 16. Comportamento dos parâmetros físico-químicos das nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) quando submetidas a diferentes pHs.....	354
Figura 17. Comportamento dos parâmetros físico-químicos das nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) quando submetidas a diferentes diluições.....	36
Figura 18. Gráfico de viabilidade celular de células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL.. ..	38
Figura 19. Gráfico de viabilidade celular de células de câncer de mama MCF-7 após 72 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL	40
Figura 20. Gráfico de viabilidade celular de células saudáveis de fibroblasto murino NIH/3T3 após 24 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL	43

Figura 21. Gráfico de viabilidade celular de células saudáveis de fibroblasto murino NIH/3T3 após 72 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL	45
Figura 22. “Dot plots” dos ajustes dos padrões do citômetro de fluxo para análise do perfil de morte celular.....	48
Figura 23. “Dot plots” das células de câncer de mama MCF-7 tratadas por 24 horas com H ₂ O e H ₂ O ₂ , ambos a 360µg/mL, para análise do perfil de morte celular.....	49
Figura 24. “Dot plots” das células de câncer de mama MCF-7 tratadas por 24 horas com BuNE-, BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos para análise do perfil de morte celular na dose de 360µg/mL..	50
Figura 25. Gráfico da porcentagem de células de câncer de mama MCF-7 com fragmentação de (ADN) fragmentado e íntegro após 24 horas de exposição à H ₂ O, BuNE-, BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos, na dose de 360µg/mL.....	52
Figura 26. Gráfico das fases do ciclo celular de células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com H ₂ O, BuNE-, BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos, na dose de 360µg/mL	53
Figura 27. Gráfico da porcentagem do perfil do potencial de membrana mitocondrial em células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com H ₂ O, BuNE-, BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos, na dose de 360µg/mL.....	55
Figura 28. Gráfico da integridade de membrana plasmática após exposição de à H ₂ O, BuNE-, BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos, na dose de 360µg/mL por 24 horas em células de câncer de mama MCF-7.....	56
Figura 29. Gráfico da proliferação de células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de exposição à H ₂ O, BuNE-, BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos, na dose de 360µg/mL.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores das características físico-químicas das nanoemulsões à base de óleo de buriti logo após a formulação.	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4T1 – Células de câncer de mama murino metastático
- A431 – Células de câncer de pele não melanoma
- ADN - Ácido Desoxirribonucleico
- AgNPs – Nanopartícula de prata
- ARN – Ácido Ribonucleico
- BaNE - - Nanoemulsão à base de óleo de baru
- BuNE - Nanoemulsão à base de óleo de buriti
- BuNEs - Nanoemulsões à base de óleo de buriti
- BuNE- - Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície
- BuNE+DOTAP - Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*”
- BuNE+PEG – Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*”
- BuNE+Q - Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana
- C6 – Células malignas de glioma de rato
- CH-AgNPs – Nanopartícula de prata associada à quitosana
- CO₂ – Dióxido de Carbono
- CS – Carga de Superfície
- CTL - Controle
- DDA - Deacetilação
- DF – Distrito Federal
- DH – Diâmetro Hidrodinâmico
- DMEM – Meio Eagle modificado por Dubelcco
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DOTAP – “*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*”
- ELD - Espalhamento de Luz Dinâmico
- EUA – Estados Unidos da América
- ETOH – Etanol absoluto
- FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
- g – Força Gravitacional é a força exercida durante a centrifugação. É uma das unidades de medida deste processo
- G1 – Fase de crescimento da célula no ciclo celular

G2/M – Fase de divisão da célula no ciclo celular
GBM 8401 - células de glioblastoma multiforme humano
H₂O - Água
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HaCaT – Células de queratinócitos da pele humana
HCl – Ácido Clorídrico
IdP – Índice de Polidispersão
INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP – Iodeto de Propídeo
KHz – Quilohertz
L- - Controle da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície
L+DOTAP – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*”
L+PEG – Branco da nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*”
L+Q – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana
M - Massa
MCF-7 – Células de adenocarcinoma mamário humano não metastático
M. flexuosa – *Mauritia flexuosa*
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
mV - Milivolt
NaOH – Hidróxido de Sódio
NE- - Nanoemulsão à base de óleo de pequi
NE+CH - Nanoemulsão à base de óleo de pequi com quitosana
NIH/3T3 – Célula saudável de fibroblasto murino
NM – Nanometro
NP – Nanopartícula
O/A – Óleo em água
OL – Óleo livre de buriti
PBS – Tampão Fosfato-Salino
PEG – Sigla para PEG 40, estearato utilizado em algumas formulações
PEG 40 – “*Polyoxyl 40 stearate*”
pH – Potencial Hidrogeniônico

Q – Quitosana

Q1 – Quadrante 1

Q2 – Quadrante 2

Q3 – Quadrante 3

Q4 – Quadrante 4

Q.S.P.- Quantidade Suficiente Para

RNAse – Enzima que degrada o ARN

S- Fase de síntese do ciclo celular

SFB – Soro Fetal Bovino

T.A. – Temperatura Ambiente

UVA – Raio Ultravioleta A

UVB – Raio Ultravioleta B

SUMÁRIO

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 CÂNCER	3
2.2 CÂNCER DE MAMA	4
2.3 NANOTECNOLOGIA	5
2.4 NANOMEDICINA	6
2.5 NANOEMULSÕES	8
2.6 BURITI (<i>MAURITIA FLEXUOSA</i>)	9
2.6.1 <i>Quitosana</i>	11
2.6.2 <i>Fosfolipídio 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (DOTAP)</i>	12
2.6.3 <i>Polyoxyl 40 Stearate (PEG 40)</i>	13
3. Justificativa	15
4. Objetivos.....	16
4.1 OBJETIVO GERAL	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. Materiais e Métodos	17
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL	17
5.2 PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	17
5.2.1 <i>Síntese das BuNEs e dos Respetivos Brancos</i>	17
5.2.2 <i>Óleo livre de buriti (OL)</i>	18

5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS NANOEMULSÕES OBTIDAS.....	18
5.4	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES	19
5.4.1	<i>Análise de estabilidade de BuNEs após tempo de síntese</i>	<i>19</i>
5.4.2	<i>Análise de estabilidade de BuNEs após diluição em série</i>	<i>19</i>
5.4.3	<i>Análise de estabilidade de BuNEs após variação de pH</i>	<i>19</i>
5.5	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA <i>IN VITRO</i>	20
5.5.1	<i>Soluções utilizadas nos ensaios de avaliação dos efeitos biológicos.....</i>	<i>20</i>
5.5.2	<i>Teste de Viabilidade Celular – Ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol) após tratamento das células de câncer de mama, MCF-7, com BuNEs</i>	<i>21</i>
5.5.3	<i>Análise do perfil de morte celular de células de câncer de mama MCF-7 após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	<i>22</i>
5.5.4	<i>Análise da fragmentação de ADN e ciclo celular de células de câncer de mama MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	<i>23</i>
5.5.5	<i>Análise do potencial de membrana mitocondrial de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	<i>24</i>
5.5.6	<i>Análise da integridade de membrana e proliferação de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	<i>25</i>
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
6.	Resultados e Discussão.....	27
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	27
6.1.1	<i>Caracterização macroscópica das nanoemulsões.....</i>	<i>27</i>
6.1.2	<i>Caracterização macroscópica dos brancos.....</i>	<i>28</i>
6.1.3	<i>Caracterização dos parâmetros físico-químicos das nanoemulsões.....</i>	<i>28</i>
6.1.4	<i>Análise da estabilidade dos aspectos físico-químicos das nanoemulsões BuNE-, BuNE+Q, BuNE+DOTAP e BuNE+PEG armazenadas a 4°C e a temperatura ambiente.....</i>	<i>30</i>
6.1.5	<i>Análise de estabilidade de BuNEs após diluição em série e variação de pH</i>	<i>33</i>

6.2 Avaliação dos efeitos biológicos de nanoemulsões à base de óleo de buriti em células de câncer de mama <i>in vitro</i>	37
6.2.1 <i>Teste de Viabilidade Celular – Ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol) após tratamento das células de câncer de mama, MCF-7 e fibroblasto, NIH/3T3, com BuNEs</i>	37
6.2.1.1 MCF-7	37
6.2.1.2 NIH/3T3	42
6.2.2 <i>Análise do perfil de morte celular de células de câncer de mama MCF-7 após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	47
6.2.3 <i>Análise da fragmentação de ADN e ciclo celular de células de câncer de mama MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	51
6.2.4 <i>Análise do potencial de membrana mitocondrial de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	54
6.2.5 <i>Análise da integridade de membrana e proliferação de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP</i>	56
7. Conclusões	59
8. Referências Bibliográficas	60

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2017a), o câncer é “ um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo”. As causas que conduzem o surgimento desta doença podem ser divididas em dois tipos: causas internas, que é representada pela genética do indivíduo, e causas externas, como o ambiente e o hábito de vida da pessoa (INCA, 2017a).

O câncer de mama é mais incidente em mulheres, mas homens também podem desenvolver a neoplasia. O sexo masculino representa somente 1% dos casos diagnosticados no Brasil. É um tipo de câncer relativamente raro em mulheres que ainda não possuem 35 anos. Entretanto, a incidência de novos casos aumenta progressivamente a partir desta idade até os 50 anos da mulher. Além dos fatores de risco do câncer, o carcinoma mamário também pode ser desenvolvido devido a fatores endócrinos e à história reprodutiva (INCA, 2017b). Os tratamentos quimioterápicos geralmente levam a severos efeitos adversos e, como consequência, efeitos psicológicos negativos podem ser desencadeados devido a tais efeitos adversos morte (Lewis *et al.*, 2016). Outro tratamento para o câncer mamário é a retirada parcial ou total da mama. Tal procedimento é bastante mutilador e também atinge o psíquico da mulher (Makluf *et al.*, 2005).

Com o advento da nanotecnologia, a qual é uma área que trabalha em nível nanométrico e pode até mesmo manipular átomos (Nature, 2017), o desenvolvimento de novos medicamentos que não apresentem efeitos adversos é uma possível realidade. As células são estruturas milimétricas e apresentam proteínas em sua superfície. Há a possibilidade de formular nanopartículas que tenham ligantes específicos a proteínas presentes na superfície das células cancerígenas e, conseqüentemente, as células saudáveis não são atingidas (Tatar, 2016).

Nanoemulsões são um dos novos medicamentos que apresentam alto potencial para o tratamento do câncer. São nanoestruturas coloidais formadas por uma dispersão de dois líquidos imiscíveis. Para que ocorra a estabilidade deste sistema, as gotículas formadas são encapsuladas por um tensoativo (The University of Nottingham, 2017). Portanto, aumentam a capacidade de solubilidade de compostos hidrofóbicos e, por conseguinte, há também um aumento da biodistribuição destes compostos nos organismos (Ganta *et al.*, 2009; Gianella *et al.*, 2011;

Ragelle *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Bu *et al.*, 2014; Choudhury *et al.*, 2014; Ganta *et al.*, 2015; Fofaria *et al.*, 2016).

O óleo do fruto da palmeira do buriti (*Mauritia flexuosa*) é bastante empregado na medicina popular brasileira. Por possuir uma gama de compostos fitoquímicos (como β -caroteno, ácido palmítico e ácido linoleico) (Aquino *et al.* 2012) e por não haver estudos na literatura, este óleo é uma matéria-prima como princípio ativo em potencial para um novo medicamento contra o câncer de mama. A união das características do óleo de buriti e das nanoemulsões pode resultar em um tratamento mais efetivo e eficaz para tal neoplasia. Além disso, há a possibilidade de inserir na superfície das nanopartículas polímeros (como a quitosana e os estearatos de polioxietileno) e lipídeos (como “1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane”) para que a estabilidade das nanoemulsões e a permeação celular sejam aprimoradas, e que o sistema imune não detecte tão facilmente as nanopartículas (Payet; Terentjev, 2008; Hagigit *et al.*, 2010; Javid *et al.*, 2014; fraga, 2015; Goycoolea; Milkova, 2016). Assim, o presente trabalho visa ao desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de buriti cujas nanopartículas apresentem ou não polímeros e lipídeos em sua superfície para a avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer é uma das enfermidades mais complexas conhecidas, sendo a terceira causa principal de mortalidade no mundo (Luk *et al.*, 2012; Minko *et al.*, 2013). É caracterizada pela presença de células heterogêneas com mutações e desregulações epigenéticas que realizam interações particulares entre si e com o microambiente que as circundam. Essas interações levam a alterações morfológicas, funcionais e moleculares (HANAHAN & WEINBERG, 2011; Videira *et al.*, 2014). Dentre as características do câncer, conhecidas como os marcadores tumorais (“*Hallmarks of cancer*”), ilustradas na figura 1, destacam-se a replicação descontrolada; imortalidade das células; insensibilidade a sinais supressores de crescimento e aos sinais de apoptose; indução da angiogênese; ativação da invasão e metástase em outros órgãos; reprogramação do metabolismo energético; instabilidade genômica e mutabilidade; fuga à destruição imunológica; e promoção da inflamação (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

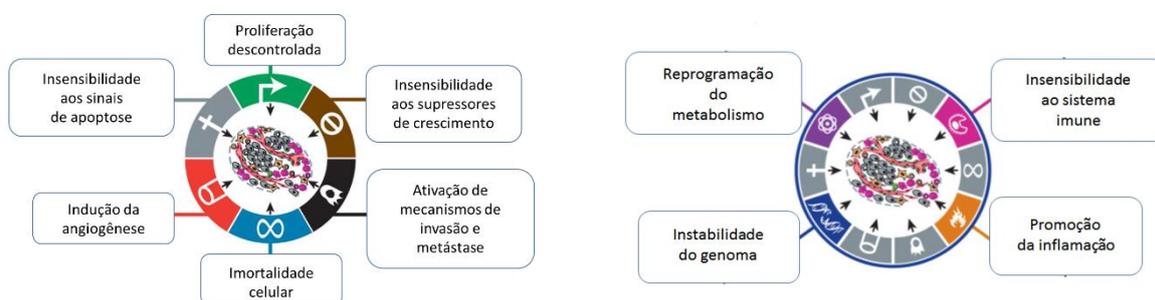


Figura 1. Representação esquemática dos principais marcadores das células tumorais (“*Hallmarks of cancer*”). Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

Os principais tratamentos para o câncer são cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, não são totalmente eficazes, já que algumas células tumorais podem permanecer no organismo após tais terapias. Além disso, a quimioterapia não é considerada um tratamento específico, pois atinge células saudáveis e, por conseguinte, induz diversos efeitos adversos como náuseas, fadiga, cardiotoxicidade, neuropatia periférica, perda capilar, febre, dor de cabeça, e até mesmo a demais efeitos de longo prazo como cânceres secundários, problemas cognitivos, de crescimento e pulmonar (Minko *et al.*, 2013; Stan *et al.*, 2014; Terence, 2014; Tatar *et al.*, 2016). Adicionalmente, o tumor também pode deixar de responder aos

quimioterápicos, adquirindo resistência aos medicamentos (Minko *et al.*, 2013). Cerca de 14 milhões de novos casos são diagnosticados anualmente no mundo (WHO, 2017).

2.2 CÂNCER DE MAMA

Dentre as mulheres, o câncer de mama é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada e de maior incidência no mundo. No Brasil é a principal causa de mortalidade entre pacientes com câncer: de 2008 a 2012, 63.302 mulheres faleceram devido a esta doença (Mendonça *et al.*, 2004). Este número cresce a cada ano e para 2016, a estimativa de novos casos é em torno de 57.960 (Figura 2) (INCA, 2017c).



	Localização primária	casos novos	%
Mulheres	Mama Feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do Útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do Útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 no Brasil, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10). Adaptado de INCA, 2017c.

O câncer de mama é uma enfermidade heterogênea quanto à clínica e a morfologia. Há em torno de 20 subtipos como o ductal, lobular, tubular, mucinoso, medular, micropapilar e o papilar (INCA, 2017d). Tal câncer é mais frequente em mulheres que estão no início da menopausa devido às alterações hormonais (Mendonça *et al.*, 2004; Samavat *et al.*, 2014). Os fatores de risco são multifatoriais e, além da idade, são o histórico familiar da neoplasia, o consumo de álcool, o excesso de peso, o sedentarismo e a exposição à radiação ionizante (INCA, 2017d). De 20 a 30% das pacientes podem apresentar recorrência do câncer de mama,

o que leva a uma maior probabilidade de desenvolver metástase (Lobbezoo *et al.*, 2015). Além de sofrerem com os efeitos adversos que os medicamentos tradicionais provocam, tais mulheres têm um grande impacto emocional negativo em suas vidas. Podem desenvolver depressão, se isolam e sofrem um medo ainda maior em relação ao progresso da doença e da morte (Lewis *et al.*, 2016). Embora a quimioterapia seja um dos tratamentos convencionais mais efetivos no combate de metástases, geralmente a terapia é pouco efetiva para essas células de câncer, pois elas desenvolvem resistência a múltiplos medicamentos (Qiu *et al.*, 2014).

Além dos desafios já descritos para os tratamentos de neoplasias, o câncer de mama tem um fator agravante, pois a cirurgia pode ser mutiladora e as pacientes apresentam uma probabilidade ainda maior de problemas psíquicos, emocionais e sociais (Makluf *et al.*, 2005). O impacto é mais acentuado em mulheres entre 15 a 39 anos, já que estão em fase reprodutiva. O câncer de mama é mais agressivo nas mulheres nesta faixa etária. Elas estão mais predispostas a ter um câncer de mama recorrente e a taxa de progressão e mortalidade é maior quando comparada com pacientes em idade mais avançada (Assi *et al.*, 2013; Tichy *et al.*, 2013; Gewefel *et al.*, 2014).

2.3 NANOTECNOLOGIA

Uma área nova que apresenta grande potencial para transpor as barreiras na luta contra o câncer é a nanotecnologia, a qual foi inicialmente proposta em 1959 por Richard Feynman durante a palestra “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” para a Sociedade Americana de Física. Tal ramo da ciência apresenta o potencial de manipular e organizar estruturas desde o nível molecular até o atômico (Allan, 2003), ou seja, na escala nanométrica. As nanoestruturas são diferentes das estruturas convencionais não só pelo tamanho, mas também pela organização e ordem da mecânica quântica (Leary, 2010). Há vários tipos de nanoestruturas, como pode ser visto na figura 3: nanotubos de carbono, fulerenos, “*quantun dots*”, lipossomos e nanopartículas magnéticas.

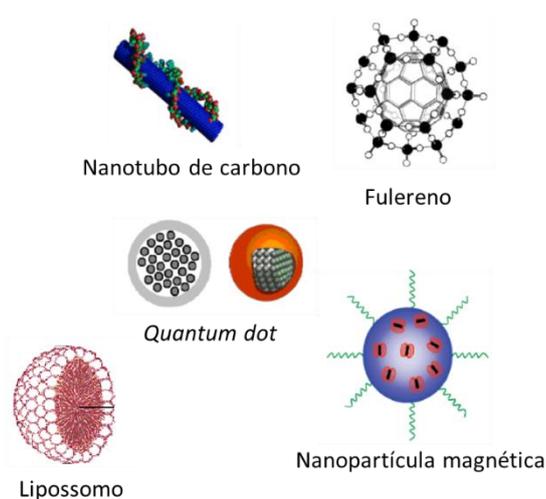


Figura 3. Representação esquemática de tipos de nanoestruturas. Adaptado de Mansoori *et al.*, 2007.

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar e possui aplicações nas áreas da medicina, engenharia, física, química, biologia, entre outras (Ferrari, 2005). Dentre essas áreas deve-se destacar a nanomedicina. Esta área tem promovido várias mudanças na medicina tradicional: há a possibilidade de unir terapêutica com diagnóstico; de reduzir a dose necessária para atingir o efeito desejado; e de direcionar os medicamentos convencionais para o alvo a ser tratado, diminuindo assim os efeitos adversos (Key, 2014). Em diversos tratamentos terapêuticos, moléculas situadas dentro das células muitas vezes não são atingidas e há a dificuldade de transpor barreiras biológicas, como a hematoencefálica. Por trabalhar na escala nanométrica, a nanomedicina apresenta a capacidade de atingir tais moléculas e transpor mais facilmente essas barreiras biológicas (Tatar, 2016).

2.4 NANOMEDICINA

A nanomedicina é especialmente relevante no combate ao câncer. Devido às suas propriedades eletrônica, ótica e catalítica e à capacidade de serem carregadas com medicamentos quimioterápicos, genes ou anticorpos, as nanopartículas podem ser direcionadas para as células cancerosas (Tatar, 2016). As nanopartículas são unidades ultrafinas cujas dimensões são medidas em nanômetros (Britannica Academic, 2017) e têm a capacidade de encapsular fármacos pouco solúveis (Kipp, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Bertrand *et al.*, 2014), além de melhorar a biodistribuição de medicamentos (Bertrand *et al.*, 2012; Bertrand *et al.*, 2014). Os tumores, ao alcançarem um determinado nível de desenvolvimento, aumentam a

taxa de angiogênese e, muitas vezes, os vasos sanguíneos não são completamente desenvolvidos (Bates *et al.*, 2002; Bertrand *et al.*, 2014). Como resultado, os capilares apresentam um maior número de fenestras, as quais configuram espaços de 200 a 2000 nm (Hobbs *et al.*, 1998; Bertrand *et al.*, 2014). As neoplasias também são caracterizadas por uma deficiente estrutura de vasos linfáticos e, por conseguinte, há uma menor drenagem do fluido intersticial. A presença de fenestras e a deficiente drenagem dos coloides faz com que nanopartículas permaneçam por mais tempo no tumor. A união desses fenômenos é conhecida por entrega passiva, como ilustrado na Figura 4 (Jang *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2014). Paralelamente à entrega passiva, há a entrega ativa (Figura 5), a qual é baseada na conjugação de nanopartículas a ligantes específicos de receptores tumorais. Assim, o fármaco é direcionado às células malignas e os efeitos adversos são minimizados. Com a entrega ativa, também há a possibilidade de levar vários medicamentos em doses maiores ao alvo e transpor as barreiras biológicas (Ferrari, 2005; Harris *et al.*, 2007; Bonifácio *et al.*, 2014).

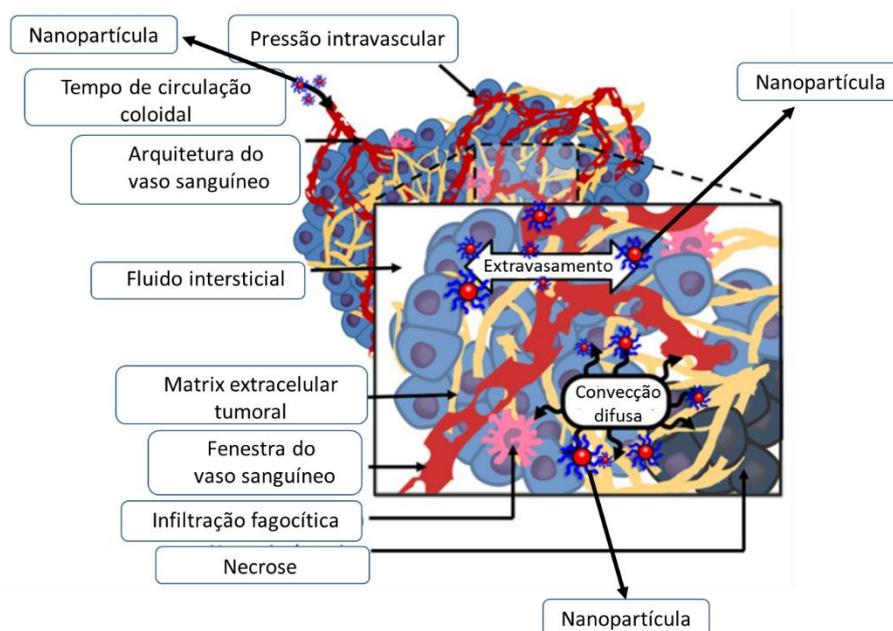


Figura 4. A entrega passiva ocorre devido ao extravasamento coloidal dos vasos sanguíneos na matriz extracelular tumoral. Adaptado de Bertrand *et al.*, 2014.

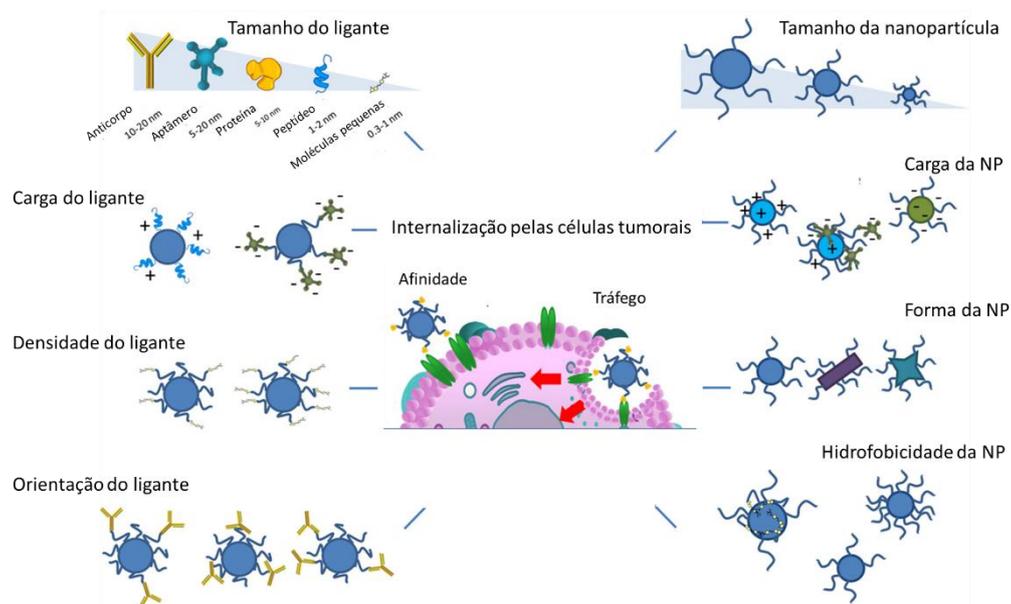


Figura 5. As propriedades físico-químicas dos ligantes e das nanopartículas (NP) promovem o aumento da internalização de medicamentos nas células cancerígenas. Adaptado de Bertrand *et al.*, 2014.

2.5 NANOEMULSÕES

Nanoemulsões são carreadores que surgiram com o advento da nanomedicina. São nanoestruturas coloidais formadas por uma dispersão de óleo em água (O/A) (Figura 6) ou água em óleo (A/O) e estabilizadas por uma monocamada de moléculas surfactantes. Apresentam partículas de tamanhos menores que 300 nm e são cineticamente estáveis, diferentemente das microemulsões, que são termodinamicamente estáveis. Quantidades consideráveis de medicamentos hidrofóbicos podem ser encapsulados nas nanoemulsões. Em tal forma farmacêutica, esses medicamentos apresentam melhor dissolução *in vitro* e biodisponibilidade *in vivo* (Ganta *et al.*, 2009; Gianella *et al.*, 2011; Ragelle *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Bu *et al.*, 2014; Choudhury *et al.*, 2014; Ganta *et al.*, 2015; Fofaria *et al.*, 2016). Portanto, o desenvolvimento de nanoemulsões para terapia contra o câncer é promissor.



Figura 6. Representação esquemática de uma nanoemulsão óleo em água (O/A). Adaptado de The University of Nottingham, 2017.

2.6 BURITI (*MAURITIA FLEXUOSA*)

A flora brasileira apresenta inúmeras espécies de plantas. Árvores de andiroba, caju, macaúba e baru são alguns dos exemplos de espécies dessa vasta flora (CARTAXO et al., 2010). Uma espécie que merece destaque é a palmeira mais abundante da flora brasileira (Rossi et al., 2014): *Mauritia flexuosa* (Figura 7A), pertencente à família Arecaceae (Koolen et al., 2013a). É popularmente conhecida como buriti e é encontrada nos ecossistemas da Amazônia e Cerrado, e abrange o Distrito Federal (DF) (Villalobos, 1994; Gonçalves et al., 2006; Gilmore et al., 2013). No DF, é amplamente distribuída por áreas rurais úmidas, ambientes periurbanos e reservas ecológicas (Gurgel-Gonçalves et al., 2006). Possui um elevado valor econômico, sendo empregada na indústria alimentícia, têxtil e farmacêutica. Seu fruto (Figura 7B) é fonte de alimento e óleo; as folhas servem para a fabricação decanoas; o pecíolo é utilizado na fabricação de esteiras e bolsas; e do tronco retiram-se larvas de besouro para uso como isca de peixe ou na alimentação (Endress et al., 2013; Gilmore et al., 2013).

A**B**

Figura 7. A) Palmeira do buriti (*Mauritia flexuosa*). B) Fruto da palmeira do buriti. (Elaborada pelo próprio autor, 2016).

O óleo de buriti é amplamente utilizado na medicina popular brasileira. Segundo a população que pratica tal medicina, este óleo possui propriedades vermífugas, analgésicas, antimicrobianas e antiplaquetárias (Fuentes *et al.*, 2013; Koolen *et al.*, 2013a; Oliveira *et al.*, 2013). E estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial do óleo na aplicação para trombose (Martins *et al.*, 2012), cicatrizante (Batista *et al.*, 2012) e para o tratamento do câncer (Koolen *et al.*, 2013b). Da raiz da palmeira foi obtido um novo triterpeno: o ácido maurítico. Tal composto apresentou significativa redução da viabilidade celular em células de câncer de ovário, pulmão e próstata metastático (Koolen *et al.*, 2013b). O buriti é uma rica fonte de fitoquímicos antioxidantes como ácido fenólico, flavonoides, tocoferóis, vitamina E e caroteno (Zanatta *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010; Aquino *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013). Tais agentes neutralizam as ações dos radicais livres, os quais são moléculas orgânicas e inorgânicas extremamente instáveis por possuírem um ou mais elétrons não pareados na camada de valência (Halliwell, 1990; Ribeiro, 2010). Quando presentes em excesso, os radicais livres podem desencadear alterações nas atividades celulares, que levam ao envelhecimento, depleção imune e doenças degenerativas como o câncer (Sies, 1995; Anderson, 1996; Aust *et al.*, 2001; Álvares-González *et al.*, 2004; Zanatta *et al.*, 2008; Ribeiro, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010; Coimbra *et al.*, 2013, Koolen *et al.*, 2013b).

A radiação UVA leva ao aumento de radicais livres no organismo (Morita *et al.*, 2000; Zanatta *et al.*, 2010) enquanto que a radiação UVB induz danos ao ADN promovendo o câncer (Ichihashi *et al.*, 2003; Zanatta *et al.*, 2010). Testes realizados com o óleo de buriti demonstraram que este é um agente em potencial para ser incorporado a protetores solares devido às altas concentrações de carotenoides, os quais são compostos com proteção aos danos fotooxidativos (Stahl *et al.*, 2007; Merzlyak, *et al.*, 2008; Zanatta *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, muitas substâncias antioxidantes também apresentam propriedades antimutagênicas (Antunes *et al.*, 2000, Ribeiro *et al.*, 2010). Estudos com o óleo de buriti demonstraram que este óleo apresenta uma significativa atividade antimutagênica e protege o ADN contra as injúrias dos radicais livres (Ribeiro, 2010).

Por conseguinte, o óleo de buriti é um agente em potencial para o tratamento de neoplasias. No entanto, por apresentar caráter hidrofóbico, o óleo de buriti não é adequadamente administrado pela via endovenosa, principal via de administração de agentes antitumorais (ONCOGUIA, 2012). Um dos meios para superar este desafio é veiculá-lo na forma de uma nanoemulsão.

Apesar do óleo de buriti ser apontado como um potencial agente antitumoral, até o presente momento, ainda não há relatos na literatura sobre a análise de seus efeitos em células de câncer mamário quando nanoemulsionado. Portanto, a união dos efeitos antioxidantes do óleo de buriti com as características dos sistemas nanoestruturados pode resultar em um tratamento mais efetivo no combate à neoplasia.

Para promover um aumento da estabilidade de nanoemulsões e aumentar a interação destas formulações com o local de interesse do tratamento, pode-se modificar a superfície dessas nanoemulsões por meio de polímeros, biopolímeros e lipídeos. No presente trabalho, a superfície das nanoemulsões de óleo de buriti foi modificada com os compostos descritos a seguir:

2.6.1 Quitosana

Polímeros podem ser adicionados a nanoemulsões com a finalidade de proporcionar o aumento da estabilidade. A quitosana (Q), o segundo biopolímero mais abundante do planeta, depois da celulose, é um derivado da quitina. Este polissacarídeo é insolúvel em água, devido às fortes ligações de hidrogênio entre os grupos aminoacetil. Para facilitar a solubilidade da quitina em água, tal polímero deve ser deacetilado. Desta deacetilação (DDA) há a formação do produto quitosana, como visto na figura 8 (Payet; Terentjev, 2008).

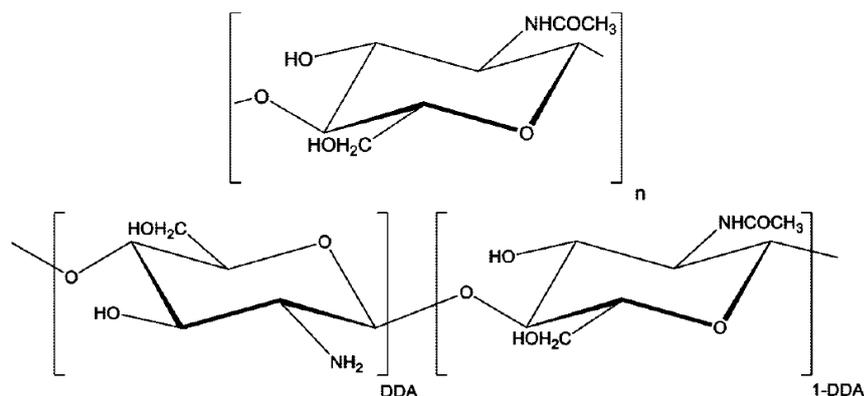


Figura 8. Moléculas de quitina (superior) e quitosana (inferior). Representação da deacetilação (DDA) da quitina. Os grupos aminoacetis (NHCOCH₃) na quitina são substituídos pelo grupamento amina (NH₂) para a formação da quitosana (Payet; Terentjev, 2008).

Entretanto, para que a quitosana seja solúvel em água, ela deve ser dissolvida em soluções de ácidos fracos, como por exemplo em uma solução de ácido acético (Laranjeira; Fávere, 2009).

A quitosana apresenta características importantes para a aplicação biológica: é biodegradável, atóxica e muco adesiva. Em emulsões O/A, a quitosana é adsorvida na superfície do óleo através da interação entre um tensoativo aniônico ou uma proteína (Payet; Terentjev, 2008) devido a sua natureza catiônica (Goycoolea; Milkova, 2016). A carga da quitosana é pH dependente, o que a torna interessante para aplicações terapêuticas. Devido a estas particularidades, há a interação deste biopolímero com a membrana celular (Goycoolea; Milkova, 2016) e, conseqüentemente, a entrada de moléculas associadas à quitosana, fármacos, por exemplo, nas células é facilitada.

Nanoemulsões com quitosana foram desenvolvidas eficazmente por Goycoolea e Milkova (2016). Medeiros; Joanitti e Silva (2014) desenvolveram nanopartículas carregadas com o peptídeo dermaseptina com quitosana, as que demonstraram um alto potencial antitumoral em células de câncer cervical *in vitro*.

2.6.2 Fosfolipídio “1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-trimethylammonium propane” (DOTAP)

O fosfolipídio “1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-trimethylammonium propane” (DOTAP) (Figura 9) é um triglicerídeo catiônico de cadeia média (Hagigit *et al.*, 2010) amplamente utilizado para a aumentar a absorção celular e a estabilidade de medicamentos produzidos a

partir de ácidos nucleicos (Fraga, 2015), pois interagem eletrostaticamente com a carga negativa desses ácidos (Rodríguez-Gascón; Pozo-Rodríguez; Solínis, 2014).

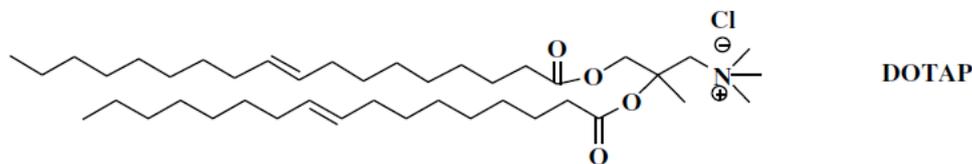


Figura 9. Fórmula estrutural do 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-trimethylammonium propane (DOTAP) (Hagigit *et al.*, 2010).

Camundongos que foram tratados com lipossomo de DOTAP toleraram bem a administração deste composto (Mclachlan *et al.*, 1996). Além disso, não houve efeitos adversos após o uso tópico de lipossomo à base de DOTAP no trato respiratório de humanos (Porteous *et al.*, 1997).

Deshpande e colaboradores (2013) desenvolveram um sistema nanoemulsionado para entrega de ceramida e estradiol em células endoteliais e musculares lisas. Para que a permeação nas células fosse maior, o grupo adicionou DOTAP à superfície da nanoemulsão desenvolvida. Este fosfolípido foi adsorvido na interface das nanoemulsões com sucesso.

Por apresentar baixa toxicidade, inclusive em humanos, nanoemulsões com DOTAP já foram produzidas com sucesso (Deshpande *et al.*, 2013). Por conseguinte, este fosfolípido apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de nanoemulsões cujo alvo sejam células de câncer de mama, pois pode aumentar a estabilidade das nanoemulsões e a absorção celular do medicamento (Fraga, 2015) e, assim, ser uma terapia específica para atuar em células malignas de mama.

2.6.3 “Polyoxyl 40 Stearate” (PEG 40)

Os estearatos de polioxietileno (*polyoxyl stearate*) são produtos resultantes da polietoxilação do ácido esteárico. São compostos não iônicos (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009) cuja fórmula estrutural é representada da figura 10:

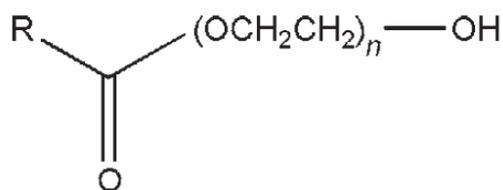


Figura 10. Fórmula estrutural do “*polyoxyl stearate*”. Caso o valor médio de “n” seja 6, o polímero será denominado de “*polyoxyl 6 stearate*”, se o valor médio de “n” seja 40, a nomenclatura será “*polyoxyl 40 stearate*”. O “R” equivale ao grupo alquil –CH₃(CH₂)₁₆- do ácido esteárico (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

Na tecnologia farmacêutica, os estearatos de polioxietileno são amplamente empregados como agentes emulsificante, solubilizante e molhante. Estes estearatos são especialmente utilizados como emulsificantes em cremes e loções O/A e quando há a presença de sais adstringentes (como o hidróxido de cálcio) ou outros eletrólitos fortes, nos quais o soluto está quase completamente na forma de íons (ácido clorídrico e cloreto de sódio, por exemplo) estão nas formulações. Também podem ser combinados com outros surfactantes para a obtenção de um equilíbrio maior entre a hidrofobicidade e lipofobicidade de loções e pomadas (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009). Os átomos de oxigênio do polímero conferem a hidrofiliabilidade enquanto que o grupamento -CH₂-CH₂- proporciona a lipofobicidade (Javid *et al.*, 2014). Por conseguinte, o PEG é capaz de se solubilizar em água e em vários solventes orgânicos (Chao, *et al.*, 2011).

Os estearatos de polioxietileno apresentam outras propriedades importantes na aplicação biológica: possui uma boa dissolução, atóxico, não imunogênico e não demonstra rejeição em organismos (Javid *et al.*, 2014). É utilizado como estabilizador farmacocinético de nanomedicamentos, pois foi demonstrado que *in vivo* há o aumento do tempo de circulação de nanopartículas PEG-ladas, ou seja, desenvolvidas com PEG (Kitagawa, *et al.*, 2010).

O “*polyoxyl 40 stearate*” é um dos principais polímeros usados para modificar a superfície de nanopartículas (Pignatello *et al.*, 2013). Ademais, tem sido utilizado como agente emulsificante em administração intravenosa de medicamentos (Cohn *et al.*, 1963).

Devido a todas essas características, o PEG 40 é um polímero de grande interesse como excipiente para nanomedicamentos como alternativa às quimioterapias convencionais.

3. JUSTIFICATIVA

A flora brasileira apresenta um enorme potencial como fonte de matéria-prima para medicamentos anticancerígenos devido às propriedades antioxidantes e antimutagênicas. Por ser uma planta bastante utilizada na medicina popular, o buriti possui grandes indícios de ser benéfico para a saúde. Além disso, podem-se encontrar fitoquímicos antioxidantes em sua árvore. Koolen e colaboradores (2013b) mostraram que o ácido maurítico, proveniente da raiz da planta de buriti, proporcionou uma significativa diminuição da viabilidade em células de câncer de ovário, próstata e pulmão. Entretanto, na literatura não há registro de estudos dos efeitos do buriti, em especial do óleo extraído do fruto, em células de câncer de mama. Por ser um câncer com alta incidência na população feminina brasileira, é importante a pesquisa de novos tratamentos contra esta neoplasia.

Usualmente, os quimioterápicos são administrados por via intravenosa. Pela característica de hidrofobicidade do óleo de buriti, a sua nanoestruturação por meio de nanoemulsão apresenta uma gama de possibilidades de terapias adjuvantes para o tratamento de câncer de mama. Dentre as possibilidades, um medicamento à base de óleo de buriti nanoemulsionado pode ser administrado por via endovenosa. Como descrito no item 2.5, medicamentos hidrofóbicos podem ser encapsulados nas nanoemulsões pois uma camada de surfactante ou surfactantes têm a capacidade de estabilizar a dispersão óleo de buriti em água. Ao ser nanoestruturado, o óleo também adquire maior biodisponibilidade como demonstrado em testes *in vivo* (Ganta *et al.*, 2009; Gianella *et al.*, 2011; Ragelle *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Bu *et al.*, 2014; Choudhury *et al.*, 2014; Ganta *et al.*, 2015; Fofaria *et al.*, 2016).

Como há poucos estudos descritos na literatura sobre nanoemulsões à base de óleos provenientes de plantas brasileiras, o estudo dessa biodiversidade é extremamente importante, já que é amplamente usada pela medicina tradicional e pelos indígenas.

Até o presente momento, somente há na literatura o desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de buriti para fotoproteção (Zanatta *et al.*, 2010) e demonstrando a baixa citotoxicidade destas nanoemulsões em células de fibroblasto e queratinócitos (Zanatta *et al.*, 2008). Também devido à baixa citotoxicidade de nanoemulsões à base de óleo de buriti em células saudáveis, o desenvolvimento e o estudo da atividade dessas formulações em células de câncer de mama *in vitro* é fundamental para a produção de terapias mais efetivas e eficazes contra o câncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar possíveis efeitos biológicos de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) em linhagem de células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e de fibroblasto saudável (NIH/3T3) *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar protocolo para o desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs);
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, carga de superfície e potencial hidrogeniônico (pH) e aspectos macroscópicos das nanoemulsões obtidas;
- Avaliar a estabilidade dos nanossistemas desenvolvidos em função do tempo e das condições de armazenamento;
- Analisar os efeitos das BuNEs no metabolismo de células murinas de fibroblasto saudável (NIH/3T3) *in vitro*;
- Analisar os efeitos das BuNEs no metabolismo, integridade de membrana, proliferação e morfologia de células de câncer de mama (MCF-7) *in vitro*;
- Analisar os efeitos das BuNEs em relação ao perfil de morte e ciclo celular, fragmentação de ADN e potencial de membrana mitocondrial de células MCF-7 *in vitro*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

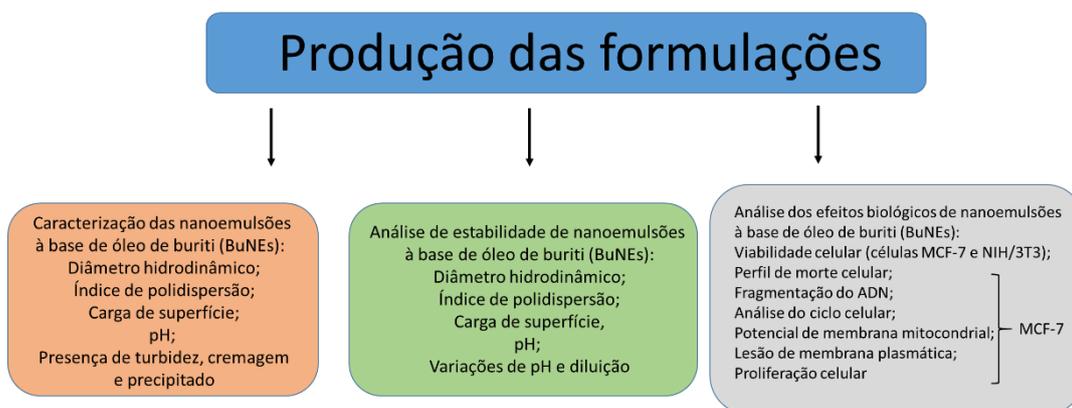


Figura 11. Representação dos ensaios realizados para o desenvolvimento, caracterização, análise de estabilidade e avaliação dos efeitos biológicos de nanoemulsões à base de óleo de buriti em células de câncer de mama MCF-7 e células saudáveis de fibroblasto murino NIH/3T3 *in vitro*.

5.2 PRODUÇÃO DAS FORMULAÇÕES

5.2.1 Síntese das BuNEs e dos respectivos brancos

O óleo de buriti foi adquirido na empresa brasileira Mundo dos óleos. Tal óleo foi obtido da polpa do fruto de buriti e extraído por prensagem a frio e filtração. É um óleo extra virgem, cujo índice de acidez é menor que 0,2 (Mundo dos óleos, 2017).

Foram formuladas quatro tipos de nanoemulsões concentradas à base de óleo de buriti e surfactante (em processo de patente): nanoemulsão com óleo de buriti e surfactante (BuNE-), nanoemulsão com óleo de buriti, surfactante e quitosana (BuNE+Q), nanoemulsão com óleo de buriti, surfactante e o fosfolipídio catiônico 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (BuNE+DOTAP) e nanoemulsão com óleo de buriti, surfactante e o polímero “polyoxyl 40 stearate” – PEG (BuNE+PEG).

Cada formulação foi produzida na proporção de 2:1 para surfactante e óleo (m/m); 3mL de quitosana, 0,5% de DOTAP (m/m) e 5,4% de PEG (m/m). O procedimento de preparação das nanoemulsões foi feito de acordo com Araújo e colaboradores (2016). Primeiramente, as

massas das matérias-primas foram medidas, acrescentadas à uma solução aquosa e submetidas à sonicação (Sonicador Branson Sonifier 450, Fisher Scientific, EUA). Em seguida, cada formulação foi diluída em água deionizada e submetida à sonicação novamente. Todas as amostras foram preparadas em ambiente com baixa luminosidade e armazenadas protegidas da luz a temperatura ambiente (T.A.) ou a 4°C. A concentração final de óleo de buriti obtida para cada BuNE diluída foi de 720 µg/mL.

Para cada nanoemulsão, foram produzidos seus respectivos brancos: Surfactante (L-), Surfactante com Quitosana (3mL) (L+Q), Surfactante (99,3% m/m) com DOTAP (0,3% m/m) (L+DOTAP) e Surfactante (96% m/m) com PEG (4% m/m) (L+PEG). Não foi adicionado o princípio ativo, representado pelo óleo de buriti. Consequentemente, os brancos das nanoemulsões são formulações produzidas somente com os respectivos excipientes de cada nanoemulsão.

5.2.2 Óleo livre de buriti (OL)

Para avaliar o efeito que o óleo do fruto de buriti apresenta, foi feita uma diluição deste óleo em etanol absoluto (ETOH) (Vetec Sigma-Aldrich, EUA) para uma concentração final de 50 mg/mL. O óleo diluído em etanol foi armazenado em temperatura ambiente e protegido da luz. A concentração de 50 mg/mL foi escolhida para a posterior transformação para as doses utilizadas nos tratamentos dos ensaios biológicos.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS NANOEMULSÕES OBTIDAS

O diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (IdP) e a carga de superfície das nanoemulsões foram determinados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD) utilizando-se o equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS[®], Malvern Instruments, Reino Unido). O pH das nanoemulsões foram analisados por meio de uma fita indicadora de pH (Macherey-Nagel, Alemanha). Os aspectos macroscópicos das formulações foram analisados visualmente para a observação da presença de precipitados, cremagem e turbidez.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES

5.4.1 Análise de estabilidade de BuNEs após tempo de síntese

Alíquotas das formulações foram estocadas em diferentes temperaturas (4 °C ou T.A.) e analisadas quanto ao DH, IdP e carga de superfície pelo equipamento Zetasizer e o pH por uma fita indicadora de potencial hidrogeniônico (item 5.3). As análises foram feitas por um período de 365 dias para as formulações armazenadas a 4°C e 270 dias para aquelas a temperatura ambiente.

5.4.2 Análise de estabilidade de BuNEs após diluição em série

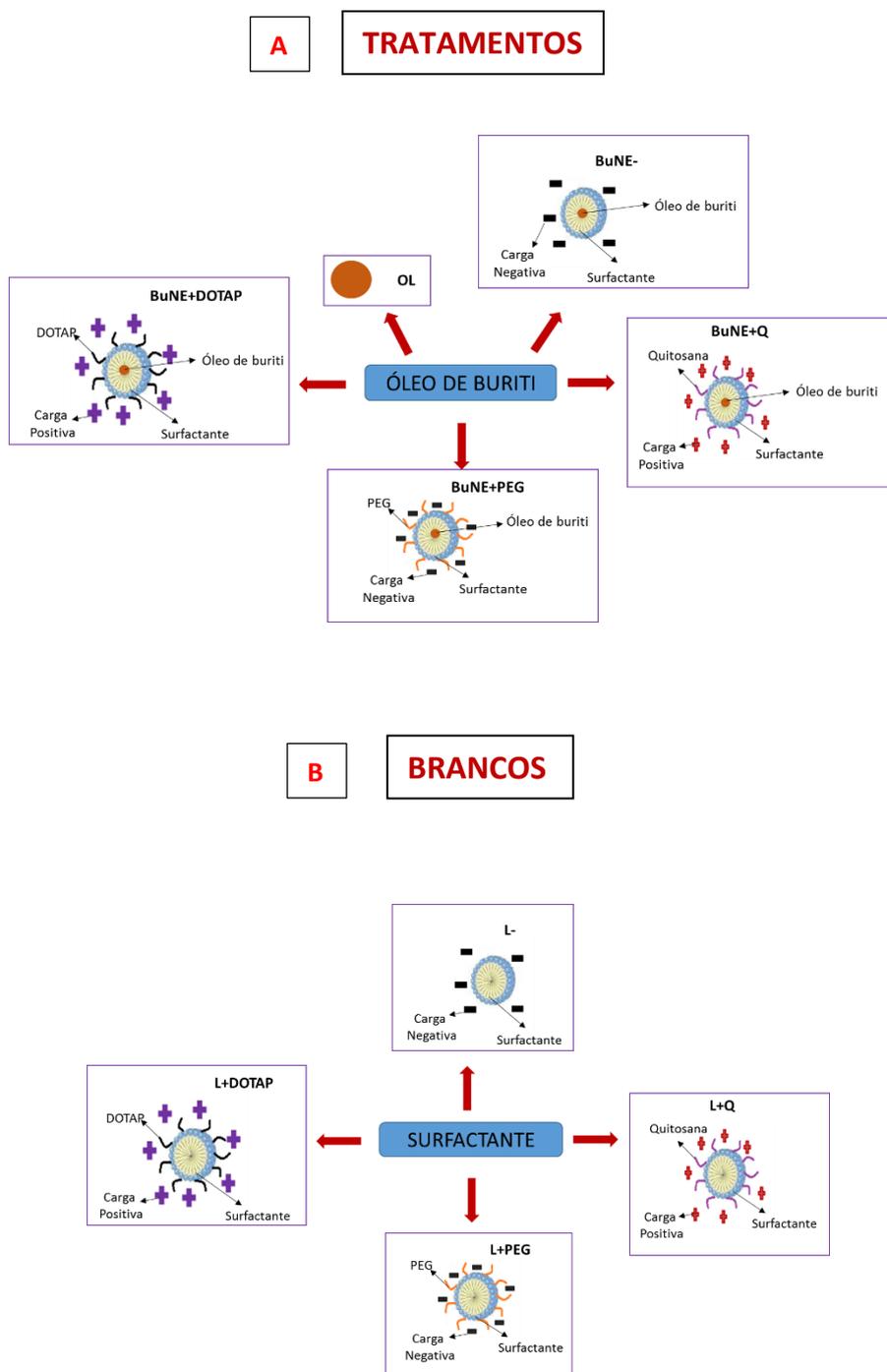
As nanoemulsões de óleo de buriti foram diluídas 2, 4, 8, 16 e 32 vezes em água deionizada e as características em relação ao DH, IdP e carga de superfície foram analisadas por ELD no equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS[®], Malvern Instruments, Reino Unido).

5.4.3 Análise de estabilidade de BuNEs após variação de pH

O potencial hidrogeniônico das BuNEs foram analisados nos valores 3, 5, 7, 9 e 11 em unidades de pH. As soluções de HCl (0,25 M) (Vetec Sigma-Aldrich, EUA) e NaOH (0,25 M) (Sigma-Aldrich, EUA) foram usadas para que o pH alcançasse os valores pretendidos. O DH, IdP e carga de superfície foram analisadas por ELD no equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS[®], Malvern Instruments, Reino Unido).

5.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO*

5.5.1 Soluções utilizadas nos ensaios de avaliação dos efeitos biológicos



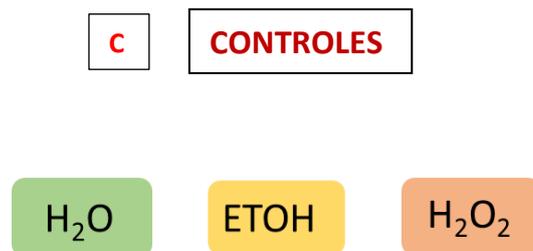


Figura 12. Esquema das soluções usadas nos ensaios biológicos. A) Tratamentos à base de óleo de buriti. BuNE-: Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície; BuNE+DOTAP: Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*”; BuNE+PEG: Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*”; BuNE+Q: Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana e OL: Óleo Livre de Buriti. B) Brancos das nanoemulsões à base de óleo de buriti. Cada formulação é constituída pelos excipientes das suas respectivas nanoemulsões. L-: Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície; L+DOTAP: Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*”; L+PEG: Branco da nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*” e L+Q: Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana. C) Controles dos tratamentos. H₂O: controle negativo água das nanoemulsões; H₂O₂: controle positivo das nanoemulsões e ETOH: controle negativo do OL.

5.5.2 Teste de Viabilidade Celular – Ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol) após tratamento das células de câncer de mama, MCF-7, com BuNEs

A linhagem utilizada para os testes in vitro foram as células originadas de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de solução de antibiótico penicilina (Gibco, EUA) e estreptomicina (Gibco, EUA) (v/v), e mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços (5.000 células por poço) e incubadas com diferentes concentrações (90 µg/mL, 180 µg/mL ou 360 µg/mL) das nanoemulsões, brancos, controles e óleo livre por 24 e 72 horas. Como controles negativos, foram utilizados água deionizada (para as nanoemulsões e brancos)

e etanol (para o óleo livre) nas doses de 90 µg/mL, 180 µg/mL ou 360 µg/mL. As amostras de nanoemulsões, brancos, óleo livre e controles foram diluídas no meio de cultura DMEM.

Para realizar um paralelo entre os efeitos biológicos das BuNEs em células de câncer de mama e células saudáveis, o ensaio de MTT também foi realizado na linhagem celular de fibroblasto murino NIH/3T3. Tais células foram cultivadas e plaqueadas nas mesmas condições descritas acima para as células MCF-7, exceto o número de células de plaqueamento, o qual foi 3×10^3 células/poço. A diferença do número de células semeadas entre as duas linhagens celulares foi devido à morfologia das células NIH/3T3, as quais apresentam um tamanho maior em relação às células MCF-7. Consequentemente, ocupam um espaço maior no poço.

Após 24 e 72 horas de tratamento, o ensaio de MTT foi realizado. O meio foi descartado e uma solução de meio DMEM (135µL/poço) com solução de MTT (15µL/poço, concentração estoque de 5 mg/mL) foi adicionada em cada poço. Após 2 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, a solução acima foi descartada e 150µL de DMSO (Sigma, EUA) foi adicionado em cada poço. Por fim, a viabilidade celular foi analisada em um espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) a 595nm.

Para dar continuidade aos próximos ensaios biológicos em células de câncer de mama MCF-7, os tratamentos selecionados foram BuNE- e BuNE+DOTAP, pois apresentaram maior potencial de diminuição da viabilidade destas células na dose de 360 µg/mL em 24 horas e não reduziram significativamente a viabilidade das células de fibroblasto saudáveis NIH/3T3 nas mesmas condições de tratamento.

5.5.3 Análise do perfil de morte celular de células de câncer de mama MCF-7 após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

O primeiro passo para a análise foi o plaqueamento das células MCF-7 em placas de 12 poços. Em cada poço, foram semeadas 5×10^4 células. Como a área dos poços das placas de 12 poços é maior do que a área dos poços das placas de 96 poços, houve a necessidade de se fazer um ajuste da quantidade das células semeadas para o experimento do perfil de morte celular. Portanto, foi necessário um maior número de células para este experimento. Para que a distribuição das células fosse uniforme por todo o poço, elas foram semeadas por movimento de espiral, iniciando do centro para a extremidade. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, o meio do plaqueamento foi substituído pelos controles tratamentos e brancos, todos na concentração de 360µg/mL (exceto controle positivo): CTL água (H₂O), utilizado como controle negativo, peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

(1 mM) (Vetec, Brasil), como controle positivo, BuNE-, BuNE+DOTAP, L- como branco da BuNE- e L+DOTAP como branco da BuNE+DOTAP. O volume final de cada tratamento foi de 1mL: 250µL das formulações foram diluídas em 750µL em meio DMEM. Depois de 24 horas de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo correspondente e 400µL de tripsina (Gibco, EUA) foram adicionadas em cada poço para que as células se soltassem do fundo do poço. Em seguida, a placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para potencializar o efeito da enzima. Este sobrenadante foi ressuspensionado, transferido para o microtubo correspondente, no qual o primeiro sobrenadante estava armazenado e centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 100µL de tampão de ligação (0,1 M de HEPES (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂) foi adicionado ao microtubo de cada tratamento. Logo em seguida, 5µL de solução de Anexina V conjugada ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD, EUA) e 10µL de solução de Iodeto de Propídeo (IP) (50 µg/mL) (Probes – Thermo Fisher, EUA) foram acrescentados no microtubo.

A Anexina V-FITC é um composto que possui afinidade a fosfolípídeos carregados negativamente, como a fosfatidilserina. As células, quando estão em processo de apoptose, apresentam exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática. Em consequência, a Anexina V-FITC é um marcador específico utilizado para a detecção de células apoptóticas (Koopman *et al.*, 1994). Enquanto que o IP é bastante empregado para a detecção de células em processo de necrose. É um corante vermelho de ácido nucleico e impermeável à membrana plasmática. Quando a membrana é lesionada, o IP penetra na célula e se liga ao ADN e ARN. Por conseguinte, somente as células necróticas são coradas em vermelho (Cevik; Dalkar, 2003).

Portanto, por meio da Anexina V-FITC e do IP pode-se determinar o perfil de morte celular de células MCF-7 após o tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP. Tal perfil foi analisado pelo equipamento de citometria de fluxo (FACSVerse, BD, EUA), 10.000 eventos foram contados por amostra e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

5.5.4 Análise da fragmentação de ADN e ciclo celular de células de câncer de mama MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

As células MCF-7 foram plaqueadas e tratadas como descrito em 5.5.3 (exceto pelo tratamento com H₂O₂, o qual não foi realizado). Depois de 24 horas de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo correspondente e 400µL de tripsina foram adicionadas em cada poço. Em seguida, as células foram incubadas por 5 minutos

em estuda a 37°C e 5% de CO₂. Este sobrenadante foi ressuscitado, transferido para o microtubo correspondente a cada tratamento, no qual o primeiro sobrenadante estava armazenado e centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. O pellet foi ressuscitado e 1mL de ETOH 70% gelado foi adicionado. Quanto mais gelado o ETOH estiver, a probabilidade do ADN se solubilizar será menor. Os microtubos foram armazenados a -20°C por pelo menos 24 horas. No dia da análise, os microtubos foram centrifugados a 3.083 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100µL de PBS 1x (Laborclin, Brasil) com RNase (50µg/mL) (BD, EUA) foram adicionados, a fim de que o ARN seja degradado e o único tipo de ácido nucleico presente na amostra seja o ADN, foram adicionados ao pellet. Os microtubos foram armazenados por meia hora em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Então, 100µL de IP (20µg/mL) (Probes – Thermo Fisher, EUA) foram adicionados em cada microtubo para a confirmação da fragmentação do ADN. As amostras foram armazenadas por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Logo após os 30 minutos, as amostras foram analisadas pelo equipamento de citometria de fluxo (FACSVerse, BD, EUA), 10.000 eventos foram contados por amostra e os resultados foram verificados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

5.5.5 Análise do potencial de membrana mitocondrial de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

O potencial de membrana mitocondrial das células MCF-7, após o tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP, foi verificado por meio da sonda fluorescente Rodamina 123 (Probes – Thermo Fisher, EUA). Este fluoróforo é empregado como corante de mitocôndria. Por ser um composto catiônico, se a membrana mitocondrial estiver despolarizada, há o intercalamento deste marcador na membrana da organela. Assim, agentes que apresentam a capacidade de despolarizar a membrana mitocondrial levam a um decaimento e, conseqüentemente, a uma menor fluorescência da Rodamina 123. Em contrapartida, agentes que promovem a hiperpolarização desta membrana levam a uma maior fluorescência da sonda. Quando o potencial da membrana mitocondrial está normal, não há diferença na fluorescência da Rodamina 123 em comparação à fluorescência normal da Rodamina 123 que não foi internalizada pelas células (Eamus; Grunwald; Lemasters, 1986).

As células MCF-7 foram plaqueadas e tratadas como descrito em 5.5.3 (exceto pelo tratamento com H₂O₂, o qual não foi realizado). Depois de 24 horas de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo correspondente e 400 µL de

tripsina foram adicionadas em cada poço para que as células se soltassem do fundo do poço. Em seguida, a placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Este sobrenadante foi ressuspensionado, transferido para o microtubo correspondente a cada tratamento, no qual o primeiro sobrenadante estava armazenado e centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. Então, o sobrenadante foi descartado e 300µL de PBS 1x com Rodamina 123 (5 µg/mL) foi adicionado ao “*pellet*”. Os microtubos foram armazenados por 15 minutos a T.A. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.083 g a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Logo, 300µL de PBS 1x foram adicionados em cada microtubo para que o excesso de rodamina 123 fosse retirado. A lavagem foi realizada por duas vezes. Por fim, as amostras foram armazenadas em gelo e analisadas em seguida por citometria de fluxo (FACSVerse, BD, EUA). Foram contabilizados 10.000 eventos por amostra e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

5.5.6 Análise da integridade de membrana e proliferação de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

A integridade de membrana e a proliferação celular de células MCF-7 após o tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP foram constatadas pela coloração das células por uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA) na proporção de 1:1 (v/v) e sua posterior contagem em uma câmara de Neubauer por meio de um microscópio de luz invertido (Leica DM1 1, Leica, Alemanha). Como descrito por Joanitti e colaboradores (2010), somente as células que apresentam membrana plasmática lesionada podem interiorizar o corante. A proliferação celular foi aferida pela comparação do número de células dos tratamentos com o número de células do CTL H₂O.

As células MCF-7 foram plaqueadas e tratadas como descrito em 5.5.3 (exceto pelo tratamento com H₂O₂, o qual não foi realizado). 10µL de cada microtubo da solução de meio de cultivo e *pellet* ressuspensionada, a qual ainda não havia sido adicionada de ETOH 70% (item 4.6.3), foram adicionados a 20µL de solução de azul de tripan. Em seguida, as células foram ressuspensionadas e 10µL foram transferidos para a câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram divididas em dois grupos: azuis (com membrana lesionada) não azuis (membrana intacta).

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados e analisados em triplicatas em três repetições. Os valores foram representados como média \pm desvio-padrão. Os testes estatísticos foram feitos pelo software GraphPad Prism 6. O teste usado foi ANOVA e o pós-teste, Dunnett. Os valores considerados estatisticamente significativos foram aqueles que apresentaram $P < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

6.1.1 Caracterização macroscópica das nanoemulsões

Foi observado que todas as formulações foram homogêneas, translúcidas, não apresentando cremagem ou precipitados (Figura 13). Nanoemulsões à base de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) com (NE+CH) e sem quitosana (NE-) foram desenvolvidas com sucesso por ARAÚJO (2016). Os aspectos macroscópicos dessas nanoemulsões são parecidos com aqueles encontrados em BuNEs e BuNE+Q (SILVA, 2016). O mesmo padrão macroscópico das BuNEs pôde ser observado em nanoemulsão transparente de óleo de laranja com carreador de óleo triglicerídeo de cadeia média (Chang; Mcclements, 2014).

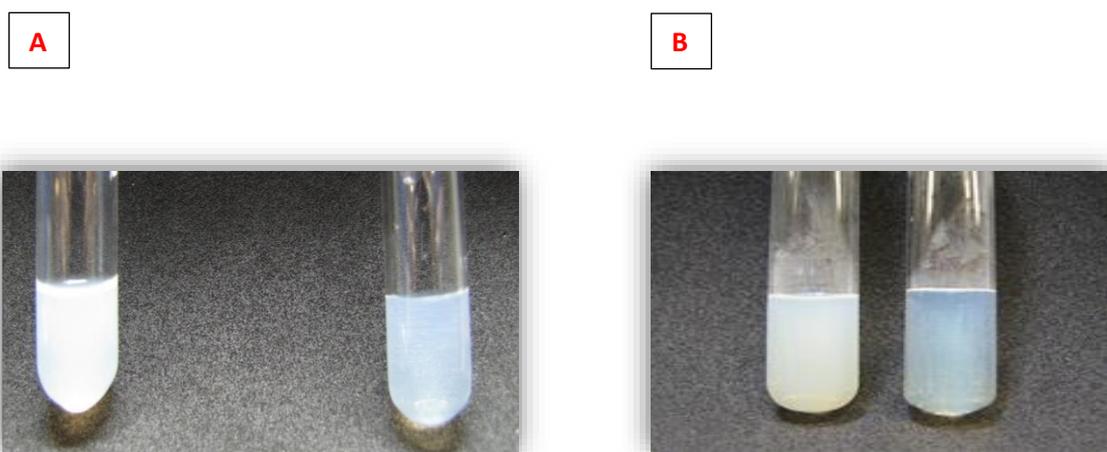


Figura 13. A) Representação da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q (esquerda) e nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície - BuNE- (direita). B) Representação da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- trimethylammonium propane*” - BuNE+DOTAP (esquerda) e nanoemulsão de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*” - BuNE+PEG (direita). (Elaborada pelo próprio autor, 2015).

6.1.2 Caracterização macroscópica dos brancos

Assim como as nanoemulsões, os brancos são homogêneos, translúcidos e não apresentam cremagem ou precipitados (Figura 14). Os brancos são formulações constituídas somente com os excipientes de suas respectivas nanoemulsões.

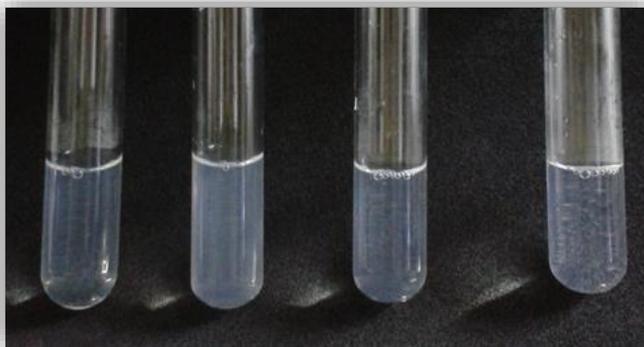


Figura 14. Representação dos brancos das nanoemulsões à base de óleo de buriti. Da esquerda para a direita: Surfactante, Surfactante com quitosana, Surfactante com DOTAP e Surfactante com PEG. (Elaborada pelo próprio autor, 2015).

6.1.3 Caracterização dos parâmetros físico-químicos das nanoemulsões obtidas

As nanopartículas das nanoemulsões BuNE-, BuNE+Q, BuNE+DOTAP, BuNE+PEG apresentaram os seguintes valores de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (IdP), carga de superfície (CS) e potencial hidrogeniônico (pH) (Tabela 1):

Tabela 1. Valores das características físico-químicas das nanoemulsões à base de óleo de buriti logo após a síntese.

Nanoemulsão	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Carga de superfície (mV)	pH
BuNE-	88,1±1,7	0,211±0,01	-15,83±0,4	7
BuNE+Q	121,7±1,9	0,176±0,01	19,53±1,9	5
BuNE+DOTAP	128,1±0,3	0,221±0,03	21,47±0,4	7
BuNE+PEG	81,82±0,6	0,230±0,01	-10,7±0,7	7

De acordo com a literatura, nanoemulsões são sistemas dispersos isotrópicos, cujas partículas variam de 20 a 300nm (Gué *et al.*, 2016). Todas as formulações produzidas apresentaram diâmetro hidrodinâmico na faixa nanométrica descrita. Adicionalmente, pode-se inferir que a variação do diâmetro hidrodinâmico entre o mesmo tipo de formulação é devido à concentração e ao tipo de surfactante usado na produção da formulação, pois ambas as formulações foram desenvolvidas em alguns pilotos cujo tensoativo e a concentração deste variavam de acordo com o lote. As nanopartículas sem cobertura de polímeros ou lipídeos apresentou o diâmetro hidrodinâmico (DH) de $88,1 \pm 1,7$ nm, enquanto que BuNE+Q e BuNE+DOTAP possuem o DH de $121,7 \pm 1,9$ nm e $128,7 \pm 0,3$ nm. Pode-se inferir que este aumento pode ser atribuído à carga positiva que esses compostos conferem à nanoemulsão. Já a BuNE+PEG tem o DH menor ($81,82 \pm 0,6$ nm) em relação à BuNE-.

Quanto menor o valor do IdP, mais homogêneo é o diâmetro hidrodinâmico das partículas entre si (Aghajani *et al.*, 2011). Quando o IdP apresenta um valor alto, o nanocomposto é pouco disperso e suas partículas apresentam diâmetros hidrodinâmicos bastante heterogêneos (Department of Chemistry, University of California, 2017). O índice de polidispersão de sistemas monodispersos é aquele com valor igual ou inferior a 0,3. O IdP das nanoemulsões foi $\leq 0,230$. Por conseguinte, as nanoemulsões podem ser consideradas homogêneas quanto ao diâmetro hidrodinâmico. A carga de superfície das partículas de nanocompostos também é relevante para a sua caracterização. As partículas que possuem valor maior em módulo que 30 mV apresentam um potencial de estabilidade maior (Nayak *et al.*, 2015). Os valores da carga de superfície obtidos na caracterização das formulações foram menores que 30 mV para as nanopartículas positivas, como podemos observar na Tabela 1. O pH de todas as nanoemulsões à base de óleo de buriti foi 7, exceto a BuNE+Q, o qual foi 5. Essa diferença de pH em comparação com as outras BuNEs ocorreu devido a capacidade da quitosana de somente se dissolver em pH ácido. Portanto, a BuNE+Q apresenta um pH mais ácido em relação às outras formulações (2 unidades de pH menor).

Nanoemulsões transparentes à base de óleo de laranja com carreador de óleo triglicérido de cadeia média apresentaram média do diâmetro hidrodinâmico de 25nm enquanto que nanoemulsões de carvacrol apresentaram DH desde 55nm a 240nm (Chang; Mclandsborough; McClements, 2013). Pode-se inferir que a variação do diâmetro hidrodinâmico entre o mesmo tipo de formulação é devido à concentração e ao tipo de surfactante usado na produção da formulação, pois ambas as formulações foram desenvolvidas em alguns pilotos cujo tensoativo e a concentração deste variavam de acordo com o lote.

Sakulku e colaboradores (2009) produziram dez nanoemulsões à base de óleo de citronela. Quatro formulações apresentaram o IdP na margem daqueles encontrados nas BuNEs: $0,13\pm 0,02$; $0,18\pm 0,01$; $0,13\pm 0,02$ e $0,19\pm 0,02$. Nanoemulsões à base de óleo de eucalipto foram desenvolvidas pelo grupo de Sugumar (2014) por meio de sonicação, a qual foi a mesma utilizada para o desenvolvimento das BuNEs neste trabalho. A formulação que passou por mais tempo pelo processo de sonicação foi aquela que apresentou o menor valor de IdP.

Nanoemulsão de óleo de orégano desenvolvida por Bhargava e colaboradores (2015) apresentou carga de superfície (CS) de -18mV , a qual é similar à CS da BuNE-: $-15,83\pm 0,4$.

O pH da nanoemulsão à base de óleo de pequi sem quitosana (NE-) desenvolvida por Araújo (2016) coincidiu com o pH das formulações BuNE-, BuNE+DOTAP e BuNE+PEG. Tanto o pH da nanoemulsão à base de óleo de pequi com quitosana (pH 4) quanto da nanoemulsão de óleo de buriti com quitosana (pH 5) é ácido, devido à presença deste biopolímero.

Conforme os valores apresentados na Tabela 1 e comparações com dados da literatura descritos acima, pode-se concluir que o desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de buriti foi bem-sucedido.

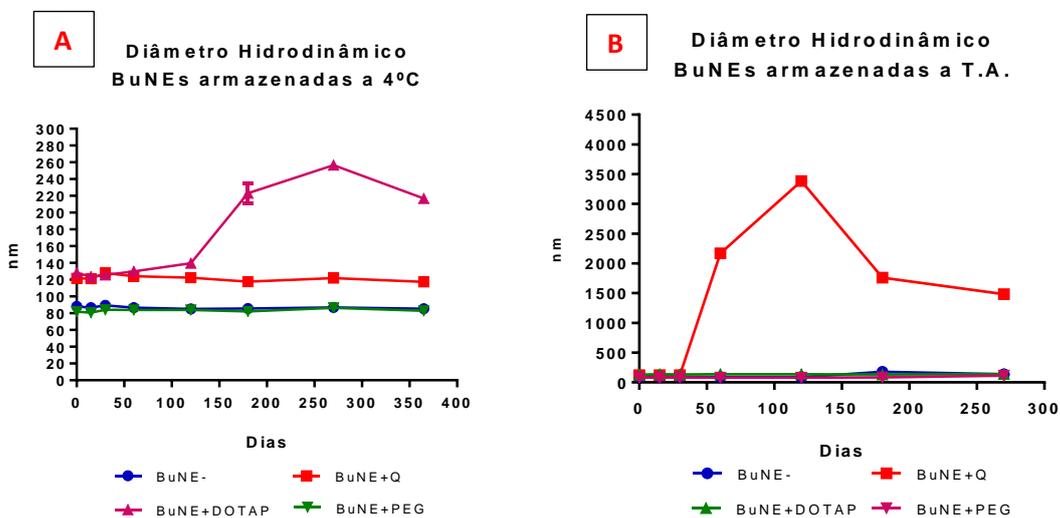
6.1.4 Análise da estabilidade dos aspectos físico-químicos das nanoemulsões BuNE-, BuNE+Q, BuNE+DOTAP e BuNE+PEG armazenadas à 4°C e à temperatura ambiente (T.A.)

As nanoemulsões armazenadas a 4°C foram avaliadas nos dias 0, 15, 30, 60, 120, 180, 270 e 365 posteriores a sua produção, enquanto que aquelas armazenadas a T.A. foram estudadas nos dias 0, 15, 30, 60, 120, 180 e 270 posteriores a sua produção.

Foi observado que as nanoemulsões armazenadas a 4°C permaneceram estáveis quanto às características de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (IdP) e carga de superfície (CS) (Figuras 15A; 15C e 15E), exceto a nanoemulsão à base de óleo de buriti com DOTAP (BuNE+DOTAP). Tal formulação sofreu uma grande variação de DH e IdP a partir do 180º dia (aumento $94,9\pm 19,77$ nm quanto ao diâmetro hidrodinâmico e IdP $0,383\pm 0,07$ maior) enquanto que a CS já apresentou variação a partir do 120º dia (redução de $21,12\pm 0,10$ mV da carga de superfície). Em relação ao potencial hidrogeniônico (pH), como pode ser visto na figura 15G, as nanoemulsões BuNE-, BuNE+DOTAP e BuNE+PEG permaneceram estáveis por 270 dias, enquanto que a BuNE+Q sofreu variação já a partir do dia 7 (inicialmente o pH era de 5 e depois diminuiu para 4). Mas depois dessa alteração, a formulação continuou estável

por todo o período de tempo analisado. De acordo com Venkatesham e colegas (2012), a composição química da superfície de partículas influenciam a sua estabilidade, como a presença ou não de polímeros nesta superfície, por exemplo. Alguns polímeros possuem a capacidade de aumentar a estabilidade de nanopartículas (Payet; Terentjev, 2008; Goycoolea; Milkova, 2016).

Contudo, as nanoemulsões armazenadas a T.A. demonstraram um perfil de instabilidade precoce, se comparado às pequenas instabilidades sofridas pelas BuNEs condicionadas a 4°C. As formulações a T.A. começaram a apresentar grandes alterações em relação ao diâmetro hidrodinâmico e ao índice de polidispersão a partir do 120º dia na BuNE+Q (Figuras 15B e 15D, respectivamente), enquanto que as alterações da carga de superfície e pH já tiveram início a partir de 60 dias de produzidas nas nanoemulsões que possuem carga positiva (BuNE+Q e BuNE+DOTAP) (Figuras 15F e 15H, respectivamente). Já as nanoemulsões com carga negativa (BuNE- e BuNE+DOTAP) tiveram uma baixa variação quanto à CS e ao pH. Inclusive, tal variação foi semelhante àquelas encontradas nestas formulações armazenadas a 4°C. As instabilidades observadas nas formulações armazenadas a T.A. são devido à oxidação lipídica. Esta reação ocorre na superfície das nanopartículas. O calor e a luz catalisam tal reação (Kargar; Spyropolous; Norton, 2011).



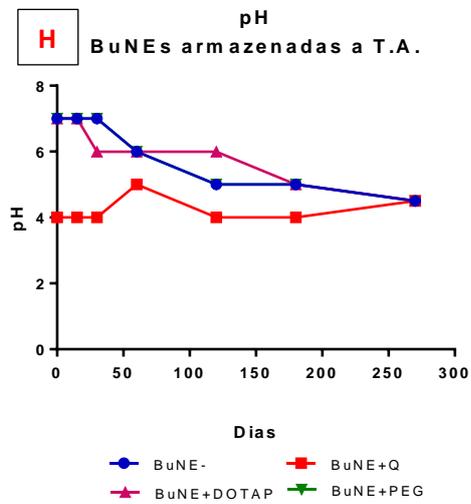
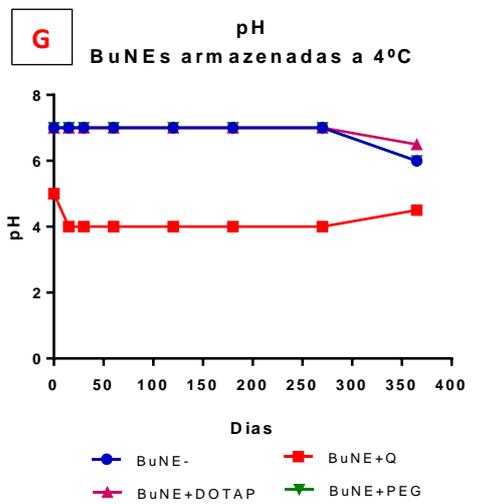
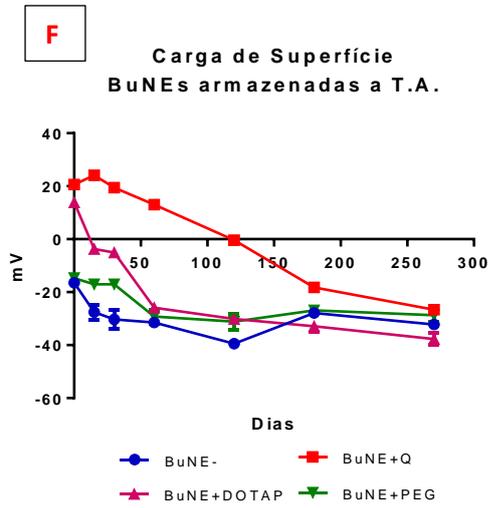
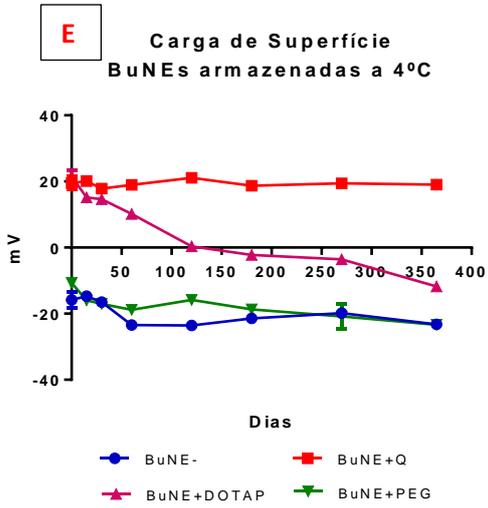
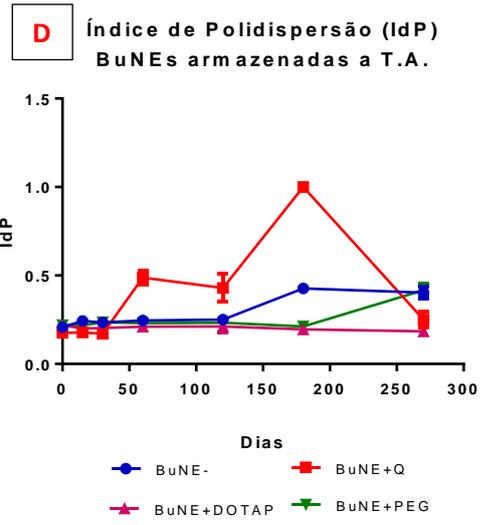
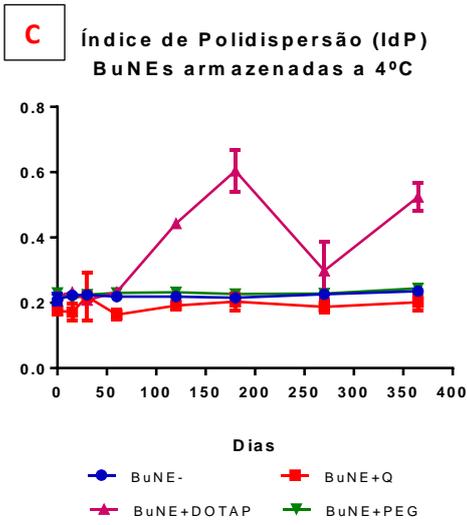


Figura 15. Gráficos da análise de estabilidade das nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) por 365 dias (armazenadas a 4°C) e 270 dias (armazenadas a Temperatura Ambiente - T.A.) quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, carga de superfície e pH. Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície (BuNE-), Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio 1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (BuNE+DOTAP), Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*” (BuNE+PEG) e Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana (BuNE+Q).

As nanoemulsões à base de óleo de buriti armazenadas a 4°C foram estáveis pelo período de um ano. A formulação BuNE+DOTAP que mostrou uma maior instabilidade pode ser modificada para que se torne estável por 365 dias. Uma possível modificação seria a inserção de antioxidantes na formulação. Em relação ao pH, que foi um ponto de alteração para todas as nanoemulsões, a adição de tampão é uma boa estratégia para que o potencial hidrogeniônico fique estável pelo período de interesse.

6.1.5 Análise de estabilidade de BuNEs após diluição em série e variação de pH

Ao analisar o diâmetro hidrodinâmico das formulações desenvolvidas no estudo frente às alterações de pH (Figura 16A), podem ser observadas pequenas variações, as quais não foram estatisticamente significantes, e, portanto, não excluam as formulações dos padrões considerados como ideais pelo estudo (>300nm).

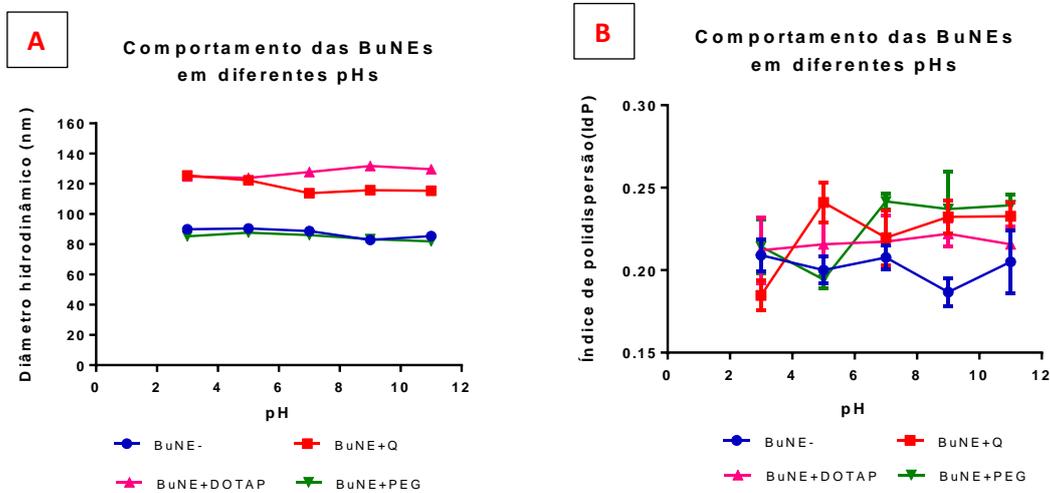
Quanto ao IdP (Figura 16B), é possível observar variações que, por sua vez, também não excluam as formulações do padrão estabelecido de <0,3. Então, cabe pontuar que a formulação BuNE+DOTAP apresentou maior estabilidade neste parâmetro. Observou-se também que em pH 3 a formulação (BuNE+Q) demonstrou redução de IdP expressiva. Uma hipótese é que a quitosana encontra-se na superfície das gotículas e, para a sua dissolução, é necessário meio ácido. Desta forma ao encontrar-se em pH 3, a quitosana presente em tal formulação pode se apresentar de forma mais homogênea e isto reflete no IdP da formulação.

A carga de superfície das nanoemulsões em estudo apresentaram alterações expressivas após a variação de pH (Figura 16C). Com o aumento do valor de pH, pode-se notar uma diminuição drástica do valor do potencial Zeta assim como sua redução acarreta no aumento da

carga de superfície das nanoformulações. Os valores da CS em pH 3 das BuNE-, BuNE+Q, BuNE+DOTAP e BuNE+PEG de 23,9 mV, 26,23 mV, 29,1 mV e 18,4 mV, respectivamente, foram para -69,7 mV, -48 mV, -66,9 mV e -55,3mV, respectivamente, em pH 11. A reversão de cargas frente à alteração de pH notada nas nanoemulsões desenvolvidas é ocasionada pelo aumento de cátions H⁺ em meio ácido e ânions OH⁻ em meio alcalino (Honary; Zahir, 2013).

Como pode ser observado também na figura 16C, as formulações BuNE-, BuNE+Q e BuNE+PEG possuem pontos isoelétricos entre pH 5 e 6, e BuNE+DOTAP entre pH 7 e 8. O ponto isoelétrico corresponde ao momento em que os íons de hidrogênio do sistema são requeridos para neutralizar a carga negativa presente na superfície da nanopartícula, na qual a carga de superfície encontra-se 0 mV (Honary; Zahir, 2013).

Esta capacidade na alteração das cargas é uma vantagem que as nanoemulsões apresentam nas terapias de tumores sólidos, pois estes possuem caráter ácido e como a membrana plasmática tem carga negativa, há uma maior interação com as nanoemulsões catiônicas (Garcia-Martin *et al.*, 2006).



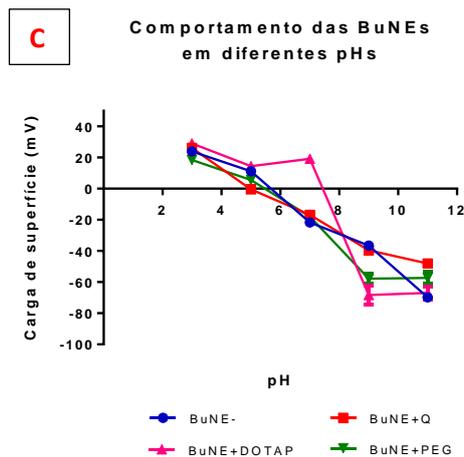


Figura 16. Representação do comportamento das nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) quando submetidas a diferentes pHs quanto ao diâmetro hidrodinâmico (16A), índice de polidispersão (16B) e carga de superfície (63C). (Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície - BuNE-, Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido 1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane - BuNE+DOTAP, Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*” - BuNE+PEG e Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q).

Frente a diferentes diluições, as nanoemulsões à base de óleo de buriti permaneceram estáveis quanto ao diâmetro hidrodinâmico (Figura 17A). Em relação ao IdP (Figura 17B), pode-se observar variações em todas as BuNEs. Contudo, tal índice não foi maior que 0,3, constituindo assim nanoemulsões com partículas de tamanho essencialmente homogêneo. A carga de superfície das partículas apresentou variação em BuNE+DOTAP (de $20,63 \pm 4,637\%$, quando diluídas por de 2 vezes, para $11,63 \pm 19$, quando diluídas por 32 vezes) (Figura 17C).

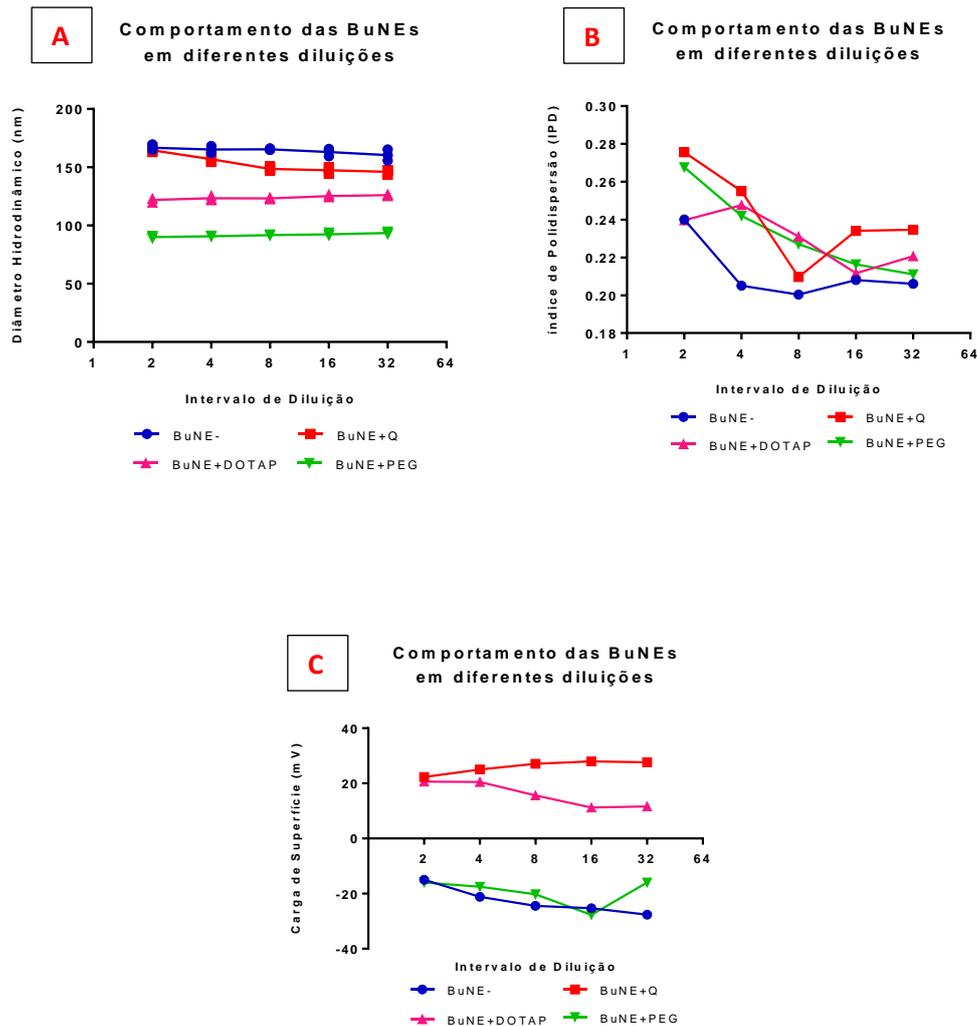


Figura 17. Representação do comportamento das nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) quando submetidas a diferentes diluições quanto ao diâmetro hidrodinâmico (17A), índice de polidispersão (17B) e carga de superfície (17C). (Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície -BuNE-, Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio 1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane - BuNE+DOTAP, Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*” - BuNE+PEG e Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q).

De acordo com ANTON & VANDAMME (2011), a variação do pH e da diluição das nanoemulsões não influenciam no diâmetro hidrodinâmico, corroborando assim com os dados do presente estudo. Por causa desta estabilidade, estas nanoformulações são sistemas que possuem a capacidade de se adaptar às condições da administração intravenosa. Elas se adaptam

bem às diluições iminentes da corrente sanguínea e às mudanças de pH no caminho até o alvo pretendido para o tratamento.

6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO*

6.2.1 *Teste de Viabilidade Celular – Ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol) após tratamento das células de câncer de mama, MCF-7 e fibroblasto, NIH/3T3, com BuNEs*

6.2.1.1 MCF-7

O ensaio de MTT foi realizado para verificar a resposta das células de câncer de mama MCF-7 após 24 e 72 horas de tratamento com as BuNEs nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL. Em 24 horas, houve uma redução significativa da viabilidade das células em todos os tratamentos com as nanoemulsões nas doses de 180µg/mL e 360µg/mL (Figura 18). Deve-se dar um maior destaque para a maior concentração, pois BuNE- diminuiu a viabilidade em cerca de 51,5±7,16% e BuNE+DOTAP levou a uma diminuição da viabilidade em 43,4±6,03%. Entretanto, a terapia com o óleo de buriti (OL) manteve a viabilidade das células MCF-7 estável. Este dado é de extrema importância, pois demonstra que o óleo livre não apresenta atividade contra as células de câncer de mama MCF-7 em 24 horas de tratamento. Para que ocorra alguma atividade, é necessário que o óleo seja nanoestruturado. Além disso, nenhum controle das nanoemulsões reduziu a viabilidade celular das MCF-7. Portanto, o óleo nanoestruturado desempenhou de fato o papel na diminuição da viabilidade.

24 horas de tratamento em MCF-7

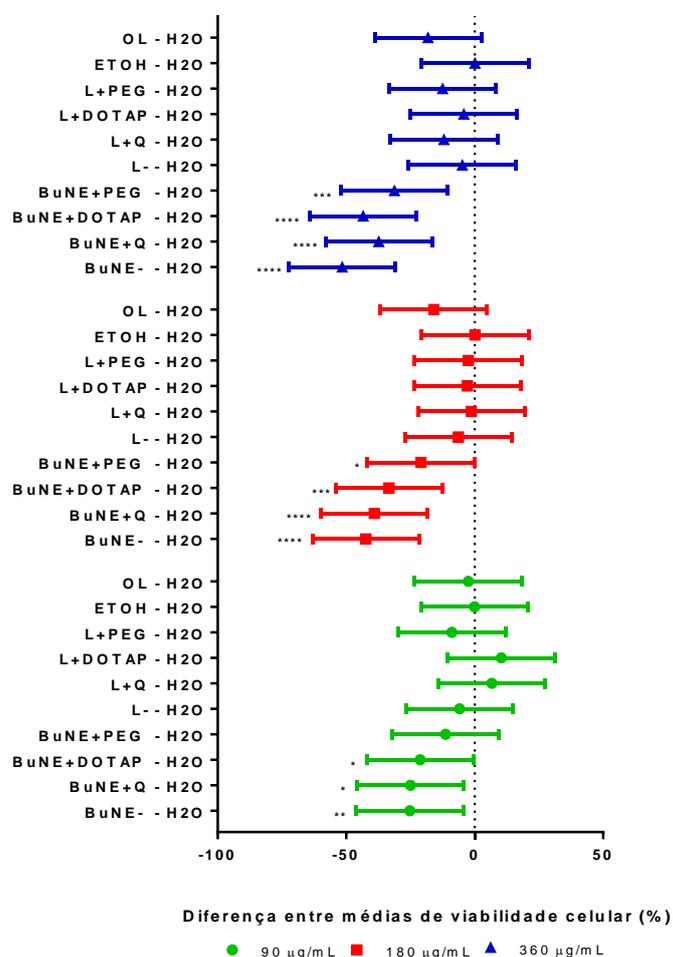


Figura 18. Gráfico representativo do ensaio de viabilidade celular de células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL. O eixo “X” indica a diferença entre as médias de viabilidade celular em porcentagem das células tratadas com controle negativo água (H₂O). O “0” indica 100% de células viáveis. Os valores positivos referem-se ao aumento da viabilidade celular, enquanto que os valores negativos referem-se à diminuição da viabilidade. (Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície - BuNE-; Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” - BuNE+DOTAP; Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “polyoxyl 40 stearate” - BuNE+PEG; Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q; L- Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície; L+DOTAP – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane”; L+PEG –Branco da

nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*”; L+Q – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana; ETOH – Etanol; OL – óleo de buriti). Valores representados pela média± desvio-padrão. $P < 0,05$.

Após 72 horas de terapia com as BuNEs nas células de câncer de mama (Figura 19), pôde-se observar uma redução significativa da viabilidade celular nos tratamentos com BuNE+DOTAP ($66,68 \pm 9,37\%$) e BuNE+PEG ($67,96 \pm 9,49$) a $90 \mu\text{g/mL}$; BuNE- ($54,32 \pm 20,00\%$), BuNE+Q ($62,10 \pm 14,73$), BuNE+DOTAP ($44,43 \pm 12,82\%$) e BuNE+PEG ($51,10 \pm 9,36\%$) a $180 \mu\text{g/mL}$ e BuNE+DOTAP ($76,28 \pm 45,44\%$) e BuNE+PEG ($72,4 \pm 40,83\%$) a $360 \mu\text{g/mL}$. Todavia, o branco da nanoemulsão à base de óleo de buriti com PEG 40 (L+PEG), em todas as concentrações também diminuiu a viabilidade celular significativamente. Conseqüentemente, não se pode afirmar se a diminuição da viabilidade da MCF-7 ocorreu devido ao óleo nanoestruturado ou se foi devido aos excipientes da formulação. Assim como o tratamento por 24 horas com BuNE- na concentração de $360 \mu\text{g/mL}$ levou a uma expressiva redução da viabilidade celular (em $51,5 \pm 7,16\%$), 72 horas de terapia com essa nanoemulsão também diminuiu a viabilidade das células estudadas de forma expressiva. A diminuição foi ainda maior no tratamento por 72 horas (em $67 \pm 6,71\%$). O perfil de viabilidade celular após o tratamento de 72 horas com o OL seguiu o mesmo obtido com o tratamento de 24 horas. Portanto, para que ocorra algum efeito nas células de câncer de mama MCF-7, o óleo de buriti deve ser nanoestruturado. E somente o branco de BuNE+PEG diminuiu a viabilidade celular. O efeito produzido nas demais nanoemulsões foi somente devido ao óleo nanoestruturado e não devido aos excipientes das fórmulas.

72 horas de tratamento em MCF-7

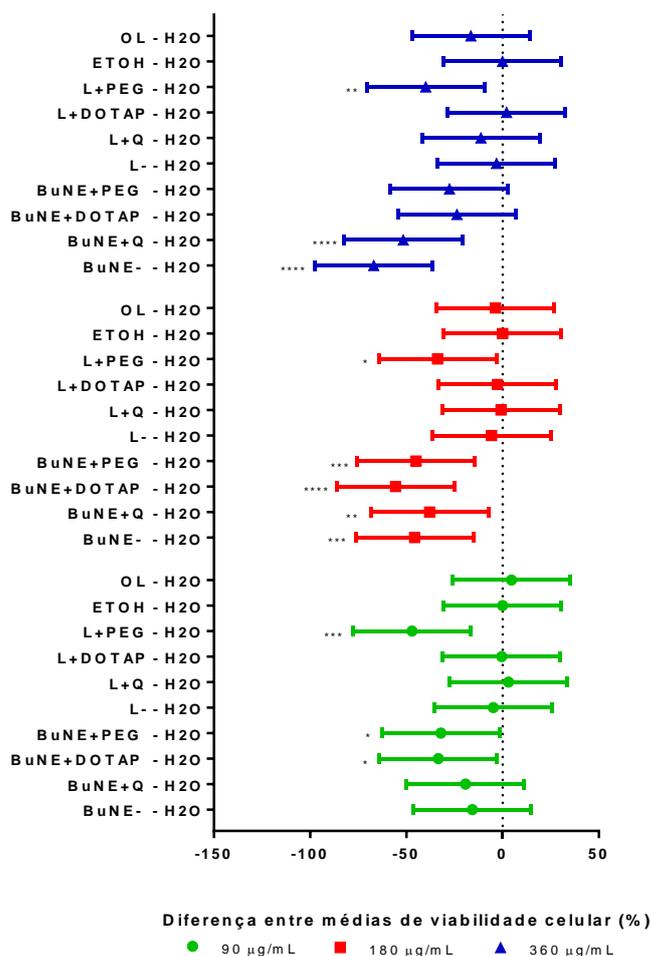


Figura 19. Gráfico representativo do ensaio de viabilidade celular de células de câncer de mama MCF-7 após 72 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL. O eixo “X” indica a diferença entre as médias de viabilidade celular em porcentagem das células tratadas com controle negativo água (H₂O). O “0” indica 100% de células viáveis. Os valores positivos referem-se o aumento da viabilidade celular, enquanto que o os valores negativos referem-se a diminuição da viabilidade. (Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície - BuNE-; Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” - BuNE+DOTAP; Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “polyoxyl 40 stearate” - BuNE+PEG; Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q; L- Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície; L+DOTAP – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com

fosfolipídio “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane”; L+PEG – Branco da nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “polyoxyl 40 stearate”; L+Q – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana; ETOH – Etanol; OL – óleo de buriti). Valores representados pela média± desvio-padrão. P<0,05.

Rocha (2014) e colaboradores mostraram com estudos anteriores com células de câncer de mama humano não metastático (MCF-7) com nanoemulsões à base de óleo de pequi (NE-) e nanoemulsões à base de óleo de baru (*Dipteryx alata*) (BaNE-) e seus respectivos óleos após 24 e 72 horas de tratamento. Foi observado que a NE-, na dose de 83,3µg/mL reduziu a viabilidade celular em 26,2% na terapia de 24 horas enquanto que a redução no tratamento de 72 horas foi de 45,6%. Assim, houve um padrão de tempo dependência. Enquanto que a BaNE- reduziu a viabilidade das células MCF-7 em 34,7% depois de 24 horas e em 29,2% após 72 horas.

Araújo (2016) também realizou o teste de viabilidade celular em MCF-7 com NE- nas concentrações de 360 µg/mL, 225 µg/mL, 180 µg/mL, 135 µg/mL e 90 µg/mL. Em 24 horas de tratamento, as menores concentrações não apresentaram efeito na viabilidade celular, enquanto que a maior dose diminuiu a viabilidade em 30%. Já em 72 horas de tratamento, todas as concentrações reduziram a viabilidade celular, o que indicou um padrão de tempo-dependência.

Pode-se realizar um paralelo entre estes dados e aqueles apresentados pela BuNE-. Esta formulação apresentou uma diminuição da viabilidade celular bem mais expressiva, tanto em 24 quanto em 72 horas, quando comparadas aos tratamentos com NE- e BaNE nas células MCF-7.

O grupo de Rocha (2016) também testou as nanoemulsões NE- e BaNE- em células de câncer de mama murino metastático (4T1) pelos mesmos períodos e concentrações testadas em células MCF-7. Em 24 horas de terapia com BaNE-, a viabilidade diminuiu cerca de 33,9% enquanto que em 72 horas a redução foi de 21,6%. Já o tratamento com NE- reduziu em 5,6% depois de 24 horas e em 13,9% após 72 horas. Fato interessante, já que o esperado seria que o tratamento mais longo levasse a uma diminuição da viabilidade celular maior em relação à tratamento de menor tempo.

Em outro estudo, foi demonstrado que células de glioma de rato (C6) após serem tratadas com nanoemulsões de óleo de semente de romã carregadas com cetoprofeno e

estabilizadas por puloulano por 72 horas na concentração de 100 μM inibiram o crescimento celular em 40% (Ferreira *et al.*, 2015).

Há poucos relatos na literatura de nanoemulsões à base de óleos provenientes de plantas do cerrado usados para ensaios de viabilidade celular, mas este cenário muda em relação aos extratos obtidos dessas plantas. Mesquita e colaboradores (2009) produziram 412 extratos a partir de 50 plantas do cerrado e realizaram uma triagem para selecionar os extratos que diminuíssem a viabilidade celular de células de leucemia, melanoma, carcinoma de cólon humano e glioblastoma. Vinte e oito extratos apresentaram diminuição da viabilidade das células dos cânceres citados acima em pelo menos 85% na dose de 50 $\mu\text{g/mL}$.

De acordo com os resultados do teste de viabilidade celular dos extratos de plantas do cerrado, a flora brasileira apresenta um enorme potencial como matéria-prima para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o câncer. O buriti, em especial, demonstrou resultados promissores na diminuição da viabilidade de células MCF-7 quando nanoestruturado. Portanto, nanoemulsões à base desse óleo são terapias adjuvantes em potencial contra o câncer de mama não metastático.

6.2.1.2 NIH/3T3

Além de visar à análise da viabilidade celular em células de câncer de mama MCF-7 após o tratamento com BuNEs, teste de MTT também teve como o objetivo estudar o efeito dessas nanoemulsões em células saudáveis de fibroblasto (NIH/3T3). É importante realizar o paralelo entre uma linhagem celular de câncer e outra saudável para que se verifique se só uma delas apresentou citotoxicidade ou ambas. E, conseqüentemente, analisar se as formulações desenvolvidas seriam eficazes (capacidade máxima de se produzir um efeito) e eficientes (capacidade de ser seguro).

O ensaio de viabilidade celular em NIH/3T3 foi feito após 24 e 72 horas de tratamento nas concentrações de 90 $\mu\text{g/mL}$, 180 $\mu\text{g/mL}$ e 360 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo foi representado pela água para os tratamentos das nanoemulsões, os quais foram BuNE-, BuNE+DOTAP, BuNE+PEG e BuNE+Q, e a terapia com o óleo livre de buriti que teve ETOH como controle negativo.

Após a exposição das NIH/3T3 aos tratamentos por 24 horas (Figura 20), pôde-se observar redução estatisticamente significativa da viabilidade em BuNE- (15,67%±7,97) e L+DOTAP (17,13±5,83) na dose de 180µg/mL e BuNE+Q (20±12,16%) e L+DOTAP (14,77±4,53%) na concentração de 360µg/mL quando comparadas ao controle água. Nos demais tratamentos, a viabilidade celular permaneceu similar ao CTL H₂O.

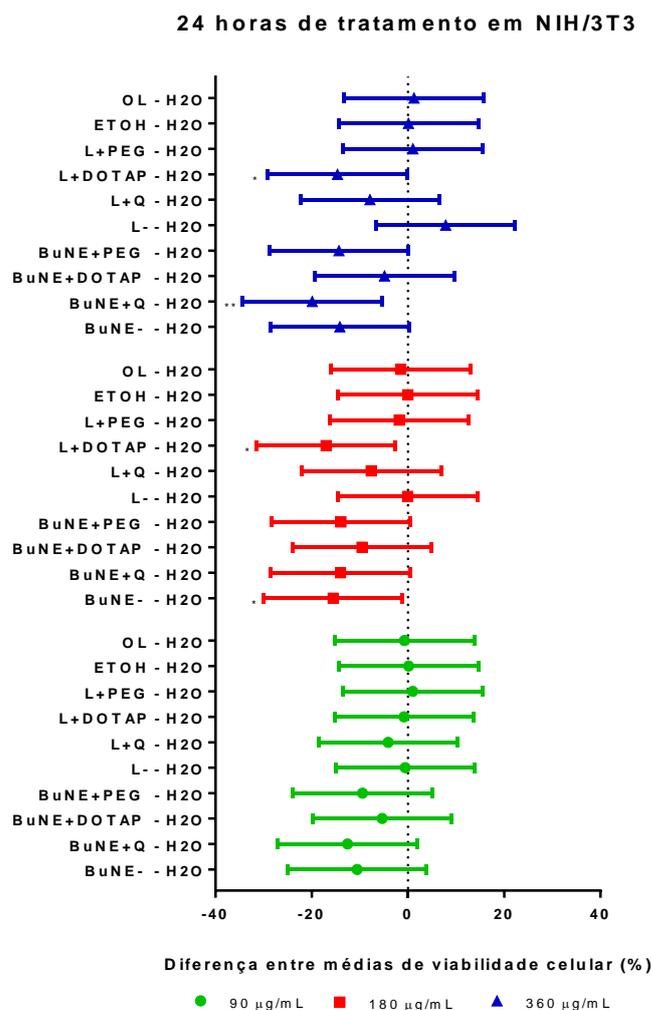


Figura 20. Gráfico representativo do ensaio de viabilidade celular de células saudáveis de fibroblasto NIH/3T3 após 24 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL. O eixo “X” indica a diferença entre as médias de viabilidade celular em porcentagem em relação ao controle negativo água (H₂O). O “0” indica 100% de células viáveis. Os valores positivos são o aumento da viabilidade celular, enquanto que os valores negativos são a diminuição da viabilidade. (Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície -BuNE-; Nanoemulsão de óleo

de buriti com fosfolipídio “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” - BuNE+DOTAP; Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “polyoxyl 40 stearate” - BuNE+PEG; Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q; L- Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície; L+DOTAP – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane”; L+PEG –Branco da nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “polyoxyl 40 stearate”; L+Q – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana; ETOH – Etanol; OL – óleo de buriti). Valores representados pela média± desvio-padrão. P<0,05.

Depois de 72 horas de tratamento, a viabilidade celular de NIH/3T3 demonstrou uma tendência de aumento de forma dose e tempo dependente (Figura 21). Notou-se que a as nanoemulsões BuNE+Q (30,01±6,34%) e BuNE+DOTAP (29±22,01%) na dose de 90µg/mL aumentaram a viabilidade dos fibroblastos; BuNE- (21,52±13,07%), BuNE+DOTAP (42,83±26,40%), BuNE+PEG (25,17±14,32%) na concentração de 180µg/mL elevaram a viabilidade de NIH/3T3 e BuNE- (29,8±11,98%), BuNE+Q (28,58±18,00), BuNE+DOTAP (76,70±20,34), BuNE+PEG (34±17,10%) e L- (23,50±8,52) na concentração de 360µg/mL aumentaram a viabilidade destas células. Enquanto que L+DOTAP (22,85±21,55%) na dose de 180µg/mL diminuiu a viabilidade. Deve-se ressaltar que o óleo livre de buriti não alterou a viabilidade de NIH/3T3 em comparação com o CTL H₂O em nenhuma dose.

De acordo com os valores de BuNE+DOTAP e L+DOTAP para 180µg/mL, não se pode afirmar que houve realmente um aumento da viabilidade celular, pois o branco desta nanoemulsão levou a um resultado contrário. Provavelmente os excipientes interagiram de alguma forma com os fibroblastos.

72 horas de tratamento em NIH/3T3

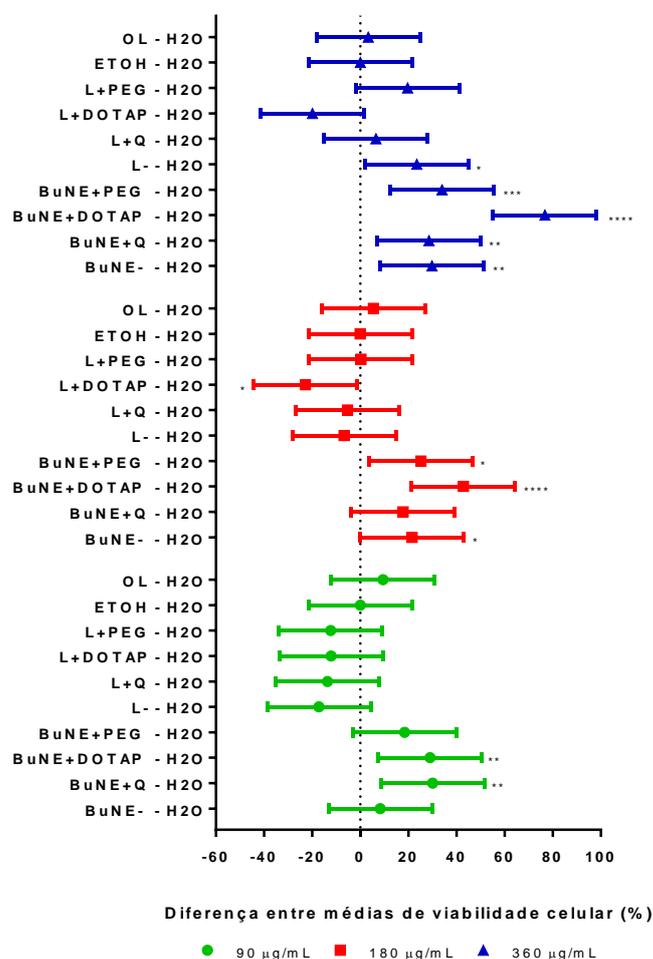


Figura 21. Gráfico representativo do ensaio de viabilidade celular de células saudáveis de fibroblasto NIH/3T3 após 72 horas de tratamento com nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNEs) nas doses de 90µg/mL, 180µg/mL e 360µg/mL. O eixo “X” indica a diferença entre as médias de viabilidade celular em porcentagem em relação ao controle negativo água (H₂O). O “0” indica 100% de células viáveis. Os valores positivos são o aumento da viabilidade celular, enquanto que os valores negativos são a diminuição da viabilidade. (Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície -BuNE-; Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” - BuNE+DOTAP; Nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “polyoxyl 40 stearate” - BuNE+PEG; Nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana - BuNE+Q; L- Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície; L+DOTAP – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-sn-

glycero-3-trimethylammonium propane”; L+PEG – Branco da nanoemulsão à base de óleo de buriti com polímero “*polyoxyl 40 stearate*”; L+Q – Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com polímero de quitosana; ETOH – Etanol; OL – óleo de buriti). Valores representados pela média± desvio-padrão. P<0,05.

Esses resultados corroboram com os estudos de Zanatta e colaboradores (2008 e 2010). O grupo desenvolveu loções e cremes à base de óleo de buriti e analisou como essas formulações agiriam em células saudáveis de fibroblasto murino NIH/3T3) e em células de queratinócitos da pele humana (HaCaT). Foi observado que estas formulações não causaram irritação na pele devido à baixa citotoxicidade encontrada nos resultados do método de vermelho neutro.

O mesmo grupo produziu em 2010 emulsões e nanoemulsões de óleo de buriti e testaram o potencial de fotoproteção das formulações destas células NIH/3T3 e HaCaT. Tais células foram expostas por meia hora aos raios ultravioleta A e B (UVA e UVB) e, em seguida, tratadas com as emulsões e nanoemulsões à base de óleo de buriti por 15 minutos na dosagem de 100µL. As células HaCaT mostraram recuperação após o tempo de terapia. Em consequência, tais formulações à base de óleo de buriti demonstraram potencial de fotoproteção.

Em 24 horas de tratamento com as BuNEs, observou-se uma redução não estatisticamente significativa da viabilidade de células saudáveis de fibroblasto. Inesperadamente, os resultados de 72 horas de exposição às formulações foram contrários aos de 24 horas. Houve um aumento da viabilidade celular. Portanto, estas nanoemulsões podem ser potenciais terapias para propiciar e/ou acelerar processos de cicatrização para 72 horas de tratamento.

Ao comparar os dados do ensaio de MTT de células MCF-7 com o de células NIH/3T3, optou-se por dar continuidade aos próximos experimentos com os tratamentos BuNE- e BuNE+DOTAP. Em células MCF-7 o efeito da terapia com BuNE- e BuNE+DOTAP foi somente dose-dependente (Figuras 18 e 19). A nanoemulsão BuNE+Q também induziu diminuição significativa da viabilidade celular. Mas como é um polímero ácido havia a necessidade de ajustar o pH da BuNE+Q para que as células de câncer de mama fossem tratadas com esta formulação. Apesar de ocorrer redução da viabilidade celular de fibroblasto após o tratamento com BuNEs em 24 horas, este período de terapia foi escolhido para os próximos experimentos, já que a diminuição não foi estatisticamente significativa.

Em conclusão, os próximos passos na investigação dos mecanismos de ação foram realizados com as nanoemulsões à base de óleo de buriti BuNE- e BuNE+DOTAP na dose de 360µg/mL por 24 horas.

6.2.2 Análise do perfil de morte celular de células de câncer de mama MCF-7 após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

Depois de 24 horas de tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP na concentração de 360µg/mL, as células de câncer de mama MCF-7 foram marcadas com ANEXINA V-FITC (marcador de apoptose) e com Iodeto de Propídeo (IP – marcador de necrose) para verificar o perfil de morte celular após a terapia com estas nanoemulsões.

Os parâmetros do citômetro de fluxo foram ajustados por meio de dois grupos de células de MCF-7 expostas por 24h ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em 360µg/mL: um conjugado apenas com Anexina V-FITC (Figura 22A) e outro ligado apenas ao IP (Figura 22B). O eixo “X” (FITC-H: FITC-H) representa as células marcadas com Anexina V-FITC enquanto que o eixo “Y” (PerCP-H: PerCP-H) indica as células marcadas com IP. Cada gráfico (“*dot plot*”) é dividido por quatro quadrantes. O Quadrante 1 (Q1) indica as células marcadas somente com IP (células em necrose), o Quadrante 2 (Q2) representa as células com dupla marcação, ou seja, com Anexina V-FITC e IP (células em apoptose ou apoptose tardia), o Quadrante 3 (Q3) mostra as células marcadas somente com Anexina V-FITC (células em apoptose) e o Quadrante 4 (Q4) são das células que não foram conjugadas a nenhum dos marcadores (células vivas). Todos os “*dot plots*” dos tratamentos foram avaliados neste mesmo padrão de quadrantes.

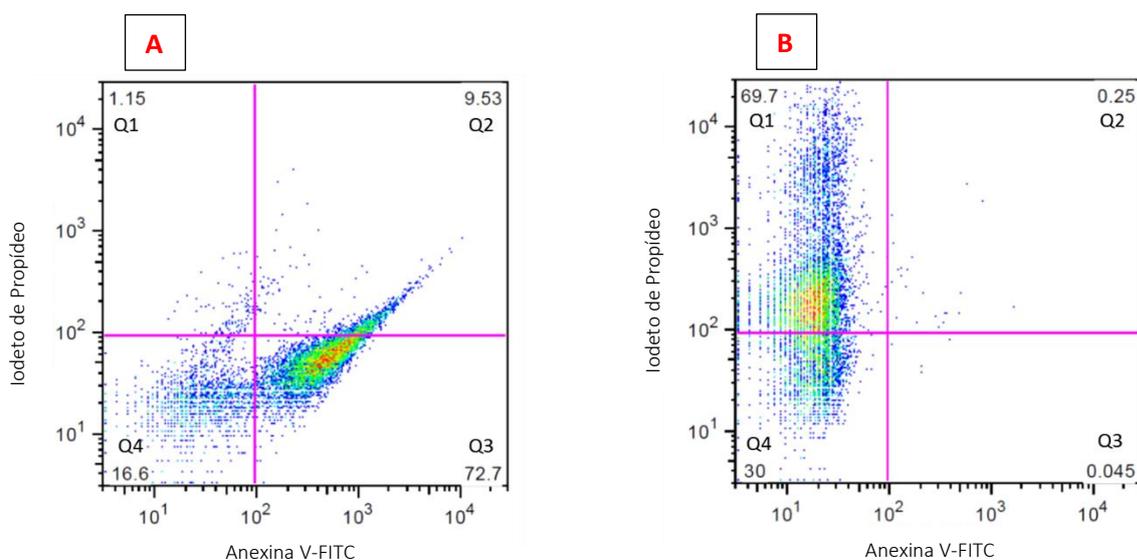


Figura 22. Ajuste dos padrões do citômetro de fluxo. As células de câncer de mama MCF-7 foram tratadas por 24 horas com Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 360µg/mL. A) H₂O₂ marcado com Anexina V-FITC. B) H₂O₂ ligado ao Iodeto de Propídeo (IP). O eixo “X” representa as células marcadas com Anexina V-FITC enquanto que o eixo “Y” indica as células marcadas com IP. Cada gráfico (“dot plot”) é dividido por quatro quadrantes. O Quadrante 1 (Q1) indica as células marcadas somente com IP (células em necrose), o Quadrante 2 (Q2) representa as células com dupla marcação, ou seja, com Anexina V-FITC e IP (células em apoptose ou apoptose tardia), o Quadrante 3 (Q3) mostra as células marcadas somente com Anexina V-FITC (células em apoptose) e o Quadrante 4 (Q4) são das células que não foram conjugadas a nenhum dos marcadores (células vivas).

A água e o H₂O₂ foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. As células MCF-7 foram tratadas por 24 horas na dose de 360µg/mL e, após esse período, foram incubadas com Anexina V-FITC e IP para o estudo da morte celular. A figura 23A representa o controle negativo e, como esperado, a maior parte das células (95%) encontra-se no Q4, o qual indica células não marcadas. Já a figura 23B mostra o controle positivo. A grande maioria das células está no Q2 (75,5%), portanto estão no processo de apoptose ou apoptose tardia.

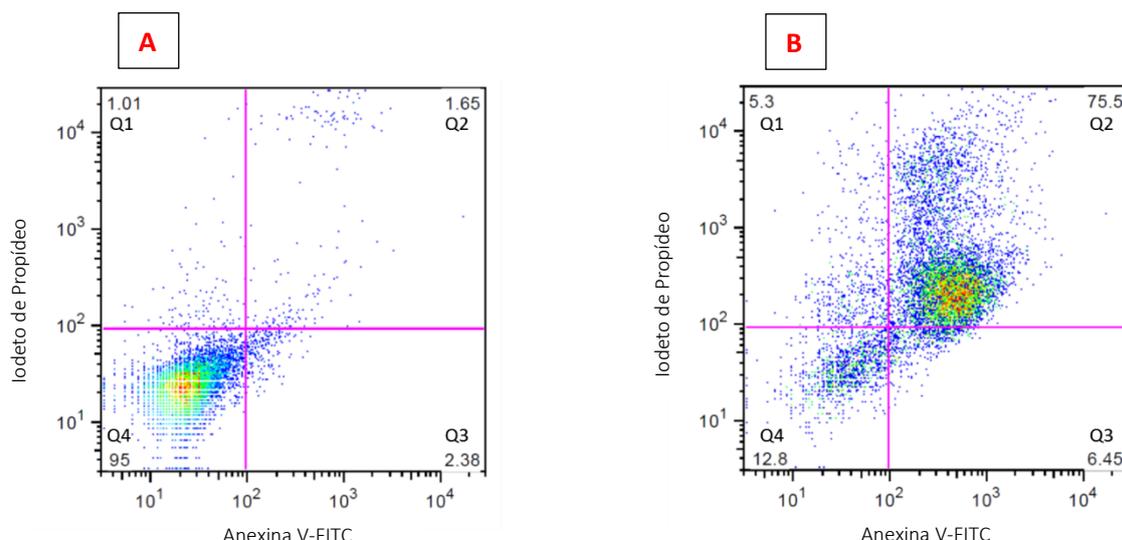


Figura 23. “Dot plots” das células de células de câncer de mama MCF-7 tratadas por 24 horas com água (H₂O) – controle negativo e Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) – controle positivo, ambos a 360µg/mL. A) controle negativo e B) controle positivo. O eixo “X” representa as células marcadas com Anexina V-FITC enquanto que o eixo “Y” indica as células marcadas com Iodeto de Propídeo (IP). Cada gráfico é dividido por quatro quadrantes. O Quadrante 1 (Q1) indica as células marcadas somente com IP (células em necrose), o Quadrante 2 (Q2) representa as células com dupla marcação, ou seja, com Anexina V-FITC e IP (células em apoptose ou apoptose tardia), o Quadrante 3 (Q3) mostra as células marcadas somente com Anexina V-FITC (células em apoptose) e o Quadrante 4 (Q4) são das células que não foram conjugadas a nenhum dos marcadores (células vivas).

As figuras 24A, 24B, 24C e 24D representam as terapias com BuNE-, BuNE+DOTAP, L- e L+DOTAP, respectivamente. O tratamento com BuNE- levou à promoção de morte celular de 50,5% (apoptose – 4,95%, apoptose ou apoptose tardia – 39,3% e necrose – 6,25%), enquanto que a nanoemulsão BuNE+DOTAP promoveu 53,08% de morte celular (apoptose – 2,98%, apoptose ou apoptose tardia – 42% e necrose – 8,1%). Deve-se destacar que nenhum branco (formulações somente com os excipientes de cada nanoemulsão) induziu morte celular significativa. Conclui-se desse fato que o óleo das nanoemulsões induzem a morte celular e não de seus excipientes. Entretanto, como a maior parte das células se encontrou no Q2 (BuNE-: 39,3% e BuNE+DOTAP: 42%), não se pode estabelecer o perfil de morte celular. Conseqüentemente, mais estudos são necessários para se desvendar tal perfil.

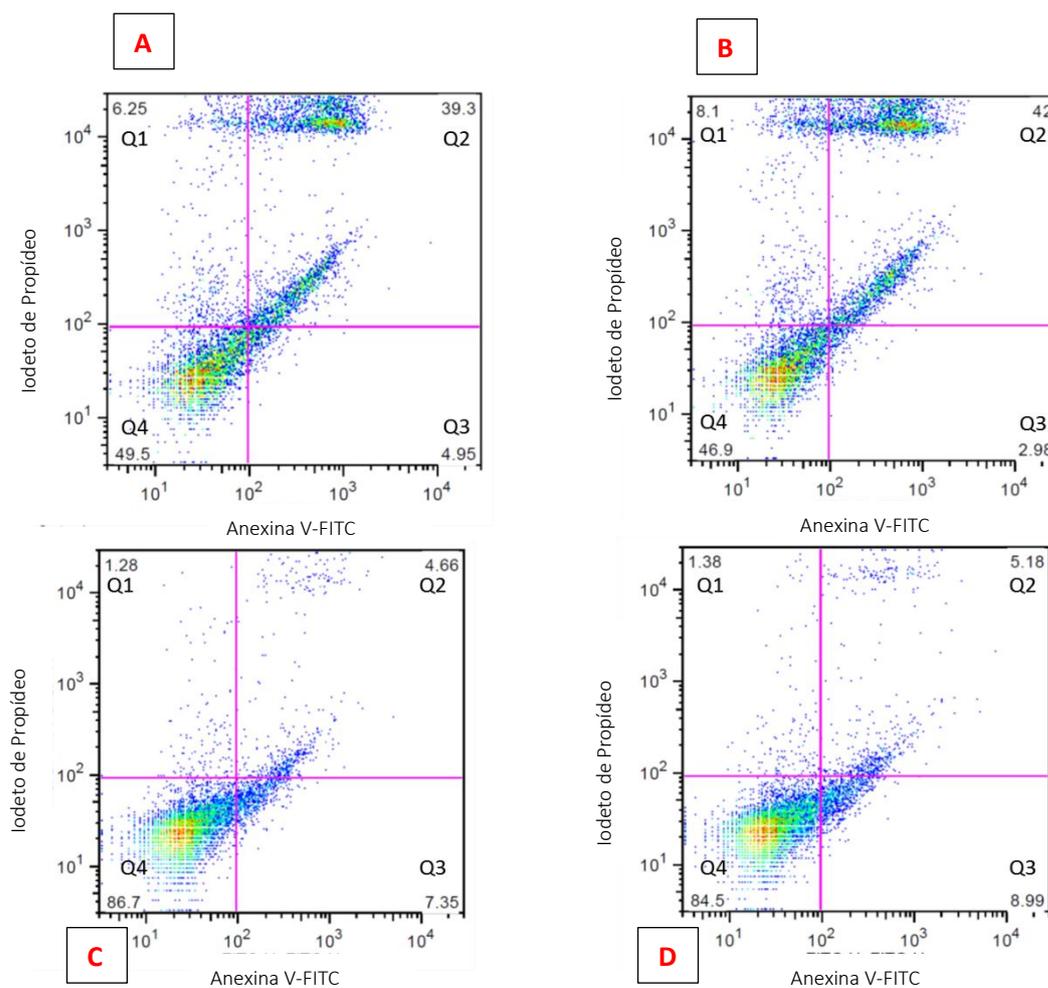


Figura 24. “Dot plots” das células de células de câncer de mama MCF-7 tratadas por 24 horas com: A) Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (BuNE-), B) Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “*1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*” (BuNE+DOTAP), C) Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (L-) e D) Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “*1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*” (L+DOTAP), ambos a 360 μ g/mL. O eixo “X” representa as células marcadas com Anexina V-FITC enquanto que o eixo “Y” indica as células marcadas com Iodeto de Propídeo (IP). Cada gráfico é dividido por quatro quadrantes. O Quadrante 1 (Q1) indica as células marcadas somente com IP (células em necrose), o Quadrante 2 (Q2) representa as células com dupla marcação, ou seja, com Anexina V-FITC e IP (células em apoptose ou apoptose tardia), o Quadrante 3 (Q3) mostra as células marcadas somente com Anexina V-FITC (células em apoptose) e o Quadrante 4 (Q4) são das células que não foram conjugadas a nenhum dos marcadores (células vivas).

O estudo de Silva (2016) com nanoemulsão à base de óleo de pequi sem adição de polímeros e lipídeos (NE-) apresentou resultado similar (51,9%) aos dados encontrados no ensaio de perfil de morte celular de BuNE-. Ambas as pesquisas utilizaram células MCF-7, entretanto, o tratamento com a NE- durou 72 horas e foi na dose de 167,5 µg/mL, diferentemente do tratamento com BuNE-, que foi por 24 horas na concentração de 360 µg/mL.

Dados similares ao tratamento com BuNE- foram encontrados por Bu e colaboradores (2014) com o tratamento com nanoemulsão de paclitaxel incorporada a TPGS em células de câncer de mama MCF-7. A terapia foi feita por 48 horas na concentração de 2,0 mg/mL. O percentual de células em apoptose com a exposição a esta nanoemulsão foi de 41,21%, enquanto que somente a solução de paclitaxel levou à 5,38% de morte celular.

Nanoemulsões de óleo de buriti apresentam um grande potencial para serem novas terapias adjuvantes contra o câncer de mama. O ensaio demonstrou que praticamente metade das células entraram em morte celular com os tratamentos de BuNE- e BuNE+DOTAP.

6.2.3 Análise da fragmentação de ADN e ciclo celular de células de câncer de mama MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

Depois de 24 horas de tratamento, na dose de 360 µg/mL, com controle negativo água, BuNE- e BuNE+DOTAP e seus respectivos brancos (L- e L+DOTAP), as células de câncer de mama MCF-7 foram marcadas com IP para a verificação da presença de fragmentação do ADN. De acordo com a figura 25, não houve fragmentação significativa do ADN em nenhuma terapia, nem mesmo com as nanoemulsões BuNE- e BuNE+. Então, sugere-se que o perfil de morte celular analisado no item 6.2.2 seja por apoptose, já que a fragmentação deste ácido nucleico é um indício do processo de apoptose celular.

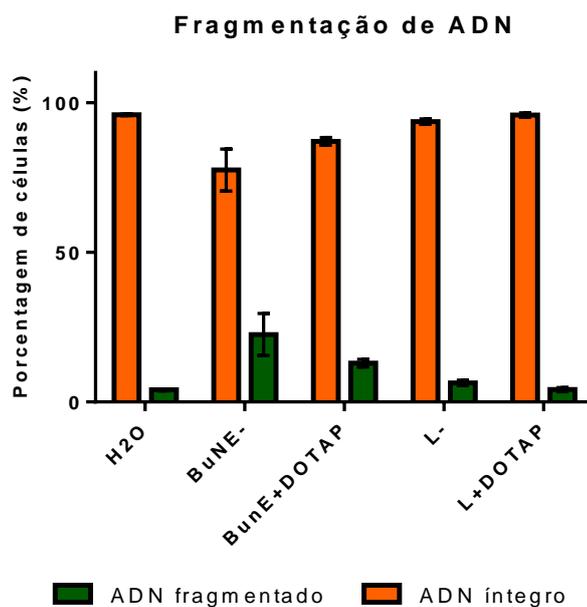


Figura 25. Representação da porcentagem de células de câncer de mama MCF-7 com ácido desoxirribonucleico (ADN) fragmentado e íntegro após 24 horas de exposição aos tratamentos Controle negativo água (H₂O), Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (BuNE-), Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2-*dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*” (BuNE+DOTAP), Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (L-) e Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2-*dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane*” (L+DOTAP), ambos a 360µg/mL. Valores representados pela média± desvio-padrão.

Estudos de Silva (2016) demonstraram que nanoemulsão de óleo de pequi sem polímero ou lipídeo levou a 5,1% de fragmentação de ADN em exposição por 72 horas a 167,5µg/mL nas células MCF-7. Tais resultados corroboram com aqueles encontrados pelo presente estudo, já que também não houve fragmentação de ADN significativa após exposição às BuNE- e BuNE+DOTAP. Entretanto, as formulações levaram a uma maior fragmentação deste ácido nucleico (BuNE-: 22,5±7,0 e BuNE+DOTAP: 13,0±1,3)

Em contrapartida, extratos de curcuminóide demonstraram fragmentação de ADN em células de glioblastoma multiforme humano (GBM 8401) depois de 16 horas na concentração de 25 µM (Huang *et al.*, 2010).

Durante o ensaio de fragmentação do ADN, também houve a análise do ciclo celular (Figura 26). As células MCF-7 foram tratadas nas mesmas condições do teste de fragmentação. Observou-se que somente a exposição à BuNE- mudou significativamente o padrão do ciclo celular em relação ao controle negativo água (Figura 26). O tratamento com o controle negativo água apresentou 10,13±1,24% das células na fase S, enquanto que BuNE- teve 26,96±7,69% das células nesta fase do ciclo celular. Outra diferença significativa foi em relação à fase G2/M. 34,43±2,87% das células tratadas com água estavam nesta fase e apenas 18,11±9,72% das células expostas à BuNE- estavam em G2/M. Conclui-se que a nanoemulsão BuNE- promoveu um aumento da fase de duplicação do ciclo celular (fase S) enquanto que houve uma diminuição da divisão das células (fase G2/M). Provavelmente isto ocorreu, pois, com o aumento do número de células de câncer de mama em duplicação do ADN, houve algum problema na passagem natural do ciclo celular da fase S para a fase G2/M. Conseqüentemente, as células encontraram dificuldade para a sua multiplicação.

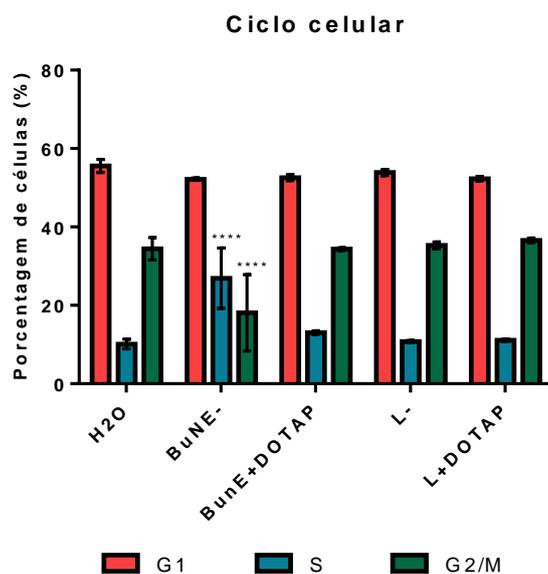


Figura 26. Representação das fases do ciclo celular de células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície (BuNE-) e Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” (BuNE+DOTAP) na concentração de 360µg/mL. O controle negativo utilizado foi a água (H₂O). (Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície - L- e Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio “1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” - L+DOTAP). Valores representados pela média± desvio-padrão. ****P<0,0001.

Nanopartículas de prata associadas à quitosana (CH-AgNPs) apresentaram diferença significativa nas fases do ciclo celular de células de câncer de pele não melanoma (A431) em 24 horas de tratamento na concentração de 50 μM . Enquanto que 60% das células estavam em crescimento (somente 50% delas estavam na fase G1 com o controle negativo), 15% estavam em fase G2/M. A quantidade de células em replicação foi menor em comparação ao controle negativo, que apresentou cerca de 25% das células em fase G2/M (Ombredane, 2016).

Assim como observado na BuNE-, nanoemulsões à base de óleo de pequi sem e com quitosana também demonstraram um aumento de células na fase G2/M. A terapia foi feita por 24 horas na dose de 167,5 $\mu\text{g/mL}$. A nanoemulsão sem quitosana apresentou 18,9% das células em G2 e a nanoemulsão com quitosana mostrou que 19,7% das células estavam nessa fase. As nanoemulsões de óleo de pequi também devem levar a alguma alteração dos mecanismos que conduzem um ciclo celular normal e impedem que as células passem para a fase de divisão.

6.2.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

Em 24 horas de exposição das células MCF-7 a BuNE- e BuNE+DOTAP na concentração de 360 $\mu\text{g/mL}$, alterações no potencial de membrana não foram observadas (figura 27). Espera-se que as células controle tenham o potencial mitocondrial normal, assim como foi visto no experimento. Da mesma forma, as nanoemulsões e seus respectivos brancos mantiveram o estado normal do potencial de membrana.

Quando há hiperpolarização da membrana mitocondrial, há um excesso de carga negativa dentro desta organela. Como consequência há lesão e ruptura desta membrana, o que gera toda uma sinalização molecular de apoptose e, por fim, a morte da célula (Ly; Grubb; Lawen, 2003).

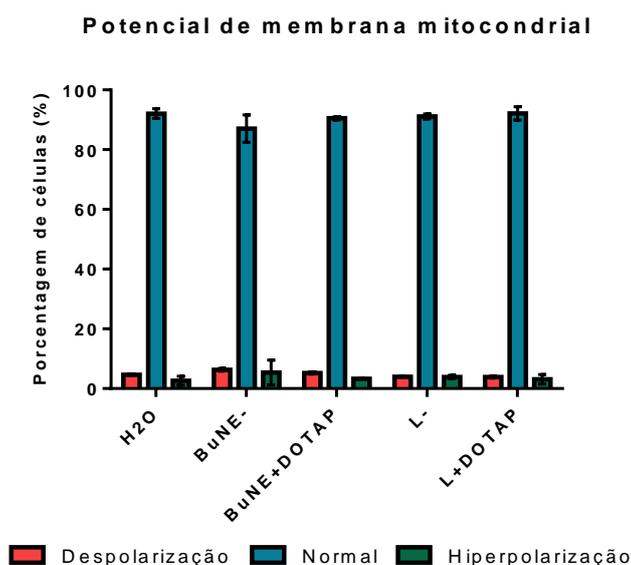


Figura 27. Porcentagem do perfil de potencial mitocondrial em células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (BuNE-) e Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” (BuNE+DOTAP) na concentração de 360µg/mL. (Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície - L- e Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” - L+DOTAP e controle negativo água – H₂O).

Estudos com nanoemulsão de paclitaxel incorporada a TPGS demonstrou que as células MCF-7 sofreram principalmente apoptose no processo de morte celular. Além disso, houve hiperpolarização da membrana mitocondrial. Ensaio moleculares mostraram que a proteína pró-apoptótica caspase-3 foi ativada e, em consequência, houve o processo de apoptose (Bu *et al.*, 2014).

6.2.5 Análise da integridade de membrana e proliferação de células de câncer de mama, MCF-7, após tratamento com BuNE- e BuNE+DOTAP

Nenhum tratamento levou a uma significativa lesão de membrana plasmática das células MCF-7 (Figura 28). O CTL H₂O apresentou 4,22±1,38% de células lesionadas; BuNE-, 23,30±16,22% e BuNE+DOTAP, 11,49±1,99% de células com ruptura da membrana. O mesmo padrão foi observado nos brancos das nanoemulsões. Pode-se inferir que as células não se encontravam em necrose, porque a perda da integridade da membrana plasmática é uma característica conhecida como “*Hallmark of necrotic cell death*” (Charlagorla *et al.*, 2013). Ou seja, não há processo de necrose celular sem que ocorra lesão da membrana plasmática.

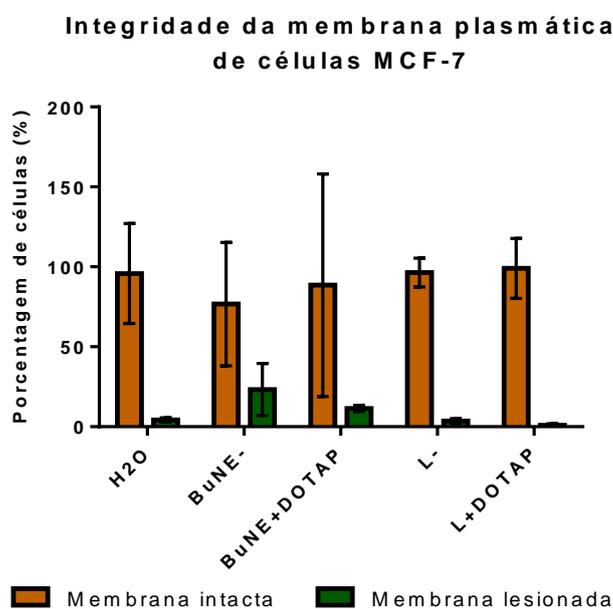


Figura 28. Análise da integridade de membrana plasmática após exposição de nanoemulsões de buriti por 24 horas em células de câncer de mama MCF-7. Legenda: com controle negativo água (H₂O); Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (BuNE-); Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” (BuNE+DOTAP); Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (L-), e Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane” (L+DOTAP) na concentração de 360µg/mL em células de câncer de mama MCF-7. Valores representados pela média± desvio-padrão.

Diferentemente dos dados obtidos no perfil de lesão de membrana com nanoemulsões à base de óleo de buriti, nanopartículas de prata associadas à quitosana (CH-AgNPs) ou não (AgNPs), na dose de 50 μ M, levaram a 43,4 \pm 2,7% e 53,4 \pm 11,7%, respectivamente, de ruptura da membrana plasmática após 24 horas de tratamento em células de câncer de pele não melanoma (A431) (Ombredane, 2016).

Em relação à proliferação celular (Figura 29), as nanoemulsões BuNE- e BuNE+DOTAP reduziram o número de células MCF-7, entretanto, essa redução não foi significativa. A contagem de células após o tratamento com água apresentou valor de 100,0 \pm 31,3, enquanto que a contagem de MCF-7 expostas à BuNE- foi de 62,0 \pm 33,9 e a contagem das células de câncer de mama após a terapia com BuNE+DOTAP foi de 52,4 \pm 35,4. Nenhum dos brancos das nanoemulsões alterou o número de células em comparação ao controle negativo água (Figura 29).

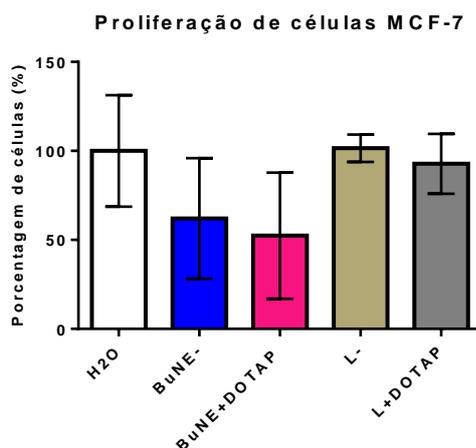


Figura 29. Gráfico da proliferação de células de câncer de mama MCF-7 após 24 horas de exposição ao controle negativo água (H₂O); Nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (BuNE-); Nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-*sn*-glycero-3-trimethylammonium propane” (BuNE+DOTAP); Branco da nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolípido em sua superfície (L-), e Branco da nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolípido “1,2- dioleoyl-*sn*-glycero-3-trimethylammonium propane” (L+DOTAP) na concentração de 360 μ g/mL. Valores representados pela média \pm desvio-padrão.

Como houve uma expressiva diminuição da viabilidade celular no experimento de MTT em células MCF-7 (Item 6.2.1.1) e o experimento de exposição à fosfatidilserina apresentou alta taxa de morte celular, os dados obtidos no ensaio de proliferação celular foram contraditórios. Entretanto, como os desvio-padrão deste experimento foram elevados, mais estudos são necessários para que essa contradição seja desvendada.

7. CONCLUSÕES

Nanoemulsões à base de óleo de buriti foram desenvolvidas eficazmente e são estáveis quando armazenadas a 4°C por 270 dias (exceto a BuNE+DOTAP que apresentou estabilidade por 60 dias nesta temperatura). Também possuem a capacidade de se manterem estáveis a alterações de pH e diluições, o que propicia à administração endovenosa dessas formulações, pois neste processo há alternâncias de diluição na corrente sanguínea e o pH do alvo pode ser diferente do pH das nanoemulsões.

Foi observado que em teste de viabilidade celular, células de câncer de mama apresentaram uma significativa citotoxicidade com a terapia de nanoemulsão de óleo de buriti sem adição de polímeros ou fosfolipídio em sua superfície (BuNE-) e nanoemulsão de óleo de buriti com fosfolipídio 1,2- dioleoyl-sn-glycero-3-trimethylammonium propane (BuNE+DOTAP) quando expostas por 24 horas a esses tratamentos na dose de 360µg/mL. Em contrapartida, células saudáveis de fibroblasto mostraram um aumento da viabilidade celular nas mesmas condições de tratamentos das células de câncer mamário.

No ensaio do perfil de morte celular das células de câncer de mama, não se pôde determinar com exatidão o tipo de morte das células, mas ficou evidente que a maioria delas estavam em processo de mortalidade, como visto no teste de viabilidade celular quando tratadas por 24 horas com 360µg/mL de BuNE- e BuNE+DOTAP.

As células de câncer de mama não apresentaram fragmentação de ADN, alteração do potencial mitocondrial e lesão de membrana plasmática ao serem expostas por 24 horas às nanoemulsões BuNE- e BuNE+DOTAP na dose de 360µg/mL.

Somente o tratamento de BuNE- levou à alteração no ciclo celular: houve um aumento das células em replicação do ADN (fase S) mas a taxa de divisão celular diminuiu (fase G2/M). Como a fase G2/M é a subsequente à fase S, era esperado que o número de células em divisão celular diminuísse, pois houve alguma alteração na fase S para que o número das células nesta fase aumentasse. Mais estudos são necessários para desvendar os mecanismos envolvidos em tal mudança do perfil do ciclo celular promovida pelos tratamentos com BuNE- por 24 horas na concentração de 360µg/mL.

As nanoemulsões BuNE- e BuNE+DOTAP são potenciais adjuvantes na terapia contra o câncer de mama e também demonstram um potencial como medicamentos para a cicatrização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANI, M. *et al.* Preparation and optimization of acetaminophen nanosuspension through nanoprecipitation using microfluidic devices: an artificial neural networks study. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v.9, n. 2, p.115-120, dez. 2011.

ALLAN, R. Nanotechnology: the next revolution to redefine electronics. (cover story: engineering feature). **Electronic design**, v. 51, n. 11, p. 55-62, mai. 2003.

ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I. *et al.* Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. **Toxicology Letters**, v. 152, n. 3, p. 203-211, set. 2004.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, fev. 1996.

ANTON, N.; VANDAMME, F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 978-985, 2011.

ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 419, n. 1-3, p. 137-143, nov. 1998.

AQUINO, J. S. *et al.* Refining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the Brazilian Cerrado: physicochemical, thermal-oxidative and nutritional implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 212-219, 2012.

ARAÚJO, V.H. S. **Nanoemulsões à base de óleo de pequi (Caryocar brasiliense): síntese, caracterização e avaliação do efeito em células de carcinoma mamário.** Brasília. 2016. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

ASSI, H. A. *et al.* Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. **Journal of Thoracic Disease**, v. 5, suplemento 1, p. S2-8, jun 2013.

AUST, O. *et al.* Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **Journal of Chromatography A**, v. 936, n. 1-2, p. 83-93, nov. 2001.

BARCIA, J. J.,The Giemsa Stain: Its History and Applications, **International Journal of Surgical Pathology**, v. 15, n. 3, p. 292-296, jul. 2007.

BATES, D. O. *et al.* Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 6, p. 581-597, jun 2002.

BATISTA, J. S. *et al.* Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. Antibacterial and healing activities of buriti oil *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 136-141, jan. 2012.

BERTRAND, N.; LEROUX, J. C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n.2, p. 152-163, jul 2012.

BERTRAND, N. *et al.* Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2-25, 2014.

BHARGAVA, K. *et al.* Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69-73, mai. 2015.

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

BRITANNICA ACADEMIC. **Nanoparticle**. Disponível em: < <http://academic-eb-britannica.ez54.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/nanoparticle/487273> > . Acesso em: 01 mar. 2017.

BU, H. *et al.* A TPGS-incorporating nanoemulsion of paclitaxel circumvents drug resistance in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 206-213, ago. 2014.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, n. 2, p. 326-342, set 2010.

CEVIK, U.; DALGAR, T. Intravenously administered propidium iodide labels necrotic cells in the intact mouse brain after injury. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 8, p. 928-929, 2003.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8906-8913, set. 2013.

CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2306-2312, mar. 2014.

CHAO, Y. *et al.* Synthesis and application of polyethylene glycol/vinyltriethoxy silane (peg/vtes) copolymers. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 59, p. 12754-12761, out. 2011.

CHARLAGORLA, P. *et al.* Loss of plasma membrane integrity, complement response and formation of reactive oxygen species during early myocardial ischemia/reperfusion. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 507-512, dez. 2013.

CHEN, J. *et al.* Using the singlet oxygen scavenging property of carotenoid in photodynamic molecular beacons to minimize photodamage to non-targeted cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**. v. 12, n. 6, p. 1311-1317, ago. 2007.

CHOUDHURY, H. *et al.* Improvement of cellular uptake, in vitro antitumor activity and sustained release profile with increased bioavailability from a nanoemulsion platform. **International Journal of Pharmaceutics**, v.460, n. 1-2, p. 131-143, jan. 2014.

COHN, I. *et al.* New intravenous fat emulsion. **The Journal of the American Medical Association**, v. 183, n. 9, p. 755-757, mar. 1963.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and fatty acids presente in oils extracted from palm fruits. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 309-320, jul. 2013.

CONN, P. F.; SCHALCH, W.; TRUSCOTT, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 11, n. 1, p. 41-47, out. 1991.

COSTA, P. A. *et al.* Phytosterol and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603-1606, jul. 2010.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G.. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1, p. 49-72, 2002.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF CALIFORNIA. **Manual: zetasizer nano user manual.** Disponível em: <<http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/malvern%20zetasizer%20zs%20dls%20user%20manual.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

DESHPANDE, D.; JANERO, D. R.; AMIJI, M. Engineering of an ω -3 polyunsaturated fatty acid-containing nanoemulsion system for combination c6-ceramide and 17 β -estradiol delivery and bioactivity in human vascular endothelial and smooth muscle cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 7, p. 885-894, out. 2013.

EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J.. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Ronald k. emaus, ron grunwald, john j. lemasters**, v. 850, n. 3, p. 436-448, jul. 1986.

ENDRESS, B. A.; HORN, C. M.; GILMORE, M. P. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. **Forest Ecology and Management**, v. 302, p. 346-353, ago. 2013.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Natures Reviews: Cancer**, v. 5, p. 161-171, mar. 2005.

FERREIRA, L. M. *et al.* Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: selective antiglioma formulation for intravenous administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 272-277, jun. 2015.

FOFARIA, N. M. *et al.* Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine— Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, n. 12, p. 1, fev. 2016.

FRAGA, M. *et al.* Pegylated cationic nanoemulsions can efficiently bind and transfect pidua in a mucopolysaccharidosis type i murine model. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 37-46, jul. 2015.

FUENTES, E. *et al.* *Mauritia flexuosa* presents *in vitro* and *in vivo* antiplatelet and antithrombotic activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-11, nov. 2013.

GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 928-939, mar. 2009.

GANTA, S. *et al.* EGFR Targeted Theranostic Nanoemulsion for Image-Guided Ovarian Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 8, p. 2753-2763, mar. 2015.

GARCIA-MARTIN, M. L. *et al.* High resolution pho imaging of rat glioma using ph-dependent relaxivity. **Magnetic Resonance in Medicine**, v.55, n. 2, p. 309-315, jan. 2006.

GEWEFEL, H.; SALHIA, B. Cancer in Adolescent and Young Adult Women. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 6, p. 390-395, jun. 2014.

GIANELLA, A. *et al.* Multifunctional Nanoemulsion Platform for Imaging Guided Therapy Evaluated in Experimental Cancer. **ACS Nano**, v. 5, n. 6, p. 4422-4433, mai. 2011. GIANELLA *et al.*, 2011.

GILMORE, M. P.; ENDRESS, B. A.; HORN, C. M. The social-cultural importance of *Mauritia flexuosa* palm swamps (aguajales) and implications for multi-use management in two Maijuna communities of the Peruvian Amazon. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 29, p. 1-23, abr. 2013.

GONÇALVES, R. G. *et al.* Arthropods Associated with the Crown of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) Palm Trees in Three Different Environments from Brazilian Cerrado. **Ecology, Behavior and Bionomics**, v. 35, n. 3, p. 302-312, mai. 2006.

GOYCOOLEA, F. M.; MILKOVA, V. Electrokinetic behavior of chitosan adsorbed on o/w nanoemulsion droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, p. 1-7, jun. 2016.

GUÉ, E. *et al.* Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, n. 1-2 p. 49-65, fev. 2016.

GURGEL-GONÇALVES, R. *et al.* Arthropods Associated with the Crown of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) Palm Trees in Three Different Environments from Brazilian Cerrado. **Neotropical Entomology**, v. 3, n. 3, jun. 2006.

HAGIGIT, T. *et al.* Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards vegf kdr receptors to the eye. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 297-305, ago. 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, p. 185-186, 1990.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer, The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, fev. 2011.

HARRIS, T. J.; MALTZAHN, G.; BHATIA, S. N. Multifunctional Nanoparticles for Cancer Therapy. In: Taylor & Francis Group. **Nanotechnology for Cancer Therapy**, 2007. p. 59-75.

HOBBS, S. K. *et al.*, Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, fev. 1998.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, abr. 2013.

HUANG, T. *et al.* Curcuminoids suppress the growth and induce apoptosis through caspase-3-dependent pathways in glioblastoma multiforme (gbm) 8401 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10639-10645, out. 2010.

ICHIHASHI, M. *et al.* UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, n.1-2, p. 21-39, jul 2003.

INCA. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 01 mar. 2017a.

INCA. **Tipos de câncer.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 01 mar. 2017b.

INCA. **Síntese de resultados e comentários.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 05 jan. 2017c.

INCA. **Síntese de resultados e comentários.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em: 26 jan. 2017d.

JANG, S. H. *et al.* Drug delivery and transport to solid tumors. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9, p. 1337-1350, set. 2003.

JAVID, A. *et al.* Biocompatible aptes–peg modified magnetite nanoparticles: effective carriers of antineoplastic agents to ovarian cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 36-54, mar. 2014.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, v. 293, n. 1, p. 73-81, jul. 2010.

KARGAR, M.; SPYROPOULOS, F.; NORTON, I. T. The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 357, n. 2, p. 527-533, mai. 2011.

KEY, J; LEARY, J. F. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 711-726, jan. 2014.

KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 284, n. 1-2, p. 109-122, out. 2004.

KITAGAWA, F. *et al.* One-step preparation of amino-peg modified poly(methyl methacrylate) microchips for electrophoretic separation of biomolecules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 535, n. 59, p. 1272-1277, ago. 2010.

KOOLEN, H. H. F. *et al.* Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 467-473, mai. 2013a.

KOOLEN, H. H. *et al.* Mauritic acid: a new dammarane triterpene from the roots of *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 22, p. 2118-2125, mai. 2013b.

KOOPMAN, G. *et al.* Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. **Blood Journal**, v. 84, n. 5, p. 1415-1420, set. 1994.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.T. de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, jan. 2009.

LEARY, J. F. Nanotechnology: what is it and why is small so big?. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 45, n. 5, p. 449-456, out. 2010.

LEWIS, S. *et al.* Living Well? Strategies Used by Women Living with Metastatic Breast Cancer. **Qualitative Health Research**, v. 26, n. 9, p. 1167-1179, jul. 2016.

LOBBEZOO, D. J. A. *et al.* Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer?. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 9, p. 1445–1451, abr. 2015.

LUK, B. T.; FANG, R. H.; ZHANG, L. Lipid – and Polymer – Based Nanostructures for Cancer Theranostics. **Theranostics**, v. 12, n. 2, p. 1117-1126, dez. 2012.

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) in apoptosis; an update. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 8, n. 2, p. 115-128, mar. 2003.

MANSOORI, G. A. *et al.* Nanotechnology in cancer prevention, detection and treatment: bright future lies ahead. **World Review of Science, Technology and Sustainable Development**, v. 4, n. 2-3, p. 226-257, 2007.

MAKLUF, A. S. D.; DIAS, R. C.; BARRA, A. A. Quality of life assessment in women with breast cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 49-58, ago. 2005.

MARTINI, M. *et al.* Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 280-286, mar. 2008.

MARTINS, R. C.; TARCISO S. F.; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Ethnobotany of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) in a Maroon Community in Central Brazil. **Economic Botany**, v. 66, n. 1, p. 91-98, mar. 2012.

MASSON, D. S. et al. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of o/w emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 463-468, 2005.

MCLACHLAN, G. *et al.* Evaluation *in vitro* and *in vivo* of cationic liposome-expression construct complexes for cystic fibrosis gene therapy. **Gene Therapy**, v. 2, p. 614-622, 1995.

MEDEIROS, K. A.; JOANITTI, G. A.; SILVA, L. P. Chitosan nanoparticles for dermaseptin peptide delivery toward tumor cells *in vitro*. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n. 3, p. 323-331, 2014.

MERZLYAK, M. N. *et al.* Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 349–359, fev. 2008

MENDONÇA, G. A. S.; SILVA, A. M.; CAULA, W. M. Tumor characteristics and five-year survival in breast cancer patients at the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1232-1239, set 2004.

MESQUITA, M. L. de *et al.* cytotoxic activity of brazilian cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

MINKO, T.; RODRIGUEZ, L. R.; POZHAROV, V. Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1880-1895, nov. 2013.

MORITA, A. *et al.* Ultraviolet A radiation-induced apoptosis. **Methods in Enzymology**, v. 319, p. 302–309, 2000.

MUNDO DOS ÓLEOS. **Óleo de coco de buriti**. Disponível em: <<http://www.mundodosoleos.com/oleo-de-coco-buriti>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

NATURE. **‘Plenty Room Revisited’**. Disponível em: <<http://www.nature.com/nnano/journal/v4/n12/full/nnano.2009.356.html>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

NAYAK, D. *et al.* Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid a431 carcinoma. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 457, n.11, p. 329-338, nov. 2015.

OLIVEIRA, D. *et al.* Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n. 4, p. 614-620, jul. 2013.

OMBREDANE, A. S. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de Curcuma longa L. associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral in vitro em câncer de pele não melanoma (linhagem A431)**. Brasília. 2016. 163 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

ONCOGUIA. **Formas de administração da quimioterapia**, 2012. Disponível em:

<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/formas-de-administracao-da-quimioterapia-/243/107>>.

Acesso em: 16 de dezembro de 2016.

PAYET, L; TARENTJEV, E. M. Emulsification and Stabilization Mechanisms of O/W Emulsions in the Presence of Chitosan. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12247-12252, nov. 2008.

PIGNATELLO, R. *et al.* Evaluation of new amphiphilic peg derivatives for preparing stealth lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 434, p. 136-144, out. 2013.

PORTEOUS, D. J. *et al.* Evidence for safety and efficacy of dotap cationic liposome mediated cftr gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. **Gene Therapy**, v. 4, n. 3, p. 210-218, mar. 1997.

QIU, L. *et al.* A Cell-Targeted, Size-Photocontrollable, Nuclear-Uptake Nanodrug Delivery System for Drug-Resistant Cancer Therapy. **Nano Letters**, v. 15, n. 1, p. 457-463, dez. 2014.

RAGELLE, H. *et al.* Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 452-459, mai. 2012.

RIBEIRO, J. C. **Avaliação do potencial mutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* MART) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) in vivo**. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

ROCHA, C. O. *et al.* **Efeitos de óleos de frutos nativos do Cerrado, na forma livre ou nanoestruturada, em células de câncer de mama, in vitro.** In: 20º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 11º Congresso de Iniciação Científica do DF, 04 a 06 de novembro de 2014.

RODRIGUES, A. M. C. *et al.* Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 2000-2004, 2010.

RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; POZO-RODRÍGUEZ, A. del; SOLINÍS, M. A. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying rna in lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1833-1843, 2014.

ROSA, G.; CARAGLIA, M.; SALMASO, S.; ELBAYOUMI, T. Nanotechnologies in Cancer. **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, p. 1-3, abr. 2013.

ROSSI, F. S. *et al.* Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p. 631-639, dez. 2014.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009. 917 p.

SAKULKU, U. *et al.* Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1, p. 105-111, mai. 2009.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 231-243, abr. 2014.

SANTIS, C. E. *et al.* Cancer Treatment and Survivorship Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 4, p. 252-271, jun. 2014.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, dez. 1995.

SILVA, L.R. **Investigação e avaliação de mecanismos de ação de nanoemulsões à base de óleo de pequi em células de câncer de mama, in vitro.** 2016. 61 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SIMÕES, C. M. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1102 p.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, v. 46, n. 2, p. 14-18, set. 1997.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 26–30, set. 2007.

STAN, D.; LOPRINZI, C. L.; RUDDY, K. J. Breast Cancer Survivorship Issues. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 805-827, ago. 2013.

TATAR, A. *et al.* Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 123-138, set. 2016.

SUGUMAR, S. *et al.* Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against staphylococcus aureus and wound healing activity in wistar rats. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1044-1049, mai. 2014.

TERENCE, NG.; CHAN, M.; KHOR, C. C.; HO, H. K.; CHAN, A. The genetic variants underlying breast cancer treatment-induced chronic and late toxicities: a systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 10, p. 1199-1214, out 2014.

THAKUR, A. *et al.* Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **Pharmacophore**, v. 4, n. 1, p. 15-25, 2013.

THE UNIVERSITY OF NOTTINGHAM. **What is pharmaceutical nanoemulsion**. Disponível em: <<http://blogs.nottingham.ac.uk/malaysiaknowledgetransfer/2013/06/25/what-is-pharmaceutical-nanoemulsion/>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

TICHY, J. R.; LIM, E.; ANDERS, C. K. Breast cancer in adolescents and young adults: a review with a focus on biology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 11, n. 9, p. 1060-1069, set 2013.

VENKATESHAM, M. *et al.* A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. **Applied Nanoscience**, v. 4, n. 1, p. 113-119, jan. 2012.

VIDEIRA, M.; REIS, R. L.; BRITO, M. A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 2, p. 312-325, jul. 2014.

VILLALOBOS, M. P. **Guilda de frugívoros associada com o buriti (*Mauritia flexuosa*: *Palmae*) numa “vereda” no Brasil Central**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Media centre**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

ZANATTA, C. F. *et al.* Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2776-2781, mai. 2008.

ZANATTA, C. F. *et al.* Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on eratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 70-75, jan 2010.

ZHANG, L. *et al.* Self-Assembled Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. **ACS Nano**, v. 2, n. 8, p. 1696-1702, ago. 2008.

ZHANG, Z. *et al.* A self-assembled nanocarrier loading teniposide improves the oral delivery and drug concentration in tumor. *Journal of Controlled Release*, v. 166, n. 1, p. 30-37, fev. 2013