



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

EFEITOS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E ÁCIDO ANACÁRDICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

BRASÍLIA

2018

THAMARA RODRIGUES ALEXANDRE

EFEITOS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E ÁCIDO ANACÁRDICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra.
Graziella Anselmo Joanitti

BRASÍLIA

2018

THAMARA RODRIGUES ALEXANDRE

EFEITOS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E ÁCIDO ANACÁRDICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Aprovada em __/__/__

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
(Orientadora)

Profa. Dra. Luzirlane Barbosa Braun
(Membro Titular)

Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo
(Membro Titular)

Prof. Dr. Sacha Braun Chaves
(Suplente)

Dedico este trabalho a minha irmã e minha mãe, que em todos os momentos estiveram ao meu lado me apoiando e me nutrindo de palavras de fé para seguir nesta caminhada. Ao meu pai, pois seus esforços me trouxeram até aqui. E ao meu padrasto e meu avô, que sempre foram grandes exemplos. Obrigada, eu amo vocês.

Agradecimentos

A Deus, antes de tudo, pela vida maravilhosa que me proporciona.

A minha família, pelo amor incondicional, pela força e pelo exemplo.

Aos meus amigos que me incentivaram em todos os momentos, principalmente minha grande amiga Nayara Vieira da Silva, seu apoio foi de fundamental importância para que eu seguisse esta caminhada.

Aos meus colegas no laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia, pela troca de experiências.

Agradeço também à minha querida Dona Zélia, por sua ética profissional e sua alegria.

Agradeço a Profa. Dra. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão, por sua disponibilidade e auxílio na realização de alguns ensaios.

Ao responsável pelo Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB, Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a todos os professores, pelo ensinamento e apoio durante esse processo de aprendizado.

Aos meus amigos do grupo da professora Graziella, pela convivência e amizade sincera.

Agradecimento especial a minha amiga Alicia Simalie Ombredane, que desde o início me concedeu todo suporte, compreensão e disponibilidade integral; ao meu colega Henrique Loback Lopes de Araújo, por mostrar o caminho da área de pesquisa; minha querida amiga Maria de Sousa Brito, por sua presença todos os dias com uma palavra amiga e auxílio prestado em todos os momentos; a minha amiga Khellida Loiane Vieira Ramos, por suas palavras reconfortantes e cheias de fé; ao meu amigo Victor Sousa Araújo por sua grande amizade, disponibilidade

e competência; minha colega Marina Sampaio, por sua acessibilidade; meu amigo Nichollas Serafim, por seu domínio técnico e teórico, além de sua competência para realização de alguns ensaios.

Agradeço de forma mais que especial a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti, que desde o início acreditou em meu trabalho, me dando força em momentos de desânimo e sempre incentivando meu progresso, tanto em âmbito profissional quanto pessoal. Serei eternamente grata por tudo o que a senhora me proporcionou nestes dois anos de convivência, e também pela amizade que construímos neste período. A senhora com toda certeza foi meu grande exemplo nesta caminhada. Obrigada!

Às agências de fomento CAPES, CNPq, e FAP-DF, pelo suporte financeiro que permitiu a realização desse trabalho

*“The mind, once expanded to the dimensions
of larger ideas, never returns to its original size.”*

Oliver Wendell Holmes, Sr.

RESUMO

A neoplasia que apresenta maior incidência entre as mulheres em âmbito mundial é o câncer de mama. O *Euterpe oleracea* Mart., conhecido popularmente como açaí, vem sendo muito estudado nos últimos anos, devido sua elevada quantidade de polifenóis, que apresentam atividades antiproliferativa, pró-apoptótica, supressão tumoral e prevenção a adipogênese, estresse oxidativo e inflamação. O *Anacardium occidentale*, conhecido popularmente como caju, deriva de sua castanha um líquido escuro com característica viscosa denominada LCC, nele se encontra um composto chamado de ácido anacárdico (AA), no qual tem sido utilizado em diversas pesquisas, devido suas atividades antitumorais, antioxidante, moluscicida, antimicrobianas, gastroprotetoras e antioxidantes. A biodiversidade brasileira apresenta uma grande variedade de fitoquímicos, que como estes, são pouco solúveis em soluções aquosas, o que apresenta complicações para sua administração e também a absorção pelo organismo. Tendo em vista este quadro, a utilização de compostos nanoestruturados demonstra ser uma alternativa promissora para contornar estas variáveis e potencializar os efeitos biológicos. Perante o exposto, o objetivo deste presente projeto foi avaliar os efeitos terapêuticos do tratamento associado com nanoemulsões à base de óleo de açaí (AçNE) e ácido anacárdico livre em células de câncer de mama com potencial metastático (4T1), *in vitro*. Testes de estabilidade avaliaram que as nanogotículas presentes nas nanoemulsões à base de óleo de açaí (AçNE) possuem diâmetro hidrodinâmico de ± 170 nm, com índice de polidispersão de 0,220, potencial de superfície de $\pm 17,5$ mV, pH 7, e estabilidade de suas propriedades físico-químicas por 120 dias. Para realização dos experimentos, foram empregadas AçNE à base de óleo de açaí e também foram utilizadas as AçNE com alteração em sua superfície, sendo adicionado polímeros de quitosana (CH) ou polietileno glicol (PEG). Estas nanoformulações apresentaram efeito citotóxico na linhagem de adenocarcinoma murino 4T1. No entanto, a nanoformulação com PEG, independentemente da associação a nanoformulação com AçNE, mostrou citotoxicidade, sendo desconsiderada para ensaios subsequentes. As nanoemulsões de AçNE e AçNE com CH apresentaram similaridade na redução de viabilidade celular em ensaios com a adição de AA, não demonstrando efeito combinatório. No entanto, o efeito combinatório foi observado no emprego do tratamento seriado (intervalo de 24 horas para cada tratamento). Apesar da AçNE e AçNE CH ainda apresentarem efeitos similares, a AçNE foi escolhida devido ao custo mais vantajoso e ao protocolo de formulação mais simples. Dados adquiridos na citometria de fluxo sugeriram a morte celular por apoptose no tratamento seriado com AçNE e AA. Resultados analisados no ensaio de *wound healing* (migração celular) mostraram o efeito inibitório e combinatório da AçNE e AA. Desta forma, o presente estudo sugere que o efeito combinatório entre nanoemulsão à base de óleo de açaí e AA possa ser uma alternativa para futuras terapêuticas antineoplásicas a serem melhor fundamentadas em estudos futuros.

Palavras-chave: Nanoemulsões, *Euterpe oleracea* Mart, *Anacardium occidentale*, câncer de mama, ácido anacárdico.

ABSTRACT

The neoplasia with the highest incidence among women worldwide is breast cancer. *Euterpe oleracea* Mart., Commonly known as açai, has been extensively studied in recent years due to its high polyphenols, which have antiproliferative, pro-apoptotic, tumor suppression and adipogenesis, oxidative stress and inflammation activities. *Anacardium occidentale*, commonly known as cashew, derives from its chestnut a dark liquid with a viscous characteristic called LCC, in it is a compound called anacardic acid (AA), in which it has been used in several researches due to its antitumor activities, antioxidant, molluscicide, antimicrobials, gastroprotectives and antioxidants. The Brazilian biodiversity presents a great variety of phytochemicals, which like these, are little soluble in aqueous solutions, which presents complications for its administration and also the absorption by the organism. In view of this, the use of nanostructured compounds proves to be a promising alternative to circumvent these variables and potentiate the biological effects. In view of the above, the objective of this present project was to evaluate the therapeutic effects of the treatment associated with açai oil-based nanoemulsions (AçNE) and free anacardic acid in breast cancer cells with metastatic potential (4T1) in vitro. Stability tests evaluated that the nanoglobes present in açai oil-based nanoemulsions (AçNE) have a hydrodynamic diameter of ± 170 nm, with polydispersion index of 0.220, surface potential of ± 17.5 mV, pH 7, and stability of its physical-chemical properties for 120 days. To perform the experiments, AçNE based on açai oil was used and the AçNE with change in its surface were also used, being polymers of chitosan (CH) or polyethylene glycol (PEG). These nanoformulations had a cytotoxic effect on the murine adenocarcinoma 4T1 lineage. However, PEG nanoformulation, regardless of the association to nanoforming with AçNE, showed cytotoxicity and was disregarded for subsequent assays. The nanoemulsions of AçNE and AçNE with CH presented similarity in the reduction of cell viability in tests with the addition of AA, showing no combinatorial effect. However, the combinatorial effect was observed in the use of serial treatment (24-hour interval for each treatment). Although AçNE and AçNE CH still have similar effects, AçNE was chosen because of the more cost-effective and simpler formulation protocol. Data acquired in flow cytometry suggested cell death by apoptosis in serial treatment with AçNE and AA. Results analyzed in the wound healing assay showed the inhibitory and combinatorial effect of AçNE and AA. Thus, the present study suggests that the combinatorial effect between açai oil-based nanoemulsion and AA may be an alternative for future antineoplastic therapies to be better informed in future studies.

Key words: Nanoemulsions, *Euterpe oleracea* Mart, *Anacardium occidentale*, breast cancer, anacardic acid.

Lista de figuras

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2018.....	8
FIGURA 2. ETAPAS DA CARCINOGENESE. FASES DE INICIAÇÃO, PROMOÇÃO E PROGRESSÃO	9
FIGURA 3. CARACTERÍSTICAS ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS AO LONGO DA CARCINOGENESE.	10
FIGURA 4. SINTOMATOLOGIA DA MAMA	12
FIGURA 5. CONJUNTO DE IMAGENS REPRESENTATIVAS DO AÇAÍ.....	18
FIGURA 6. IMAGENS DOS FRUTOS QUE ORIGINAM O AÇAÍ.....	19
FIGURA 7. ALGUMAS DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS ANTOCIANINAS E FLAVONOIDES ENCONTRADOS NO EUTERPE OLEAREACA	21
FIGURA 8. PRODUTOS ORIGINADOS DO CAJUEIRO	24
FIGURA 9. CASTANHA DE CAJU (FRUTO VERDADEIRO).....	25
FIGURA 10. ESTRUTURAS MOLECULARES.....	26
FIGURA 11. ESCALA NANOMÉTRICA.....	29
FIGURA 12. DESENHO ESQUEMÁTICO DO EFEITO EPR EM TECIDO NORMAL E TECIDO TUMORAL	31
FIGURA 13. EXEMPLOS DE TIPOS DE NANOCARREADORES	32
FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MOLÉCULA DE TENSOATIVO.....	34
FIGURA 15. DESENHO ESQUEMÁTICO DOS DOIS SISTEMAS DE NANOEMULSÃO	35
FIGURA 16. DESENHO ESQUEMÁTICO DE INSTABILIDADE QUÍMICA NAS EMULSÕES.....	36
FIGURA 17. DESENHO ESQUEMÁTICO PARA FORMULAÇÃO DE NANOEMULSÃO	38
FIGURA 18. ESQUEMA DO DESENHO EXPERIMENTAL	42
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ.....	44
FIGURA 20. GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE O DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, LINHA CONTINUA, E DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO, LINHA DESCONTINUA, DA FORMULAÇÃO	65
FIGURA 21. GRÁFICO COMPARATIVO DO POTENCIAL ZETA DA FORMULAÇÃO.....	67
FIGURA 22. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA SUPERFICIAL DAS NANOPARTÍCULAS.	69
FIGURA 23. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (90 µG/ML, 180 µG/ML, 360 µG/ML).....	70
FIGURA 24. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (3,125 µM, 6,25 µM, 12,5µM, 25 µM, 50 µM, E 100 µM) DE ÁCIDO ANACÁRDICO (AA).....	74

FIGURA 25. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1) SUBMETIDAS A CONCENTRAÇÃO 360 µG/ML DE AÇNE	76
FIGURA 26. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1) SUBMETIDAS A CONCENTRAÇÃO 180 µG/ML DE AÇNE	79
FIGURA 27. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT) SERIADO EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1) SUBMETIDAS A CONCENTRAÇÃO DE 180 µG/ML AÇNE + AA. AÇNE	82
FIGURA 28. DOT PLOT DE MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1).	87
FIGURA 29. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE TAMANHO FSC.....	88
FIGURA 30. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE TAMANHO SSC-H.....	89
FIGURA 31. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$ M).....	90
FIGURA 32. DOT PLOT DOS AJUSTES DOS PARÂMETROS PARA A DETECÇÃO DOS MARCADORES.....	93
FIGURA 33. DOT PLOT DE MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1).....	94
FIGURA 34. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA DE CÉLULAS DA LINHAGEM DE ADECARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1).....	95
FIGURA 35. AVALIAÇÃO POR AZUL DE TRIPAN DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS.....	97
FIGURA 36. PORCENTAGEM DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO MURINO (4T1).....	98
FIGURA 37. FOTOMICROGRAFIAS DE ENSAIO DE MIGRAÇÃO 180µG/ML CTL/ BR/ AÇNE	99
FIGURA 38. ENSAIO DE MIGRAÇÃO SERIADO 180µG/ML CTL/ BR/AÇNE	100
FIGURA 39. FOTOMICROGRAFIAS DE ENSAIO DE MIGRAÇÃO 180µG/ML AA E AÇNE + AA	101
FIGURA 40. ENSAIO DE MIGRAÇÃO SERIADO 180µG/ML, AA E AÇNE + AA.....	103

Lista de tabelas

TABELA 1. ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2018 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100 MIL HABITANTES E DE NÚMERO DE CASOS NOVOS POR CÂNCER, SEGUNDO SEXO E LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA.....	7
TABELA 2.. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE AÇAÍ EXTRAÍDO DE FORMA ENZIMÁTICA A PARTIR DA POLPA DO FRUTO.	20
TABELA 3. GRUPOS DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	51
TABELA 4. ANÁLISE DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO, IPD, CARGA DE SUPERFÍCIE E PH'S DE NANOGOTÍCULAS NAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ.....	62
ANEXO 1. PERCENTUAL DE DIFERENÇA DURANTE OS TRÊS DIAS DE ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i>	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
ANEXO 2. PERCENTUAL DE DIFERENÇA DURANTE OS TRÊS DIAS DE ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i>	124

Lista de abreviaturas e siglas

- 4T1** - Linhagem celular adenocarcinoma mamário murino
- PMM** - Potencial de membrana mitocondrial
- AA** – Ácido anacárdico (ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico)
- AçNE** – Nanoemulsão com base de óleo de açaí
- AçNE CH** – Nanoemulsões com base de óleo de açaí com CH
- AçNE PEG** – Nanoemulsões com base de óleo de açaí com PEG
- ANOVA** – Análise de variância
- CH** - Polímeros de quitosana
- DH** – Diâmetro hidrodinâmico
- DLS** – Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)
- DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- PBS** - Tampão fosfato-salino
- DNA** - Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
- EPR** – Efeito de permeabilidade e retenção
- FACS** – Citometria de fluxo
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogênio
- INCA** – Instituto Nacional de Câncer
- LCCC** – Líquido da casca da castanha de caju
- MET** – Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV** – Microscopia eletônica de varredura
- MTT** - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- NE** – Nanoemulsão
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- IPD** - Índice de polidispersão
- PEG** – Polietilenoglicol
- PI** – Iodeto de propídeo
- T.A.** – Temperatura ambiente
- UnB** – Universidade de Brasília

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. CÂNCER	4
1.1 Aspectos gerais e etiologia.....	4
1.2 Câncer: epidemiologia.....	5
1.3 Câncer no Brasil.....	6
1.4 Carcinogênese.....	8
2. CÂNCER DE MAMA	11
2.1 Neoplasia: estadiamento.....	12
2.2 Tratamento.....	13
3. TERAPIA COMBINATÓRIA	16
3.1 Óleo de açaí.....	17
3.2 Ácido anacárdico.....	23
4. NANOTECNOLOGIA	28
4.1 Conceito.....	28
4.2 Nanotecnologia e a liberação de fármacos.....	29
4.3 Nanoemulsão.....	32
5. JUSTIFICATIVA	39
6. OBJETIVOS	41
6.1 Objetivo geral.....	41
6.2 Objetivos específicos.....	41
7. MATERIAL E MÉTODOS	42
7.1 Desenho experimental.....	42
7.2 Formulação das nanoemulsões à base de óleo de açaí (AçNE).....	43
7.3 Caracterização das nanoemulsões.....	44
7.3.1 <i>Análise da estabilidade de nanoemulsões após período de armazenamento</i>	45
7.3.2 <i>Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga de superfície</i>	45
7.3.3 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	46
8. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	48
8.1 Linhagem celular 4T1.....	48
8.2 Manutenção das células.....	48
8.3 Tripsinização celular.....	48
8.4 Plaqueamento das células.....	49
8.5 Tratamentos.....	50
9. TESTES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS	52
9.1 Ensaio de determinação da viabilidade celular – MTT (BROMETO DE 3-(4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL-TETRAZOL).....	52
9.2 Citometria de fluxo.....	53
9.2.1 <i>Fragmentação de DNA e ciclo celular</i>	54
9.2.2 <i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	55

9.2.3	<i>Exposição de fosfatidilserina.....</i>	56
9.2.4	<i>Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular.....</i>	57
10.	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>.....	58
11.	TESTES ESTATÍSTICOS.....	60
12.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
12.1	Estabilidade das AçNE - Período de armazenamento.....	64
12.2	Análise da morfologia por microscopia eletrônica (MEV).....	68
13.	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	70
13.1	Determinação da viabilidade celular (MTT).....	70
13.1.1	<i>Tratamento com AçNE, AçNE CH e AçNE PEG em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1.....</i>	<i>70</i>
13.2	Tratamento com Ácido Anacárdico em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	73
13.3	Tratamento das nanoemulsões à base de óleo de açaí associado AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	75
13.4	Tratamento seriado das nanoemulsões à base de óleo de açaí e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	82
13.5	Citometria de fluxo (FACS) aplicada ao tratamento seriado com AçNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	86
13.6	Potencial de membrana mitocondrial aplicada ao tratamento seriado em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	90
13.7	Exposição a fosfatidilserina após tratamento seriado com AçNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	92
13.8	Avaliação do número total de células após tratamento seriado com AçNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	96
13.9	Avaliação da integridade de membrana após tratamento seriado em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1).....	97
13.10	Ensaio de migração celular.....	98
	CONCLUSÃO.....	105
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
	ANEXOS.....	122

INTRODUÇÃO

Em âmbito mundial, o câncer de mama apresenta maior frequência entre as mulheres, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Conforme dados estimados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018) para cada ano do biênio 2018-2019 estão previstos cerca de 600 mil novos casos de neoplasias. Somente no Brasil, as neoplasias nas mamas correspondem a 28% de novos casos a cada ano, ocupando o segundo lugar entre os tipos de câncer de maior incidência.

Os métodos mais adotados para o tratamento de neoplasias mamárias são: quimioterapia, cirurgias (retirada de pequenos tumores, mastectomia, ooforectomia e/ou dissecação dos linfonodos axilares), radioterapia, terapia hormonal e terapia-alvo (DAWOOD et al., 2011). No entanto, diversos são efeitos colaterais apresentados por pacientes durante ou pós-tratamento antitumoral, como por exemplo, perda de apetite, trombocitopenia, alopecia, neutropenia, entre outros. Juntamente a estas reações, outros desafios importantes são encontrados com relação à terapia antitumoral, como a baixa especificidade para células tumorais e a resistência aos quimioterápicos existentes (NIH, 2015; LOSCHIAVO et al., 2005).

Progressos nos estudos da tumorigênese direcionam ao entendimento de que o câncer não se define unicamente como um aglomerado de células tumorais em multiplicação, e sim, como um tecido complexo composto por tipos celulares diferenciados que realizam interações anômalas entre si e com o microambiente que o constitui (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Tendo em vista a complexidade deste cenário patológico, novas diretrizes vêm sendo estudadas para o desenvolvimento de terapêuticas que abarquem a

sistemática tumoral. Uma das alternativas encontradas seria aplicar um tratamento com a administração de diferentes medicamentos simultaneamente, uma vez que tal combinação pode resultar em ações sinérgicas entre eles melhorando a seletividade de vários alvos, além de contribuir na redução do avanço de resistência aos fármacos (MIGNANI et al., 2015; AL-LAZIKANI et al., 2012; HU et al., 2012). Para tanto, o emprego da nanobiotecnologia oferece uma possibilidade para a aplicação da terapia combinatória, com o aprimoramento na administração/carreamento específico de drogas para o tumor, uma vez que, as nanopartículas são capazes de transportar diversas moléculas funcionais simultaneamente e se acumulam preferencialmente em tecidos com vascularização defeituosa e drenagem linfática reduzida como ocorre nos tecidos tumorais (WANG et al., 2009; SRIRAMAN et al., 2014).

As nanopartículas empregadas para administração de fármacos em células tumorais podem ser produzidas a partir de diversos materiais (WANG et al., 2009). Para a aplicabilidade destes materiais, as nanoemulsões tem sido uma das plataformas mais promissoras de serem usadas como sistema de liberação de compostos bioativos por serem biocompatíveis e possibilitarem a dispersão de moléculas hidrofóbicas (em sua fase oleosa) na corrente sanguínea, facilitando assim sua biodistribuição e retenção tumoral (SILVAb et al., 2013). As nanoemulsões lipídicas são caracterizadas por uma combinação heterogênea composta de tensoativos e fases oleosa e aquosa. Os tensoativos são responsáveis por gerar estabilidade nas nanoemulsões, se posicionando entre as duas fases da emulsão, gerando uma película interfacial que consolida o sistema (BRUXEL et al., 2012; SILVAb et al., 2013).

De acordo com Costa-Lotufo et al (2010) cerca de 60% dos fármacos antineoplásicos utilizados atualmente foram descobertos a partir de produtos naturais e apesar da biodiversidade vegetal brasileira apresentar uma rica variedade de compostos fitoquímicos, estes não foram pesquisados de forma específica quanto a seus efeitos sinérgicos. Neste presente trabalho foi realizado um estudo utilizando-se nanoemulsões a base de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) associados ao ácido anacárdico (derivado do caju) com objetivo de avaliar os efeitos da combinação desses compostos na terapêutica do câncer, pois na literatura, os mesmos apresentaram atividade antitumoral quando utilizados isoladamente. Até o presente momento esta avaliação ainda não foi realizada em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 *in vitro*.

1.CÂNCER

1.1 Aspectos gerais e etiologia

O termo câncer é empregado para denominar o conjunto de mais de 100 patologias que possuem em comum a multiplicação celular desordenada (INCAa, 2018). Tumores denominados malignos apresentam caráter invasivo e metastático disseminando-se para outras áreas do corpo. Em contrapartida, o tumor benigno se caracteriza por uma massa celular localizada que se multiplica de forma lenta e possui semelhança com o tecido de origem (INCAa, 2018). O surgimento destes tumores advém de múltiplos fatores de riscos, que são classificados como modificáveis e não modificáveis. O primeiro inclui o uso de tabaco, o sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros. E o segundo, inclui-se idade, gênero e hereditariedade (BRASIL, 2012). Estes fatores podem atuar de forma conjunta ou sequenciada, definindo o câncer como uma patologia multifatorial.

Em âmbito geral, entende-se que, os diversos tipos de neoplasias apresentam fatores intrínsecos e extrínsecos à célula tumoral. Fator intrínseco se refere a sua promoção a mecanismos de defesa contra fatores que impeçam sua proliferação, auto renovação, multiplicação autônoma, escape a apoptose e ao sistema imunológico, além do desequilíbrio no genoma e variação no metabolismo adaptativo. Em contrapartida, fator extrínseco às células tumorais é responsável por provocar constantemente a formação de novos vasos sanguíneos – angiogênese - restauração tecidual, emigração do sistema imunológico específico antitumoral, transmissão de informações direcionadas à resposta inflamatória - resposta imune inata – assim como, restauração dos tecidos e incorporação celular

desse conjunto de fatores à invasão tecidual e metástase (revisado por CHAMMAS, 2013; MONGE-FUENTES, 2014).

Esta patologia é responsável pelos principais fatores de óbito em âmbito mundial e sua incidência apresenta-se em ordem crescente devido à acessão e senescência da população em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (TORRE et al, 2012). Somado a estas causas, a progressão industrial e as transferências de larga escala do homem do campo para a urbanização, concomitantemente ao aumento da exposição do indivíduo à componentes de alto potencial mutagênico e carcinogênico – físicos (ex: radiação ultravioleta e ionizante), químicos (ex: tabaco e arsênico) ou biológicos (ex: vírus ou bactérias) – esclarecem a ocorrência elevada de câncer em todo mundo (revisado por CHAMMAS, 2013; MONGE-FUENTES, 2014).

1.2 Câncer: epidemiologia

Conforme as últimas estimativas mundiais apresentadas pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), a neoplasia se tornou um problema de saúde pública a nível mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, no qual se esperam nos próximos 10 anos a incidência de 80% dos mais de 20 milhões de novos casos previstos para 2025. Esta estimativa produzida no ano de 2012 evidenciou uma incidência de 14.1 milhões de novos casos de câncer, sendo responsável por 8.2 milhões de mortes no mundo (IARC, 2018).

O estudo realizado pela IARC ainda demonstrou que, excluindo o câncer de pele não melanoma, as neoplasias de maiores incidências ocorreram nos pulmões com 1.8 milhões de novos casos, mama com 1.7 milhões de novos casos e próstata com 1.1 milhões de novos casos. Sendo que, as neoplasias que mais afetaram o sexo masculino percentualmente foram: pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%) e no sexo feminino: mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (IARC, 2018).

1.3 Câncer no Brasil

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCAb, 2018) nos anos de 2018 e 2019 estão previstos cerca de 600 mil novos casos de neoplasias. Salvo o câncer de pele não melanoma - 180 mil novos casos – se estima 420 mil novos casos câncer. Este quadro epidemiológico coincide com os do Caribe e América Latina, visto que, os valores estimados para os mesmos são: câncer de próstata com 61 mil novos casos e câncer de mama com 58 mil novos casos. Segundo estas estimativas, o câncer de pele não melanoma se torna o mais frequente no Brasil (INCAc, 2018). Em seguida as neoplasias de próstata (68.220 mil), mama feminina (59.700 mil), cólon e reto (36.360 mil), pulmão (28 mil), estômago (21.290 mil) e colo do útero (16.370 mil), colo do útero (16.370 mil), cavidade oral (14.700 mil), sistema nervoso central (11.320 mil), leucemias (10.800 mil) e esôfago (10.970 mil) (Tabela 1).

Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, as principais neoplasias que acometerão os homens serão de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), cólon e reto (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%), e as mulheres serão de mama

(29,5%), cólon e reto (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e glândula tireoide (4,0%) (Figura 1). (INCAc, 2018).

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

Fonte: Estimativa Câncer, 2018. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Adaptado de <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 15 fev. 2018

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA). Adaptado de <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 15 Fev. 2018.

1.4 Carcinogênese

A carcinogênese (formação do câncer) ocorre por uma sequência de estágios (INCA, 2018). O primeiro deles é denominado iniciação do tumor. Nesta etapa, as células saudáveis que foram expostas há agentes cancerígenos (químicos, físicos e/ou biológicos) são modificadas geneticamente (HANAHA; WEINBERG, 2011; OLIVEIRA et al, 2007). Tais células que sofreram esta modificação podem conservar-se em estado de latência por anos e permanecerem estagnadas neste estágio em virtude do controle de proliferação celular. Apesar das células serem acometidas por estas alterações, ainda assim podem sobreviver com a função que anteriormente desempenhavam e com o mesmo fenótipo, sendo classificada desta forma como tecido hiperplásico (HANAHA; WEINBERG, 2011).

A segunda fase da carcinogênese é a promoção tumoral, neste estágio o tecido que outrora se denominava hiperplásico passa a ser chamado de tecido displásico (HANAHA; WEINBERG, 2011; OLIVEIRA et al, 2007). Esta etapa pode ser revertida e está relacionada à extensão do tempo de exposição ao agente

carcinogênico, ocasionando mutações na expressão gênica e no aumento anormal da multiplicação celular (OLIVEIRA et al, 2007). Conseqüentemente, o DNA celular que fora alterado é transferido para as próximas linhagens celulares, expandindo a massa tumoral. Ainda que as células tenham sofrido modificações em suas funções e estrutura, essa massa tumoral continua sendo considerada benigna (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

E por fim, o último estágio da carcinogênese é denominado como progressão. As células que foram modificadas nas etapas anteriores se proliferam de maneira descontrolada e angariam a habilidade de adentrar a outros tecidos através da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e das vias linfáticas. Com esta etapa concluída, as células tumorais promovem a metástase, se alastrando para tecidos adjacentes ao de sua origem ou tecidos distantes a ele, originando a neoplasia maligna propriamente dita (OLIVEIRA et al, 2007) (Figura 2).

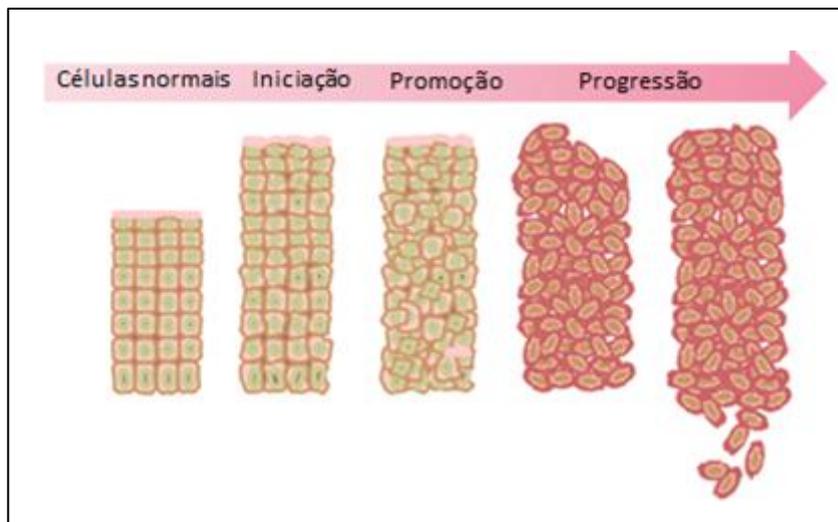


Figura 2. Etapas da carcinogênese. Fases de iniciação, promoção e progressão. Adaptado de <http://www.wikiwand.com/pt/V%C3%ADrus_do_papiloma_humano>. Acesso em: 17 Dez. 2017.

No decorrer dos estágios acima citados, o tecido tumoral passa a obter diversas características (Figura 3). No momento em que surge o desequilíbrio na supressão tumoral, as células adquirem a particularidade primordial de uma célula tumoral, a proliferação descontrolada, sendo assim, as células apresentam resistências aos sinais de morte celular e se proliferam de forma intérmina. Somado a este quadro, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) permite com que as células tumorais obtenham oxigênio e os nutrientes que necessitam para sua multiplicação e crescimento, possibilitando assim, a invasão a outros tecidos, levando a metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

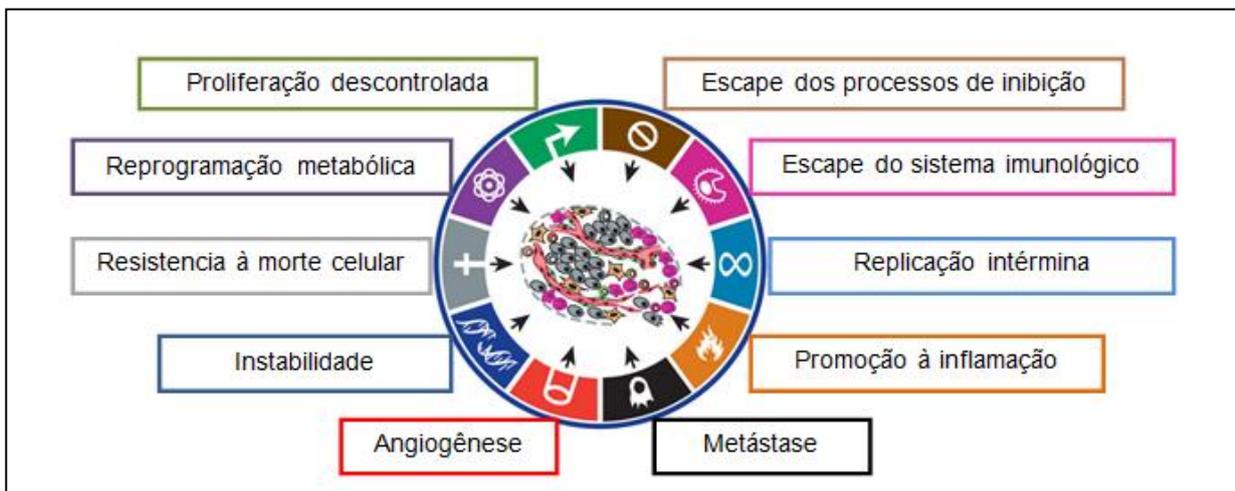


Figura 3. Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese. Adaptado de Hanahan; Weinberg (2011).

2. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (WHO, 2018). No Brasil, este tipo de câncer corresponde a 28% de novos casos a cada ano, se posicionando em segundo lugar entre os tipos de câncer de maior incidência. O câncer de mama em homens, embora ocorra raramente, corresponde a 1% do total de casos desta patologia (INCAe, 2018).

Para que ocorra a formação de neoplasia nas mamas, diversos aspectos devem ser levados em consideração como: fatores hormonais e reprodutivos – tempo de uso de contraceptivos orais, além de ter tido filhos ou não. Isto porque, estudos realizados sugerem que a amamentação está diretamente ligada à redução de riscos na formação de tumores nas mamas, bem como os hábitos saudáveis associados nesta etapa da vida da mulher (SILVAc et al, 2010; BERAL et al, 2002). Aliados a estes, a obesidade e/ou excesso de peso, o sedentarismo, o consumo de tabaco e/ou álcool e o emprego de terapias hormonais na menopausa (estrogênio combinado e progesterona) também são fatores de risco para o aparecimento desta patologia (TORRE et al, 2012; INCAf, 2018).

Em âmbito geral, a sintomatologia do câncer de mama se caracteriza pelo aparecimento de um nódulo indolor e consistente nas mamas e/ou axilas (este sinal pode ser percebido quando realizado o autoexame de toque nas mamas), inchaço parcial das mamas, retração cutânea, inversão do mamilo, edema cutâneo semelhante à casca de laranja, dor, hiperemia, ulceração do mamilo ou descamação; e secreção papilar (INCAg, 2018) (Figura 4).

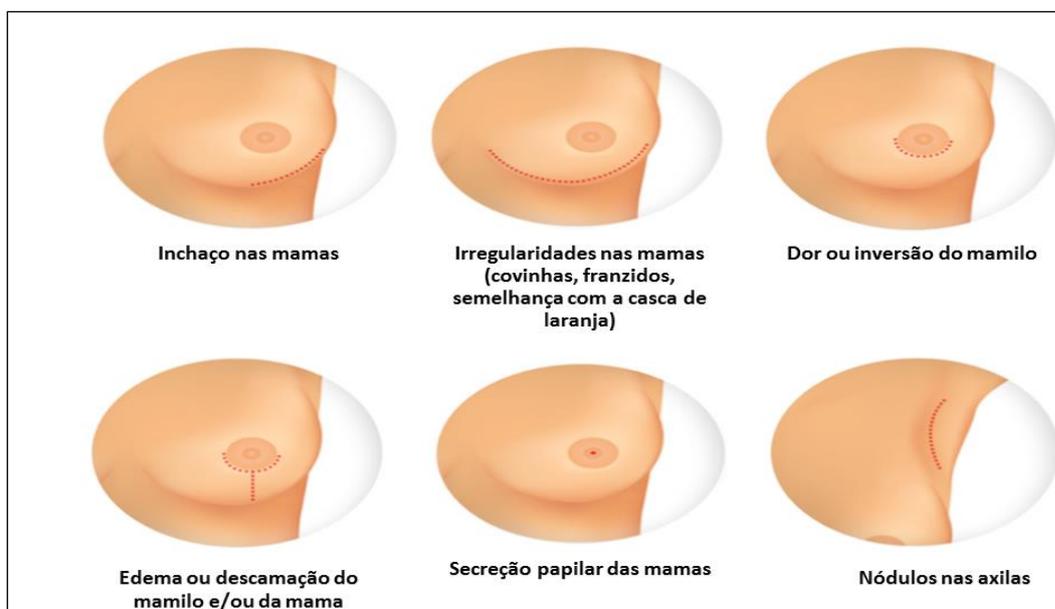


Figura 4. Sintomatologia da mama. Adaptado de <http://oncologicadobrasil.com.br/noticias/cancer-de-mama-sintomas-diagnostico/> Acessado em: 15 Fev. 2017.

2.1 Neoplasia: estadiamento

A avaliação do estadiamento do câncer é necessária para definir o grau de disseminação de uma ou mais neoplasias, sendo assim, analisa-se a taxa de crescimento tumoral, diagnóstico histopatológico (no caso de câncer de mama: carcinoma, adenocarcinoma e sarcoma), extensão, localização, duração dos sinais e sintomas, sexo/idade do paciente e metástases à distância (INCAh, 2018).

Segundo a International Union Against Cancer – UICC (União Internacional Contra o Câncer – UICC) o estadiamento cancerígeno melhor se elucida pelo Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema é empregado quanto à extensão anatômica da neoplasia, considerando as características do tumor primário (T), características dos linfonodos responsáveis pela drenagem linfática no órgão em que o tumor se encontra (N), e também o aparecimento ou não de metástase à distância (M). Utiliza-se a letra “X” para se referir à categoria

que não pôde ser apropriadamente avaliada. Tais denominações se tornam necessárias, para nivelar estes critérios graduais, geralmente estabelecidos como: T0 a T4; N0 a N3; e de M0 a M1, respectivamente. Posteriormente a avaliação destes critérios descritos, constitui-se estádios que se diversificam entre 0 a IV e se subclassificam como A, B e C para intitular o grau de desenvolvimento desta patologia. De acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estádios III e IV são considerados casos avançados da doença (SANTOS et al.,2005; UICC.,2009; MORAN et al, 2014).

2.2 Tratamento

O grande objetivo nos avanços para o tratamento do câncer de mama nos últimos anos, está relacionado a métodos que não exijam extrema extirpação das mamas e também, tratamentos individualizados. Nos dias de hoje, os tratamentos para o câncer de mama sofrem variação, pois dependem do estadiamento em que se encontram, características biológicas que apresentam, além de uma análise cautelosa das condições do paciente como, por exemplo, sua idade e encontrar-se em menopausa (INCAh, 2018). Desta forma, o estadiamento está diretamente ligado ao prognóstico do câncer de mama, uma vez que define as características do tumor. Os tumores quando diagnosticados em sua fase inicial, apresentam grande potencial de cura, em contrapartida, quando o tumor se encontra em grau de metástase, o potencial terapêutico é reduzido, e em alguns casos, o tratamento se baseia unicamente na melhora da qualidade de vida do paciente (INCAh, 2018).

Os tipos de tratamentos para o câncer de mama podem ser classificados de duas maneiras, sendo elas tratamento local, na qual se incluem a cirurgia (retirada

de pequenos tumores, mastectomia, ooforectomia e/ou dissecação dos linfonodos axilares) e radioterapia e; tratamento sistêmico no qual se baseia na hormonioterapia, quimioterapia e terapia-alvo (DAWOOD et al., 2011).

Em estadiamentos de nível I e II, o tratamento geralmente compreende na realização da cirurgia. Esta pode conter-se unicamente na retirada do tumor, sendo chamada também de cirurgia conservadora ou pode-se proceder com a retirada total da mama, método este, denominado mastectomia (GIULIANO et al, 2011). Importante salientar que, a análise dos linfonodos axilares apresenta suma importância para a decisão deste prognóstico. Posteriormente ao método cirúrgico, em alguns casos, torna-se necessário aplicar a radioterapia adjuvante (INCAh, 2018).

A utilização de tratamentos sistêmicos será definida de acordo com a dimensão do tumor, acometimento dos linfonodos e recorrência do câncer de mama, idade da paciente e também o grau de diferenciação do câncer. As características tumorais demonstram grande importância para a escolha do tratamento sistêmico, uma vez que, está relacionada e avaliação dos receptores hormonais como os de estrogênio (ER), progesterona (RP) e fator de crescimento epidérmico (HER-2), para possível aplicação da hormonioterapia e terapia-alvo (INCAh, 2018; WOLFF et al, 2013; HAMMOND et al, 2010).

No estadiamento III a massa tumoral apresenta maior volume, porém continua localizada. Neste contexto, o tratamento inicial geralmente se baseia na utilização da quimioterapia, ou seja, tratamento sistêmico; isto porque, espera-se a redução tumoral para posterior aplicação do tratamento local com a extração do tumor e posterior radioterapia adjuvante (INCAh, 2018; CORTAZAR et al, 2014).

E por fim, o estadiamento IV, que apresenta grau de metástase. O tratamento escolhido para esta etapa tumoral dependerá do quanto o câncer se disseminou, de sua característica anatômica e da idade da paciente, uma vez que, a terapêutica definida deverá abarcar o equilíbrio entre a resposta tumoral e a qualidade de vida da paciente, considerando a intensidade dos prováveis efeitos colaterais advindos do tratamento. Neste estadiamento, tendo avaliado todos os fatores para a escolha da terapia preferencialmente utiliza-se a quimioterapia, visto que, como câncer de mama metastático apresenta sintomas que interferem de forma significativa na qualidade de vida da paciente, a terapia sistêmica costuma demonstrar melhoras rápidas. A terapia local deve ser utilizada unicamente em indicações restritas (INCAh, 2018).

3. TERAPIA COMBINATÓRIA

São diversos os efeitos colaterais advindos de terapias antitumorais: perda de apetite, trombocitopenia, alopecia, neutropenia, entre outros. Importante ressaltar que junto a essas reações, desafios importantes são encontrados com relação à terapia antitumoral, como: baixa especificidade para células tumorais e resistência aos quimioterápicos existentes (NIH, 2015; LOSCHIAVO et al., 2005). Tendo em vista os desafios mencionados, a combinação de medicamentos para o tratamento de câncer se tornou uma alternativa, visto que, tal combinação pode resultar em ações sinérgicas entre eles melhorando a seletividade a diferentes alvos, além de dissuadir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. A técnica empregada baseia-se na utilização de baixas doses de agentes anticâncer em conjunto, visando alcançar distintos alvos celulares concomitantemente, aumentando as possibilidades de redução do tumor e restringindo a incidência de efeitos colaterais (MIGNANI et al., 2015; AL-LAZIKANI et al., 2012; HU et al., 2012).

Mesmo que a terapia combinatória apresente toxicidade caso algum dos fármacos utilizados for quimioterápico, ainda assim, a toxicidade será reduzida visto que diferentes caminhos serão redirecionados, desta forma, ocorrerão formas sinérgicas ou aditivas, necessitando de baixa dosagem medicamentosa comparada a utilização de monoterapia. Tendo em vista esta atividade sinérgica ou aditiva, é possível adquirir uma resposta mais integralizada, rápida ou apresentar ambas as efetividades, juntamente com terapêutica menos tóxica e com maior tolerância do organismo. Estas razões embasam o entendimento de que a terapia combinatória é capaz de aumentar os efeitos terapêuticos comparados às terapias convencionais e/ou aumentar significativamente o tempo da janela terapêutica (CATHER;

CROWLEY, 2014; O'COLLINS et al., 2012; MOKHTARI et al, 2017; YAP et al., 2013).

No entanto, os desafios dessa abordagem incluem definir os critérios de seleção dos medicamentos a serem utilizados em combinação, dosagem, desempenho dos mesmos quando administrados no organismo, biodistribuição, permeabilidade e transporte destes compostos através da membrana. Tais tópicos devem ser avaliados de forma cautelosa, uma vez que, se utilizados de forma inadequada podem gerar efeitos colaterais não desejados (MIGNANI et al., 2015; AL-LAZIKANI et al., 2012; HU et al., 2012).

3.1 Óleo de açaí

Nas duas últimas décadas ocorreram avanços significativos com relação ao uso de moléculas de origem natural, principalmente de microrganismos e plantas, em tratamentos oncológicos. Cerca de 60% dos fármacos antineoplásicos utilizados atualmente foram descobertos em produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al, 2010). Tendo em vista este quadro, o estudo de compostos fitoquímicos são necessários para maiores descobertas terapêuticas.

A *Euterpe oleracea* Mart. (popularmente conhecido como açaizeiro) é encontrada em sua maioria no Amazonas (FREITAS, 2016; TEIXEIRA, 2015; ALMEIDA et al., 2004). Seus frutos possuem coloração tipicamente roxo-escuro em função da presença de pigmentos naturais, apresentam estruturas esféricas com aproximadamente 1,0 de diâmetro e 1,5 cm, semente com polpa de camada delgada composta pelo epicarpo e a parte externa do mesocarpo. O açaí origina-se desta fina camada da polpa. O interior do mesocarpo apresenta características

fibrosas e está acoplada ao endocarpo lenhoso (Figuras 5 e 6) (SCHULTZ et al., 2008).

Este fruto vem despertando grande interesse para áreas de pesquisa, pois apresenta características antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas em análises *in vitro* e composição fitoquímica visando também a produção de medicamentos (LIMA et al., 2012; LICHTENTHÄLER et al., 2005; SCHAUSS et al., 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2007; FAVACHO et al., 2011; SCHULTZ, 2006).

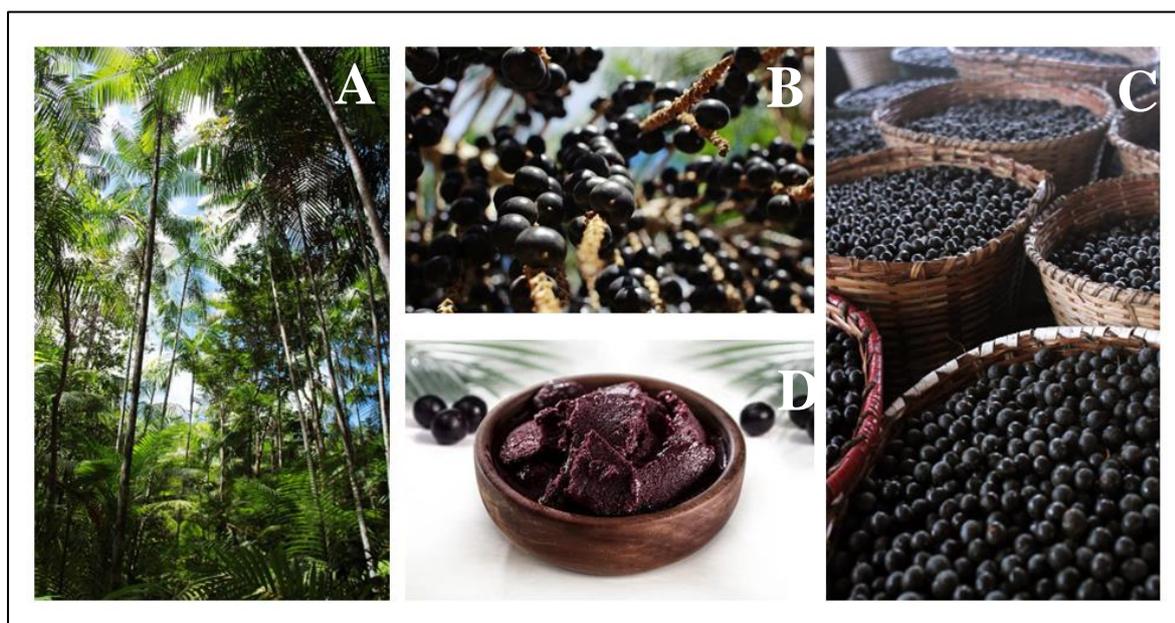


Figura 5. Conjunto de imagens representativas do açaí. **A** – *Euterpe oleareaca* Mart; **B**- *Euterpe oleareaca* em sua palmeira; **C** – Cestos repletos de *Euterpe oleareaca* após colheita e **D** – *Euterpe oleareaca* após processamento, pronto para consumo. Adaptado de: <https://www.embrapa.br/amazoniaoriental/buscadeimagens//midia/busca/Euterpe+oleareaca?p_auth=cvAOwk5T/> e <<https://www.remedio-caseiro.com/acai-fruta-emagrece-ou-engorda-entenda/>> Acesso em: 17. Fev. 2018.

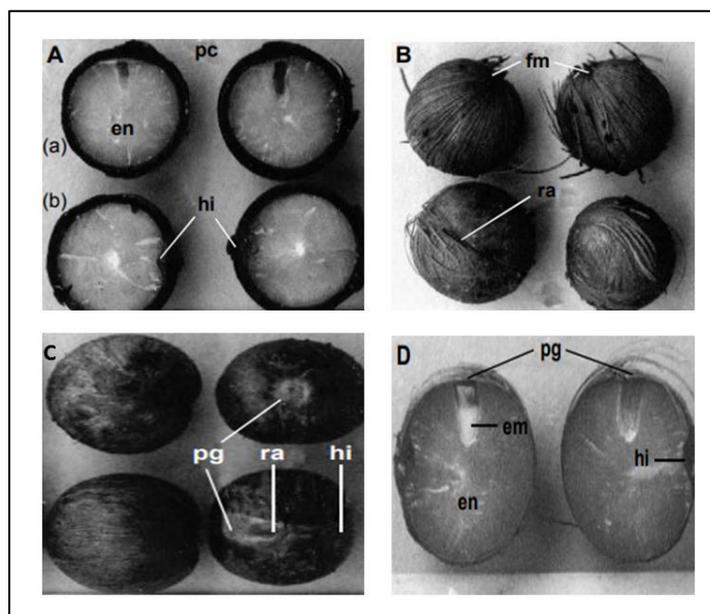


Figura 6. Imagens dos frutos que originam o açai. Em **A** – frutos com corte longitudinal **(a)** e **(b)** frutos com corte transversal; **B** – sementes do fruto com suas fibras; **C** – sementes com a retirada de suas fibras e **D** – posição do embrião do fruto presente na semente. **Legenda:** **Em** - embrião; **En** - endosperma; **Fm** - fibras mesocárpicas; **Hi** - hilo; **Pc** - pericarpo; **Pg** - poro germinativo; Ra – rafe. Adaptado de: < <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v25n1/19628.pdf>>. Acesso em: 17. Fev. 2018.

Conforme descrito em Nascimento et al. (2008) e Schauss et al. (2006), a polpa do açai é constituída por 53% de lipídeos, 1,5% de açúcar total e 13% de proteínas, fibras e polifenóis. A extração do óleo de açai é realizada a partir da de sua polpa e majoritariamente com a adição de éter de petróleo ou de enzimas (MONGE-FUENTES, 2014, PALA, 2016). Em ensaios realizados foram observados que, quando realizada a extração do óleo de açai por via enzimática, o mesmo apresentou 71% de ácidos graxos insaturados, 60,81% de monoinsaturados e 10,36% de poli-insaturados, e em contrapartida, quando utilizado o éter para sua extração, os valores encontrados foram de 68% de ácidos graxos insaturados, 60,33% de monoinsaturados, 7,83% de poli-insaturados, e 3,54% dos ácidos não foram identificados (NASCIMENTO et al., 2008). Demonstrando desta maneira que o método de extração pode resultar na perda de alguns compostos. Ensaio por

cromatografia gasosa também foram realizados e constatou-se que o óleo de açaí apresenta em grande parte de sua composição ácidos graxos palmítico e oléico (NASCIMENTO et al., 2008). Complementando esta análise, na tabela 2, é possível verificar a composição em ácidos graxos do óleo de açaí extraído de forma enzimática a partir da polpa do fruto (REFERÊNCIA?).

Tabela 2. Composição em ácidos graxos do óleo de açaí extraído de forma enzimática a partir da polpa do fruto.

Ácido graxo	Composição percentual (%)	Número de átomos de carbono
Láurico	0,04	12:0
Mirístico	0,11	14:0
Palmítico	25,93	16:0
Palmitoleico	4,88	16:1
(cis 9) Oléico	52,54	18:1
(cis 11) Vacênico	3,39	18:1
Linoléico	9,72	18:2
Linolênico	0,64	18:3
Araquídico	0,12	20:0
Não identificados	0,77	-
Total saturados	28,06	-
Total insaturados	71,17	-

Fonte: Terapia fotodinâmica mediada por fotossensibilizante à base de óleo de açaí em nanoemulsão para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo*. Adaptado de MONGE-FUENTES (2017).

Na literatura, estudos evidenciam que o açaí possui altos níveis de polifenóis bioativos, especialmente os flavonoides, antocianinas, cianidina glicosídica, cianidina-3-rutosídica, cianidina-3-sambubiosídica, feonidina-3-rutosídicaorientina, proantocianidinas, orientina, escoparina deoxihexose taxifolina, isovitexina, 4-hrixiflavium, este ultimo composto por duas ou três partes sendo elas glicona (antocianidina) e frequentemente o grupo acil (Figura 7) (FAVACHO et al., 2011;

CONTENTE, 2016; LICHTENTHÄLER et al, 2005; SCHAUSS et al., 2006; GALLORI et al 2004; COISSON et al.,2005). Estes polifenóis demonstram ações para supressão tumoral, impedindo e retendo a proliferação de células de câncer do cólon e, além disto, apresentam atividade pró-apoptótica e antiproliferativa em células leucêmicas (DIAS et al., 2014; SILVAa et al.,2014; LIMA et al.,2012).

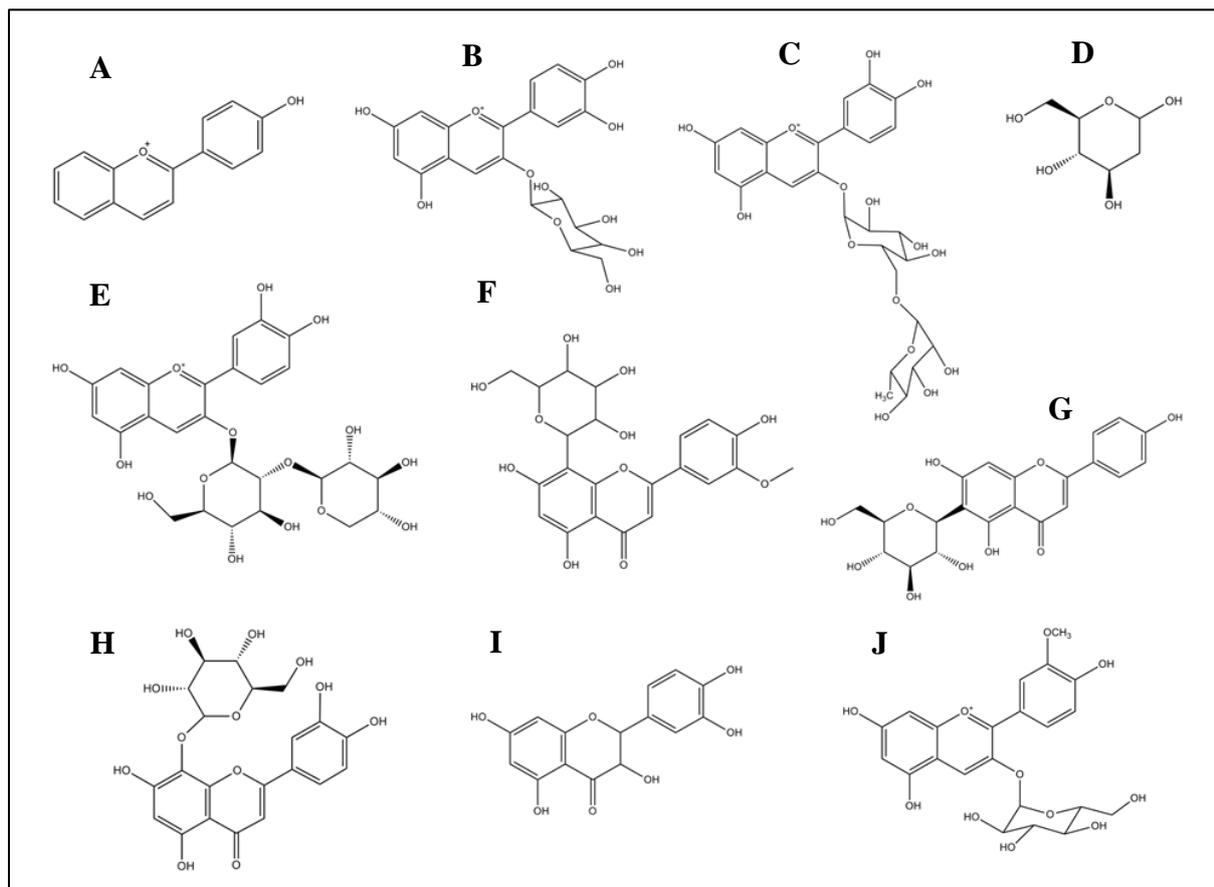


Figura 7. Algumas das estruturas químicas das antocianinas e flavonoides encontrados no *Euterpe oleracea*. **A-** 4-hidroxiavilium, **B-** Cianidina Glicosídica, **C-** Cianidina-3-rutosídica, **D-** Deoxihexose, **E-** Cianidina-3-sambubiosídica, **F-** Escoparina, **G-** Isovitexia, **H-** Orientina, **I-** Taxifolina e **J-** Feonidina-3-rutosídica.

Estudos mostraram que a antocianinas presentes no *Euterpe oleracea* proporcionaram atividade antiproliferativa em células tumorais cerebrais (linhagem C6) em camundongos (Hogan et al., 2010). As mesmas também mostraram atividade antioxidantes em tecido cerebral de camundongos conforme descrito em

Spada et al. (2009). Legon et al. (2010) demonstra que os flavonoides possuem elevada atividade antioxidantes em ensaio *in vitro*, além de propriedade anti-inflamatórias em humanos (Leong et al, 2010).

Silva et al. (2014) realizou ensaio com concentrações de polifenóis presentes no *Euterpe oleracea* e constatou que o extrato da semente possuía a grande parte da concentração de polifenóis representando 28,3%, posteriormente seguido do extrato total de frutos com 25,5% e por fim e do extrato da casca com 15,7%. Neste estudo foram utilizadas diversas linhagens celulares, entretanto a melhor resposta obtida foi encontrada em células MCF-7, no qual os três extratos reduziram a viabilidade celular, em tempos e em concentrações distintas. No entanto, somente a concentração de 40 µg/ml, de ambos os extratos foram semelhantemente eficazes na redução da viabilidade das células (SILVAd et al. 2014).

Estudos realizados por Fragoso e colaboradores (2013) demonstraram que camundongos machos quando alimentados com *Euterpe oleracea* seco por pulverização em concentração de 5,0%, reduziu significativamente a carcinogênese do colón induzida pelo 1,2-dimetilidrazina (DMH) (FRAGOSO et al 2013, FELSSNER, 2016)

Barros et al. (2015) descreve que em ensaio realizado com tratamento a base de extratos da semente de *Euterpe oleracea* mostrou redução de viabilidade celular em células MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2 todas elas de linhagem neoplásicas humanas. No entanto, a linhagem HeLa de carcinoma do colo do útero apresentou melhor resultado após o tratamento comparado com as demais. Além disto, o extrato não apresentou toxicidade em nenhuma das linhagens testadas (BARROS et al., 2015).

Diante do exposto, pode-se observar que o *Euterpe oleracea* mostra grande potencial farmacológico, porém, demais ensaios devem ser realizados para averiguação de seus efeitos toxicológicos e definições quanto concentrações e aplicabilidade terapêutica. Até o presente momento não foram realizadas análises sobre o emprego de óleo de açaí para o tratamento da linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino 4T1.

3.2 Ácido anacárdico

O *Anacardium occidentale* L. conhecido popularmente como cajueiro apresenta em seu fruto principalmente dois produtos, o pedúnculo (pseudofruto) e a castanha do caju (fruto verdadeiro) (Figura 8). O primeiro, utilizado para produção de sucos, geleias, doces e in natura, e do segundo obtém-se a amêndoa, produto este que apresenta grande importância comercial para os produtores e para o mercado mundial (FILHO, 2017). Segundo o IBGE (2018) a estimativa de produção da castanha de caju foi de 210,8 mil toneladas, representando um aumento de 56,7%, em relação a 2017 (IBGE, 2018). O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de castanha de caju segundo dados da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITES NATIONS, 2018).

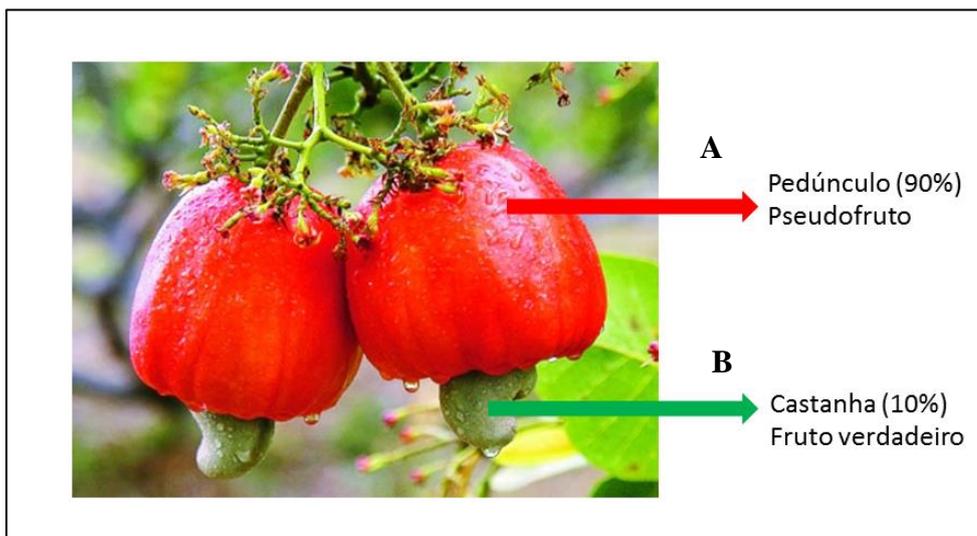


Figura 8. Produtos originados do cajueiro. **A** – Pedúnculo (Pseudofruto) e **B**- Castanha (Fruto verdadeiro) Adaptado de: <<http://www.proparnaiba.com/redacao/2012/05/09/destaque-na-tv-brasil-mudas-de-caju-se-adaptam-ao-clima-do-piau.html/>>. Acesso em: 16. Fev. 2018.

Para a obtenção deste expressivo volume de castanhas de caju, as cascas que representam 8% do peso total da castanha eram descartadas por não apresentarem valor para as indústrias alimentícias. No entanto, as cascas da castanha de caju possuem em seu pericarpo um líquido escuro com característica viscosa denominada de líquido da castanha de caju (LCC), este, pode ser subdividido em duas vertentes dependendo da temperatura de extração do LCC das cascas da castanha de caju (Figura 9) (GANDHI et al., 2012; FILHO, 2017). A alta temperatura converte ácidos anacárdicos (AA) em cardol e cardanol por meio de uma descarboxilação e originam o LCC-Técnico, empregado para produção de resinas, lonas de freio, revestimentos, tintas, entre outros. (PARAMASHIVAPPA et al., 2001; PHILIP et al., 2008). Em contrapartida, as cascas que não se submeteram a altas temperaturas são denominadas de LCC-Natural, no qual mantem suas estruturas químicas preservadas uma vez que, os ácidos anacárdicos não são expostos a descarboxilação (RODRIGUES et al., 2011; FILHO, 2017). Os ácidos anacárdicos

podem ser encontrados tanto no cajueiro quanto em seu fruto, porém, a maior quantidade do mesmo se localiza no líquido da castanha do caju (LCC) (NETO et al., 2014; FILHO, 2017).

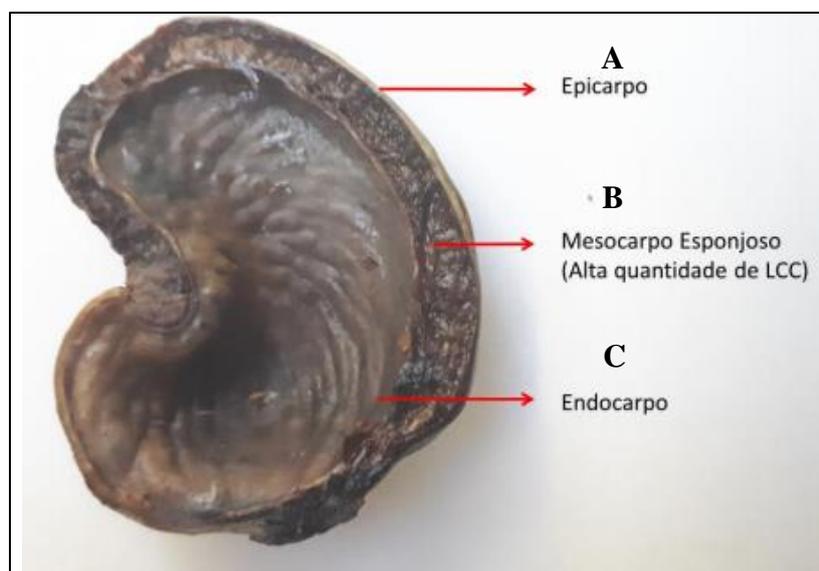


Figura 9. Castanha de caju (Fruto verdadeiro). **A** – Epicarpo; **B**- Mesocarpo esponjoso (Possui a maior quantidade de LCC) e **C**- Endocarpo. Adaptado de: FILHO (2017).

Os compostos fenólicos AA derivam do ácido salicílico e possuem características lipídicas, pois apresentam cadeia carbônica lateral. Segundo Legut (2014), cerca de 90% do extrato da casca é constituído pelo AA, e a parte restante é formada por outros compostos relacionados como cardanol, cardol e 2-metil-cardol (Figura 10). Os AA (2-hidroxi-6-pentadecil-benzóico) podem apresentar variações de tamanhos em sua cadeia alifática (2 a 7 números de carbono) conferindo a este uma característica apolar, sendo que, grande parte dos ácidos graxos apresentam cadeias longas de 15 carbonos. (SEONG et al., 2014; ČESLA et al., 2006; HEMSHEKHAR et al., 2012; JERZ et al., 2012; FILHO, 2017). Conforme Trevisan et al. (2006), os ácidos anarcádicos podem apresentar em sua conformação níveis de insaturação que oscilam entre saturado (nenhuma

insaturação) ou até mesmo 3 insaturações, tais variações agem diretamente na intensidade de sua polaridade. Todos estes fatores estruturais do AA descritos influenciam conseqüentemente na atividade biológica do mesmo em diversas formas de aplicação (Kubo et al., 2005; Morais et al., 2017; FILHO, 2017).

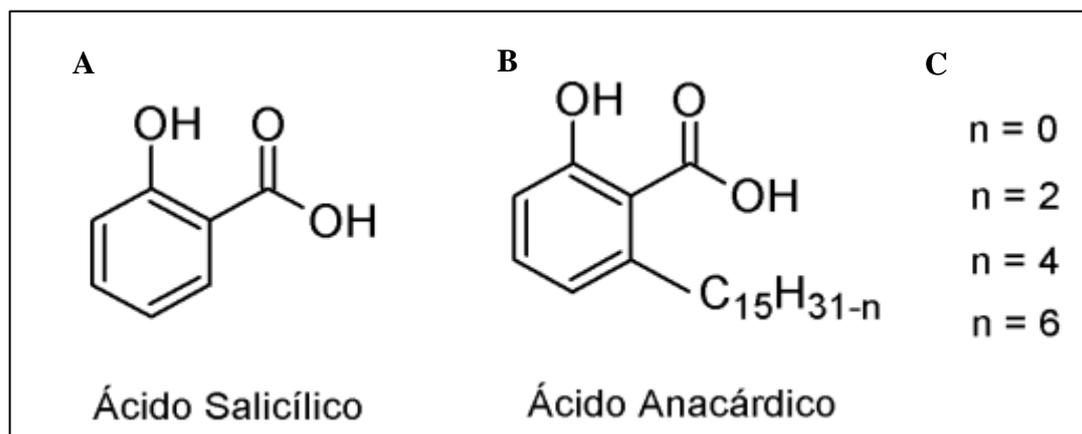


Figura 10. Estruturas moleculares. **A** – Estrutura molecular do ácido salicílico, **B**- Estrutura molecular do ácido anacárdico e **C**- Variações que podem ocorrer na cadeia carbônica do AA. Adaptado de FILHO (2017).

O ácido anacárdico vem sendo muito utilizado para aplicações em diversas áreas e tem demonstrado resultados significativos. Atividade moluscicida do AA foi descrita por Mendes et al (1990), que apresentou eficácia de 100% em testes laboratoriais quando o mesmo foi empregado para controle de caramujos transmissores de esquistossomose (MENDES et al, 1990). Atividades antimicrobianas também foram observadas em estudos *in vitro*, no qual foi utilizado o AA para controle de *Enterococcus faecalis*, este apresentou resultados similares quando comparado a bactericidas usuais com 2 % de clorexidina; evidenciando o possível emprego de AA como bactericida de origem natural (BALLAL et al., 2013).

De acordo com Schultz et al (2006), a atividade antiparasitária do AA foi demonstrada quando este foi utilizado contra larvas de besouro da batata, uma vez que, por base de preferência alimentar, as larvas apresentaram taxas menores de

alimentação em substratos que continham o AA, podendo inferir que, a possível pulverização em plantações com o ácido anacárdico pode ser uma ferramenta importante no controle de pragas na agricultura (SCHULTZ et al., 2006).

Atividades do AA na inibição enzimática também já foram descritas em Pereira et al. (2008). A inibição enzimática por ácido anacárdico foi evidenciada em Balasubramanyam et al (2003), neste estudo, a Histona-acetiltransferases (HATs) (conjunto de enzimas que agem de forma primordial na regulação da expressão gênica), o AA atuou de forma não competitiva com a HATs, se direcionando unicamente a transcrição de DNA, inibindo a ação da enzima intensamente.

O ácido anacárdico tem sido empregado em atividades antitumorais. Pesquisas mostram que o AA realizou supressão do desenvolvimento vascular do processo da angiogênese, e conseqüentemente, inibiu a proliferação tumoral, sendo estes resultados observados em cânceres de mama, cólon, próstata, rins, cervical, pulmão e melanomas (WU et al., 2011; HEMSHEKHAR et al., 2012; SEONG et al., 2014). O AA também realizou efeito inibitório de crescimento de neoplasias que necessitam de atividade hormonal, suprimindo os receptores de estrógenos e androgênios (LEGUT et al., 2014). Trevisan et al. (2006) descreve que o líquido da castanha do caju apresentou potente ação na captura de espécies reativas de oxigênio (ROS), conseqüentemente fornecendo proteção a possíveis danos que atingem o DNA. Em estudos em que foram utilizados extratos metanólicos presentes na fina camada do pedúnculo do caju (que também possui AA), foram observadas atividades antígenotóxicas e antimutagênicas (BARCELOS; SHIMABUKURO; MACIEL, et al., 2007). Em Tan et al. (2017), o AA apresentou indução apoptótica visto que atuou induzindo a Bax e caspases 3/9 além de realizar inibição na proliferação celular em neoplasia de próstata.

4. NANOTECNOLOGIA

4.1 Conceito

A idealização do conceito inicial de nanotecnologia partiu do físico americano chamado Richard Feynman, o mesmo sugeriu a capacidade de manipular os átomos de forma individualizada em uma escala nanométrica (OMBREDANE, 2016). Por definição, a nanotecnologia trata-se de um complexo interdisciplinar que engloba a ciência, a engenharia e a tecnologia sendo ela gerida através da manipulação de materiais em escala nanométrica, onde estes materiais apresentam características físico-químicas distintas do seu estado inicial, ou seja, nesta escala os diversos materiais assumem novas propriedades que não são observadas quando se apresentam em tamanho macro ou micro (Figura 11) (MOREIRA, 2013).

Atualmente, a nanotecnologia vem demonstrando o aprimoramento na administração específica de drogas para o tratamento de câncer, pois as nanopartículas em dimensões nanométricas podem transportar diversas moléculas funcionais ao mesmo tempo como: peptídeos, proteínas, fármacos de moléculas pequenas e ácidos nucleicos. Utilizando as formas de entrega passiva e/ou ativa, as nanopartículas podem elevar a concentração intracelular de fármacos em células tumorais e simultaneamente reduzir o efeito toxicológico em células saudáveis, com isto, aumenta-se o efeito anticancerígeno e ameniza-se a toxicidade sistêmica (WANG et al., 2009; SRIRAMAN et al., 2014). Esta área da nanotecnologia é definida como nanomedicina, visto que, possui como objetivo fundamental o “*targeted drug delivery system*”, ou seja, o desenvolvimento de

terapêuticas que se baseiam na entrega específica dos fármacos ao alvo interesse (GAO, 2013; HULL, 2013).

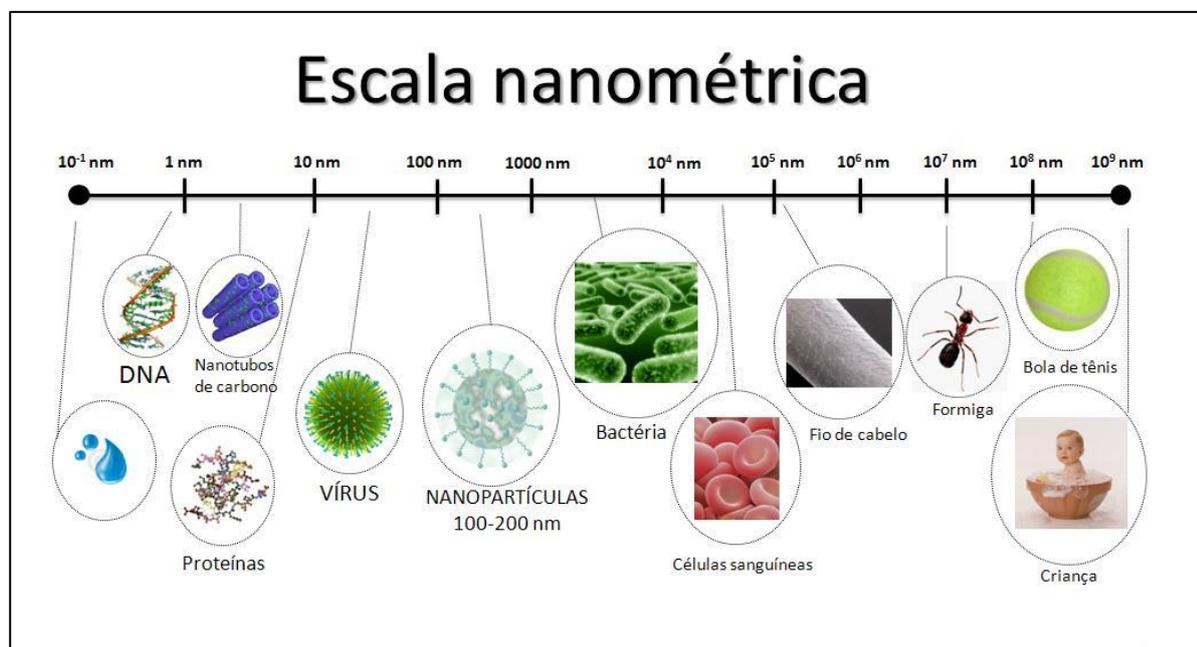


Figura 11. Escala nanométrica. Adaptado de <<https://betaeq.com.br/index.php/2015/09/29/a-origem-da-nanotecnologia-e-suas-varias-aplicacoes/>>. Acesso em: 13. Fev. 2018.

4.2 Nanotecnologia e a liberação de fármacos

Conforme referido acima, a nanotecnologia de forma geral é uma ciência aplicada na formulação e caracterização de diversos sistemas que alcancem a escala nanométrica (MOREIRA, 2013). Partindo deste princípio, os nanocarreadores produzidos para aplicação terapêutica e para diagnóstico de tumores têm como principais objetivos ultrapassar obstáculos naturais presentes no organismo, apresentar direcionamento ao alvo de interesse (tumor) e retenção no mesmo, e, sobretudo, realizar o transporte dos fármacos diretamente para células cancerígenas (WONG, 2010). Estes nanocarreadores são promissores devido ao fato de aperfeiçoarem a entrega dos medicamentos de forma efetiva além de aumentarem a segurança dos fármacos que neles são encapsulados. Outra

vantagem do uso destes nanosistemas é que podem ser direcionados ao alvo de interesse tanto de forma passiva como de forma ativa. (MOREIRA, 2013; ARAUJOa, 2016)

Os nanocarreadores são melhores retidos em tumores sólidos (p.ex.: adenocarcinoma), pois apresentam vetorização passiva e ativa. Na vetorização passiva a retidão dos nanosistemas ocorre em consequência da fisiologia tumoral que apresenta anormalidades em sua conformação, como vasos sanguíneos com fenestras de 300 a 700 nm, favorecendo maior permeabilidade e retenção de moléculas. Sendo assim, as nanopartículas que apresentam tamanho médio em torno de 200 nm, adentram os tumores sólidos, entretanto, não conseguem penetrar em tecidos normais (MOREIRA, 2013; TORCHILIN, 2011). Devido a isto, a retenção dos fármacos inseridos no organismo ocorre em sua maioria na massa tumoral e pequena quantidade ou nenhuma quantidade é retida no tecido sadio. Este processo descrito é também conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (Enhanced Permeability and Retention - EPR) (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; TORCHILIN, 2011).

No caso da vetorização ativa utiliza-se ligantes na parte superficial dos nanocarreadores, estes por sua vez, iniciarão uma interação específica com as células cancerígenas. Os anticorpos monoclonais ou mesmo seus fragmentos podem ser adsorvidos na parte superficial do nanosistemas, conseqüentemente, as partículas são redirecionadas de forma específica a um tipo celular (MOREIRA, 2013; DANHIER, 2010). Outra vantagem desse mecanismo ativo é que os anticorpos utilizados iniciam uma interação com receptores presentes na superfície celular, podendo modificar os mecanismos de proliferação celular, interferir na transdução de sinal e regulação da expressão de protooncogenes (LIECHTY,

2011). Conclui-se desta forma, que, a junção de ambas as vetorizações (passiva e ativa) potencializa a ação dos nanocarreadores uma vez que, direcionam as nanopartículas carregadas de fármacos ao seu sítio alvo (Figura 12).

Os nanosistemas utilizados propriamente para encapsulação e entrega de fármacos no alvo de interesse, são sintetizados a partir de inúmeros materiais como ouro, prata, lipídios, carbono, proteínas e polímeros. Apesar desta grande diversidade de materiais, os lipídios são mais comumente empregados e caracterizados, visto que, a vantagem de sua implementação ocorre devido ao fato de sua estrutura admitir a criação de *clusters* de peptídeos e também de outros ligantes favorecendo maior afinidade para a interação com a célula de interesse (MORACHIS; MAHMOUD; ALMUTAIRI, 2012; ARAUJO, 2016).

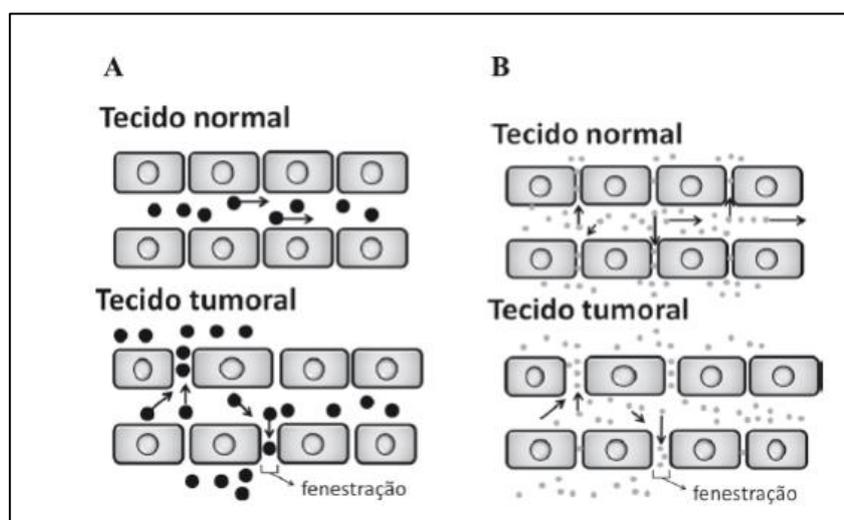


Figura 12. Desenho esquemático do efeito EPR em tecido normal e tecido tumoral. **A** – As esferas escuras representam as nanopartículas que carregam fármaco e que no tecido normal não transpassam o endotélio. Entretanto, no tecido tumoral devido às fenestrações largas, atravessam o endotélio e ficam retidas no tecido. **B** – As esferas acinzentadas representam o fármaco, que consegue atravessar tanto o endotélio normal quanto o tumoral. Adaptado de Oliveira (2012).

Como retromencionado, existem diversos tipos de nanocarreadores e são utilizados conforme a aplicação desejada, alguns deles são representados na figura abaixo.

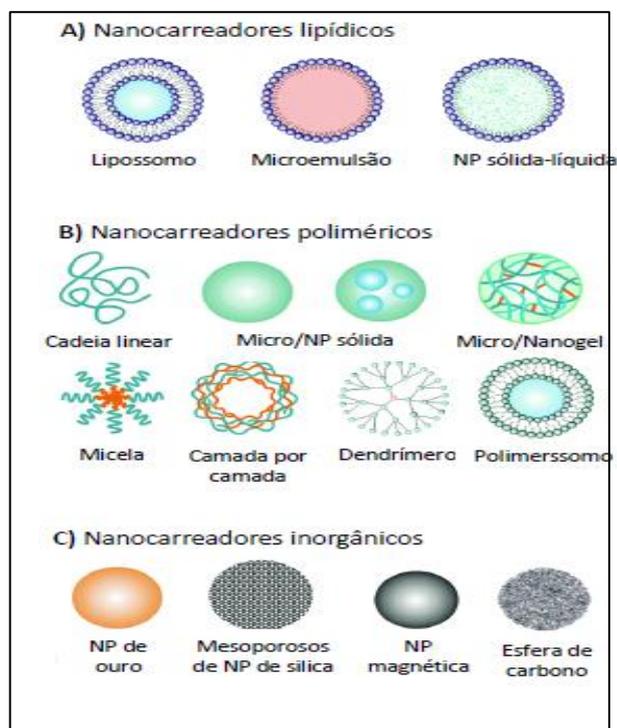


Figura 13. Exemplos de tipos de nanocarreadores. **A** – Nanocarreadores lipídicos; **B**- Nanocarreadores poliméricos e **C**- Nanocarreadores inorgânicos Adaptado de OMBREDANE (2016).

4.3 Nanoemulsão

Dispersões coloidais têm sido empregadas de forma ampla em indústrias farmacêuticas, agroquímicas, alimentícias e as cosméticas, pois apresentam vantagens como ativos hidrofílicos e lipofílicos em uma mesma formulação, transporte de fármacos e também possibilitam melhor controle para a escolha da via de administração para os quais serão empregados (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003; CAMARGO, 2008).

A nanoemulsão faz parte desta grande classe de coloides dispersivos multifásicos e apresentam nanogotículas entre 20 nm a 500 nm (PORTO, 2015; FORGIARINI, 2001). Contudo, as nanoemulsões que apresentam de 20 nm a 300 nm de diâmetro em suas nanogotículas possuem mais vantagens quando comparadas a demais nanoemulsões, pois este fator favorece sua maior estabilidade diante o efeito de sedimentação e cremagem, a quantidade de tensoativos utilizados são significativamente menores, possuem aspecto mais transparente e menor tensão interfacial. Seu sistema é definido como metaestável, pois demonstra estabilidade durante longo tempo, porém dependente estruturalmente do seu processo de formulação e da aplicação de tensoativos não-iônicos e/ou polímeros para garantir sua estabilidade estérica (PORTO, 2015; FORGIARINI, 2001; MEYAGUSKU, 2014, CAPEK, 2004).

No processo de formulação de nanoemulsões diversos parâmetros devem ser avaliados como a finalidade e a via de administração escolhida para a utilização deste nanomaterial, sua composição estrutural sendo elas de fase polar, apolar, tensoativo ou com polímeros associados, e por fim as proporções de cada um respectivamente (Figura 14) (GUPTA, 2016; ARAUJOa, 2016). No desenvolvimento de nanoemulsão o componente mais importante trata-se do emulsionante, pois o mesmo é responsável pela criação de pequenas nanogotículas, uma vez que ele reduz significativamente a tensão interfacial das duas fases presentes nesta formulação sendo elas polares e apolares, e também, proporciona atividade estabilizante para as nanoemulsões devido à repulsão eletrostática (GUPTA, 2016; ARAUJOa, 2016).

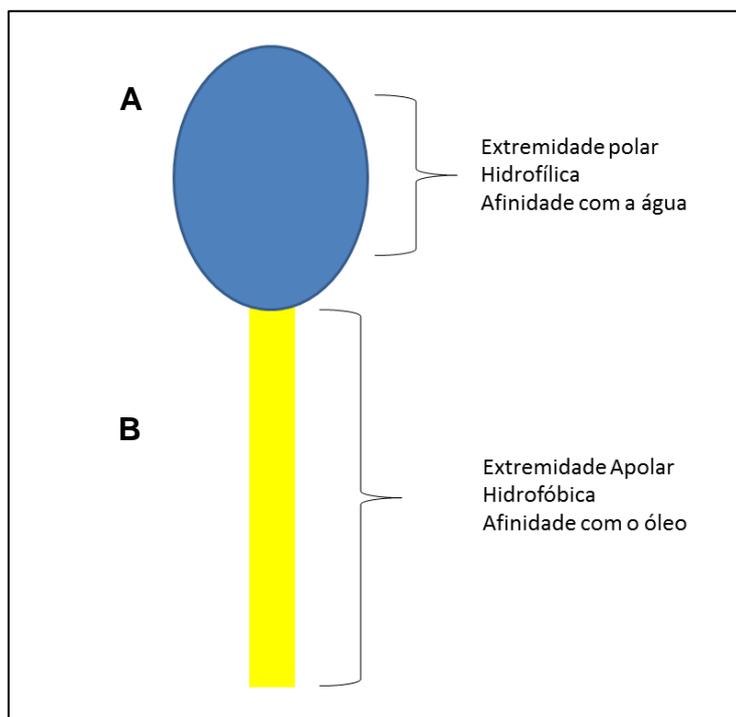


Figura 14. Representação esquemática de uma molécula de tensoativo. **A** – Extremidade polar e **B**- Extremidade Apolar.

Assim como neste presente trabalho, os óleos vegetais são amplamente utilizados para produção de nanoemulsões como dispersões de duas fases que são imersíveis entre si, porém, quando adicionado um tensoativo estas se tornam estáveis. Para esta formulação três componentes básicos devem ser agregados e ajustados, sendo eles, água, óleo e o tensoativo de escolha (PORTO, 2015; SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). De acordo com a lipofilia ou a hidrofilia da fase dispersante a definição da metodologia aplicada é denominada de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (FIGURA 15). Contudo, o sistema óleo em água (O/A) apresenta alto potencial na liberação de fármacos, além de aumentar a biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas no organismo juntamente com o aumento da dispersão das mesmas (SADURN et al, 2005; ARAUJO, 2016).

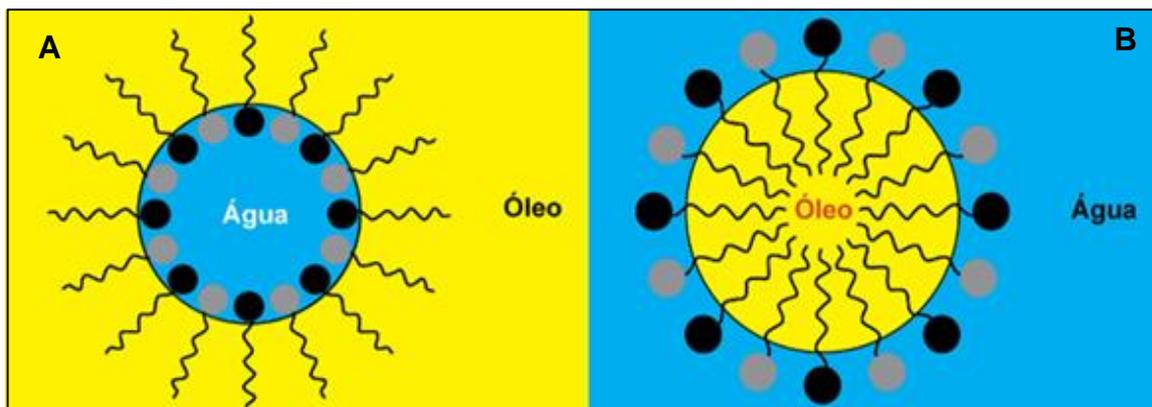


Figura 15. Desenho esquemático dos dois sistemas de nanoemulsão. **A** – Fase aquosa no exterior, com nanogotículas de óleo dispersas, são denominadas óleo em água (O/A) e **B**- Fase oleosa no exterior e a água dispersa na fase interna são chamadas água em óleo (A/O). Adaptado de < <http://www.cosmeticsonline.com.br/2011/artigo/54>>. Acesso em: 14 Fev. 2018.

Como dito anteriormente, o desenvolvimento de nanoemulsões ocorre com a aplicação de diversos lipídios e possuem efeito metaestável devido ao uso de tensoativos biocompatíveis, podendo apresentar características aniônicas, não iônicas ou catiônicas (ROSANI, 2011). Diversas causas podem induzir que as nanogotículas formadas apresentem diâmetros variados como as proporções de fármacos utilizados bem como de polímeros, tensoativos e óleo e por fim, a velocidade estabelecida para realizar a difusão da fase orgânica na aquosa. Juntamente a estas observações, cinco é o número de fenômenos que podem ocorrer para gerar instabilidade química nas emulsões: cremagem, floculação, coalescência ou coalescência parcial, inversão de fases e efeito *Ostwald ripening* (Figura 16) (ROSANI, 2011; PORTO, 2015).

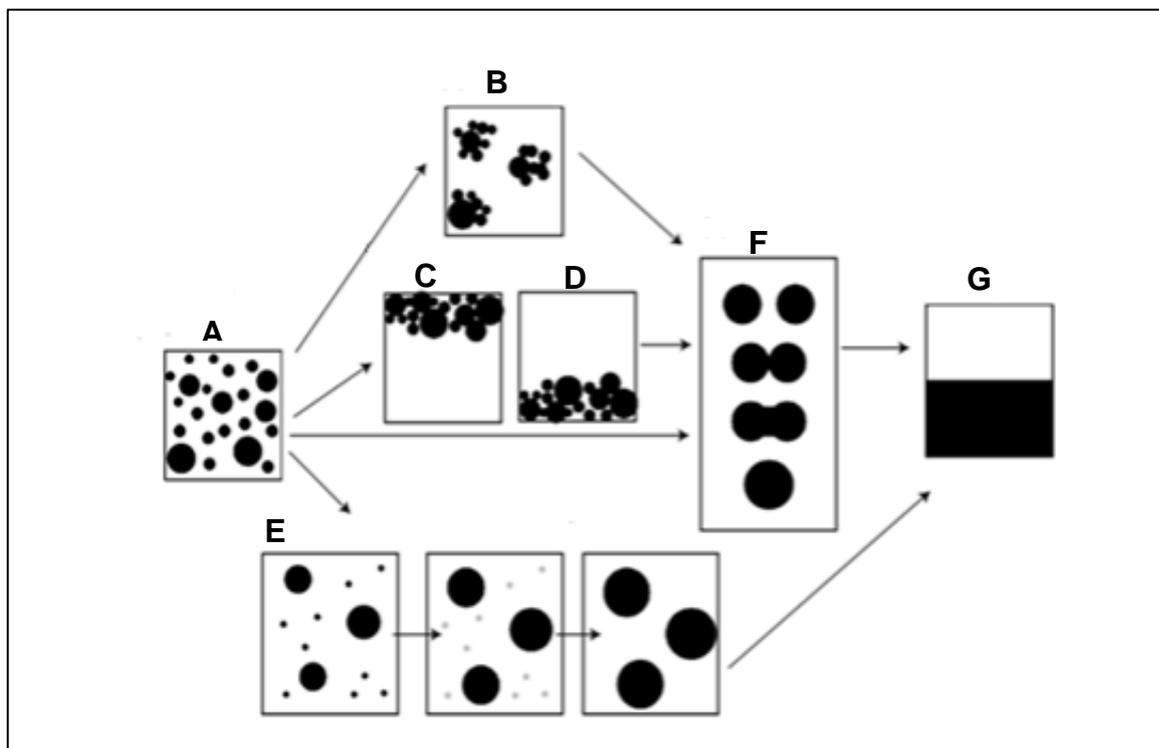


Figura 16. Desenho esquemático de instabilidade química nas emulsões. **A** – Emulsão original; **B**– Floculação; **C** – Cremação; **D** – Sedimentação; **E** - *Ostwald ripening*; **F** – Coalescência e **G** – Separação de fases. Adaptado de ROSANI (2011).

De forma cronológica a instabilidade da emulsão se inicia pelo efeito da floculação que ocorre por uma junção reversível das nanogotículas presentes na fase interna. A segunda fase de instabilidade é definida como cremagem, na qual se baseia em uma agregação de nanogotículas que foram previamente originadas na primeira etapa, em consequência disto, ocorre o direcionamento de uma película que se dispõem na superfície ou no fundo da emulsão (SADURN, 2005; ROSANI, 2011). O aparecimento da coalescência se deve pela aproximação das nanogotículas no intuito de formar nanogotículas maiores, processo este que apresenta caráter irreversível culminando na separação totalitária das fases. A diferenciação do efeito de floculação para o de coalescência se dá pelo fato de que a primeira apresenta uma camada interfacial das nanogotículas de forma intacta, em contrapartida, a segunda apresenta uma camada rompida (ROSANI, 2011; CAPEK, 2004). E por fim o fenômeno de *Ostwald ripening*, responsável pela difusão

do conteúdo lipofílico (interno) de nanogotículas menores para as maiores por via da fase hidrofílica (externa) da emulsão, e conseqüentemente ocasionando o aumento da gotícula. Quanto maior o arqueamento interfacial do conteúdo em dispersão, maior será a superfície da fase em dispersão (CAPEK, 2004; ROSANI, 2011).

Outro fator de extrema importância para a formulação de nanoemulsão é que o mesmo necessita de uma contribuição significativa de energia, na qual é fornecida através de dispositivos mecânicos ou até mesmo do potencial químico dos componentes. No emprego do uso mecânico, uma energia elevada é necessária para ocasionar uma taxa de cisalhamento suficientemente capaz de romper as gotas transformando-as em microescala de nanogotas (KOURNIATIS et al., 2010). Esta energia gerada deve atingir um nível de pressão desejada afim de que as nanogotículas alcancem o tamanho de 10 a 100 nm. Esta energia é fornecida e alcançada através de homogeneizadores de alta pressão ou também por geradores de ultrassom. Este método de cisalhamento durante o desenvolvimento da nanoemulsão faz com que o sistema seja cineticamente estável além de inibir o fenômeno de coalescência, através da tensão para o rompimento de nanogotículas (Figura 17) (KOURNIATIS et al., 2010; ROSANI, 2011).

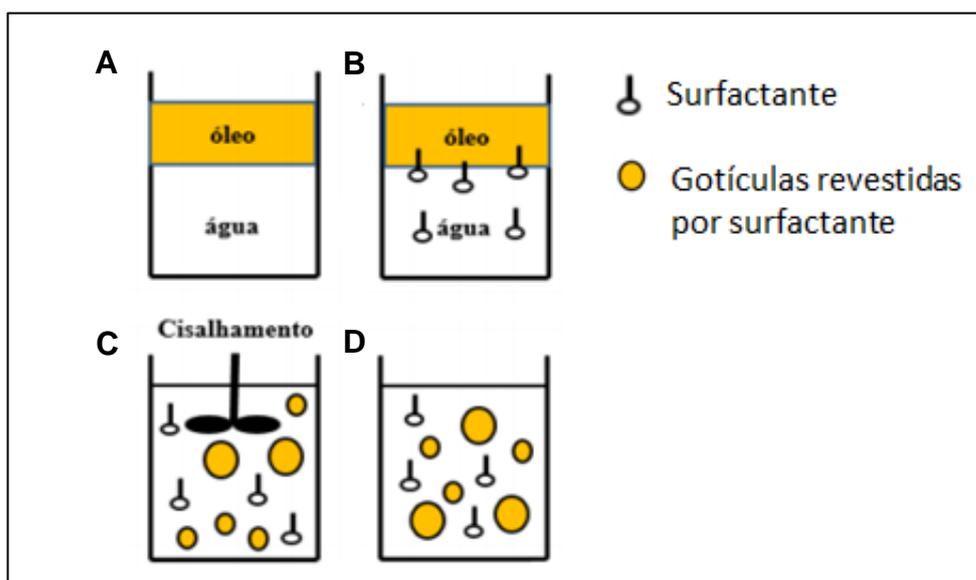


Figura 17. Desenho esquemático para formulação de nanoemulsão. **A** – Primeira etapa para formulação da nanoemulsão, sistema O/A; **B**- Segunda etapa para formulação da nanoemulsão, adição do surfactante; **C** – Terceira etapa para formulação da nanoemulsão, fornecimento de energia através do cisalhamento; **D** – Quarta etapa para formulação da nanoemulsão, formação de nanogotículas de 10 a 100 nm. Adaptado de ROSANI (2011).

5. JUSTIFICATIVA

Uma vez que o câncer de mama apresenta o segundo lugar entre os tipos de câncer da maior incidência no país, e o fato de as terapias existentes provocarem uma série de efeitos adversos, além da baixa biodisponibilidade dos fármacos e do desenvolvimento de resistência às terapias, torna-se fundamental o estudo de novas terapias que reduzam os efeitos sistêmicos e tóxicos dos tratamentos tradicionais. Tendo em vista os desafios mencionados, a combinação de medicamentos para o tratamento de câncer se tornou uma alternativa interessante, visto que, tal combinação pode resultar em ações sinérgicas entre eles melhorando a seletividade a diferentes alvos, além de dissuadir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. A utilização de nanopartículas à base de óleo de açaí em formato de nanoemulsão, associado com ácido anacárdico livre demonstra ser uma possível alternativa para contornar essas variáveis. Desta forma, ensaios foram realizados com intuito de avaliar os efeitos biológicos, ação antitumoral e toxicidade de nanopartículas de AÇNE, AÇNE CH e AÇNE PEG isoladas ou associadas ao AA, para explorar seu potencial terapêutico em células de câncer de mama. Este trabalho fez uso da linhagem de adenocarcinoma mamário murino 4T1 (significativo potencial metastático). O emprego das células 4T1 em pesquisas tem aumentado nos últimos anos devido sua alta capacidade de metástase, visto que, quando inserida ortotopicamente, esta linhagem é capaz de realizar metástase e alcançar diversas áreas apresentando formação de nódulos visíveis nos órgãos atingidos, como: pulmões, fígado, cérebro, osso, entre outros. Adicionalmente, o tumor 4T1 muito se assemelha com câncer de mama humano em estágio IV (HEPPNER et al.,2000; NETO et al., 2008; INCAf,

2018), sendo utilizado para o desenvolvimento de novas terapias para tumores com expressivo potencial metastático (PULASKI et al., 2001; PANTALEÃO et al., 2010; LAI et al., 2010). A associação de ácido anarcádico e a nanoemulção a base de óleo de açaí ainda não foram investigados para o tratamento de células de células de adenocarcinoma mamário murino 4T1. Diante do exposto, o presente projeto propõe a aplicação de nanoemulsões à base de óleo de açaí contendo AA como estratégia de terapia combinatória em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos terapêuticos do tratamento associado com nanoemulsões à base de óleo de açaí (AçNE, AçNE CH e AçNE PEG) e ácido anacárdico livre em células de câncer de mama com potencial metastático.

6.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar nanoemulsões à base de óleo de açaí quanto ao aspecto macroscópico, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga de superfície;
- Avaliar o efeito das nanoemulsões AçNE ou associadas ao AA na viabilidade, proliferação e morfologia de células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino 4T1;
- Investigar os mecanismos de morte celular induzidos pelas nanoemulsões AçNE ou associadas ao AA em células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino 4T1;
- Analisar a influência das nanoemulsões AçNE ou associadas ao AA no processo de migração de células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino 4T1.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Desenho experimental

Para a realização deste presente estudo, foram estabelecidos uma variedade de ensaios de forma a seguir os objetivos descritos nos itens 6.1 e 6.2 (Figura 18).

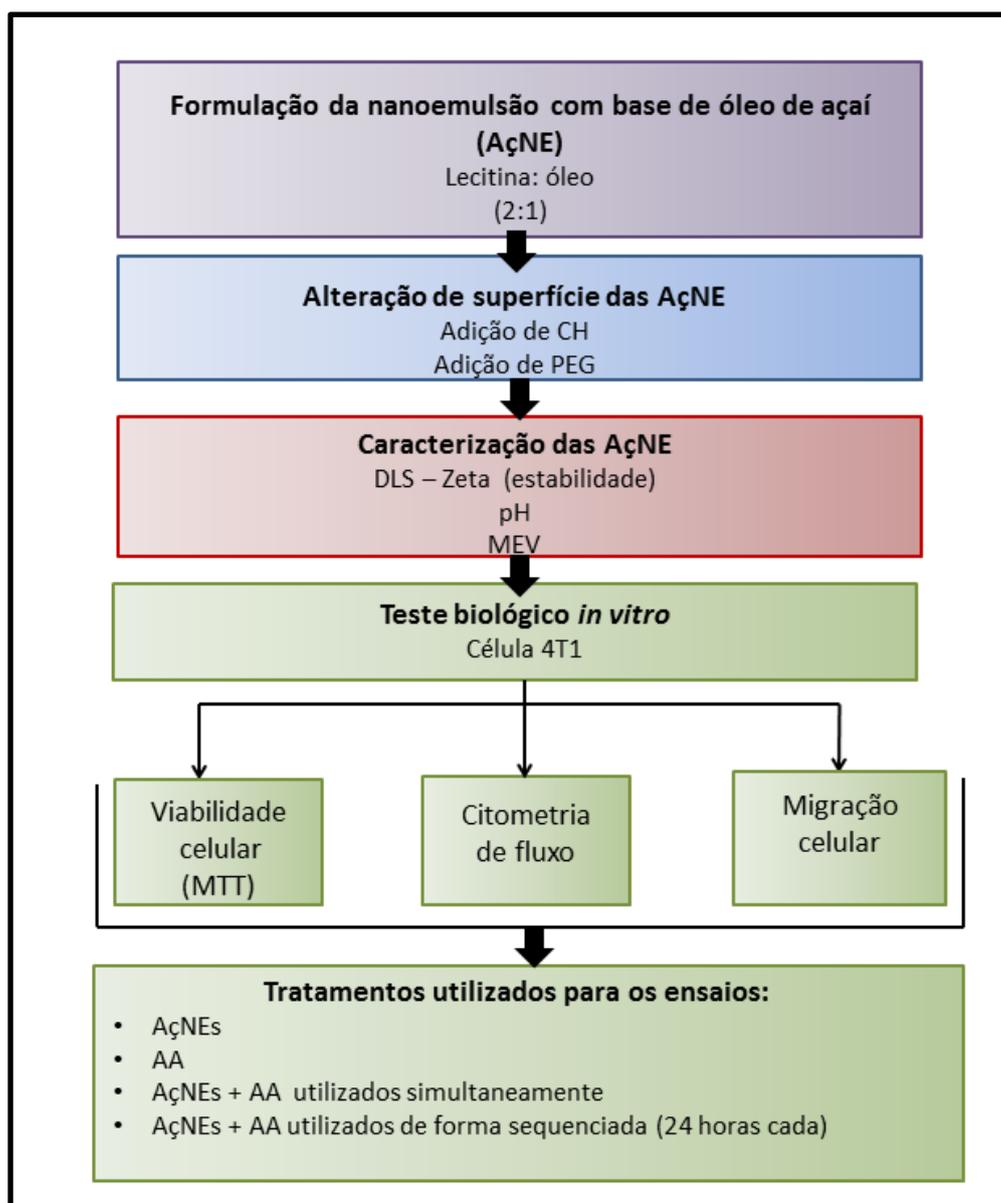


Figura 18. Esquema do desenho experimental. AçNE, Nanoemulsão com base óleo de açaí com lecitina; CH, Quitosana; PEG, Polietilenoglicol; AA, ácido anacárdico. DLS, espalhamento de luz dinâmico; Zeta, potencial zeta.

7.2 Formulação das nanoemulsões à base de óleo de açaí (AçNE)

Para a formulação das nanoemulsões aplicou-se o protocolo conforme descrito em ARAUJO et al (2017) alterado, no qual dividiu-se os experimentos em duas etapas. Na primeira fase houve a formação do concentrado pela dissolução da lecitina de ovo (LIPOID E 80, Alemanha) e o óleo de açaí (Mundo dos óleos, Brasil) em um meio dispersante podendo ser, solução de quitosana (2mg/mL) (Sigma, EUA) e solução de PEG (1,47 mg/mL) (Sigma, EUA) ou água nanopura, 5,6% m/v.

Na segunda fase, foi realizada a diluição de todas as amostras em água nanopura, proporção 1:12,5 mL. Para agitação de ambas as etapas, aplicou-se o método de sonicação em potência de 20 kHz durante um período de 5 minutos em banho de gelo, para redução do calor emitido durante o processo e possíveis degradações dos compostos bioativos. As mesmas foram armazenadas a 4°C e em abrigo de luz, visto que, apresentaram melhor estabilidade nesta condição comprovada por estudos realizados anteriormente (ARAUJO, 2017). Todas as nanoformulações realizadas nesta pesquisa estão representadas de forma esquemática na figura 19; sendo elas AçNE (Dispersa em água nanopura), AçNE CH (Dispersa em solução de quitosana) e AçNE PEG (Dispersa em solução de PEG).

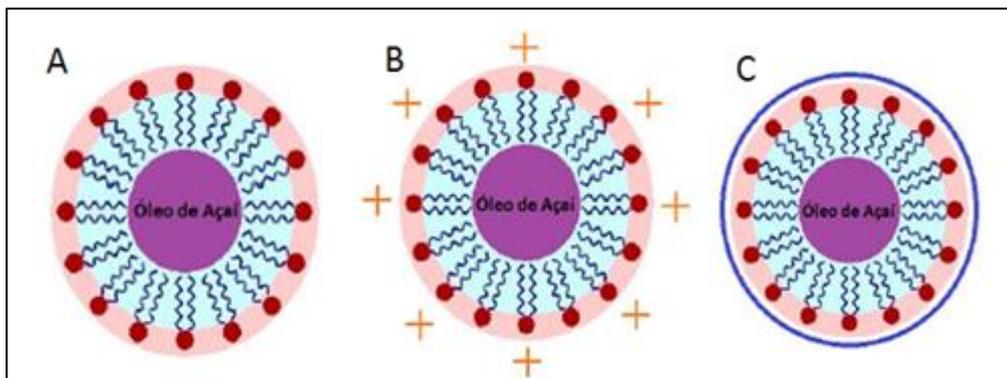


Figura 19. Representação esquemática das nanoemulsões à base de óleo de açaí. **A** - Nanoemulsões a base de óleo de açaí; **B** – Nanoemulsões a base de óleo de açaí recoberto por quitosana e **C** - Nanoemulsões a base de óleo de açaí recoberta com polietilenoglicol. Adaptado de ARAÚJO (2017).

7.3 Caracterização das nanoemulsões

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e a carga de superfície das nanogotículas a técnica de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética foi aplicada utilizando-se o equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, UK). As análises foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

As amostras (AçNE, AçNE CH e AçNE PEG) e os controles (Branco, Branco CH e Branco PEG) foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta de superfície (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, UK). Nenhuma das amostras formuladas necessitaram de diluição para análise. Os resultados obtidos foram representados a partir do diâmetro hidrodinâmico em número e em intensidade (Z-average), índice de polidispersão e do potencial Zeta utilizando o software ZetaSizer (versão 7.04). Resultados adquiridos foram demonstrados pela média \pm

desvio padrão da média e as representações dos gráficos foram realizados no programa GraphPad Prism® (versão 6).

Neste trabalho, características consideradas como ideais foram: IPD ($< 0,3$), Diâmetro Hidrodinâmico (< 300 nm) e Carga de Superfície (mais próximo de ± 30 mV em módulo).

7.3.1 Análise da estabilidade de nanoemulsões após período de armazenamento

Foram analisadas alíquotas com 1mL de amostras de cada nanoemulsão formulada. As mesmas foram estocadas a 4 °C e ao abrigo de luz, sendo avaliadas nos períodos de 0, 7, 15, 30, 60 e 120 dias após a síntese das nanoemulsões. Os métodos utilizados para esta análise serão descritos no item a seguir.

7.3.2 Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga de superfície

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) é utilizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico. Para isso, faz-se a medida da alteração da frequência Doppler de movimento browniano das partículas, e rapidamente o retorno é observado, podendo notar-se que as partículas que possuem raios hidrodinâmicos maiores locomovem-se vagarosamente, comparados aos de raios menores, e conseqüentemente apresentam-se resultados com distintas frequências Doppler (XU et al, 2014). O índice de polidispersão (IPD) é extremamente importante na caracterização de nanoemulsões, visto que, diz respeito à alteração do tamanho dentro de uma amostra relativa à sua distribuição em intensidade. O valor do IPD é variável de 0 a 1, tendo em vista que, quanto menor o valor, mais monodispersa se encontra amostra analisada.

Grande parte das partículas espalhadas em um meio aquoso obtém carga em sua superfície, especialmente em casos de fixação de espécies carregadas ou ionização de grupos. As cargas presentes na parte superficial das partículas alteram a repartição dos íons na interface, dando origem a uma camada que permeia a partícula distinta da solução. O potencial zeta define-se como uma das fundamentais forças que intermediam as interações interpartículas. Importante ressaltar que, quando as partículas apresentam elevado potencial zeta e mesmo sinal de carga, sendo positivo (+ 30mV) ou negativo (- 30mV), sofrerão repulsão. No caso de pequenas partículas ou moléculas que apresentem densidade reduzida para conservar-se suspensas, um alto Potencial Zeta atribui estabilidade, ou seja, a dispersão ou a solução apresentará baixa probabilidade à agregação. Desta forma, o DLS determina a carga de superfície (potencial Zeta) das partículas, indicando assim a estabilidade coloidal das mesmas (TRIERWEILER, 2009).

7.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia de superfície das nanopartículas, foi realizada microscopia eletrônica de varredura (*Quanta Feg 250, FEI Company, EUA*). Esta técnica se baseia na submissão da amostra a um feixe de elétrons. O mesmo interage com a região da amostra que é incidida até uma determinada profundidade, podendo variar até alguns microns dependendo da amostra, gerando elétrons secundários ou elétrons retroespalhados com relação ao primeiro feixe. Esta área é denominada volume de interação sendo responsável por produzir os sinais que são detectados e utilizados para a instauração da imagem e para a microanálise (LAUREN et al., 2003; DEDAVID et al., 2007).

Neste procedimento, a dispersão de nanopartículas foi diluída 1:1000 (v/v) em água destilada, e 30 µL da dispersão final foram depositados sobre a superfície de um suporte metálico denominado *Stub*. Em seguida, o material foi fixado com vapor de tetróxido de ósmio pelo período de 30 minutos e o suporte foi deixado para secar por 24 horas sobre a bancada e posteriormente foi metalizado em um metalizador *Blazers SCD 050®* (*Blazers Union AG, Liechtenstein*) e analisado no MEV.

8. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

8.1 Linhagem celular 4T1

A linhagem de câncer de mama 4T1 foi doada pela Professora Dra Suzanne Ostrand-Rosenberg (University of Maryland, Baltimore County, EUA). Trata-se de adecarcinoma mamário murino, sendo comumente utilizado em âmbito de pesquisa para análise e compreensão da biologia tumoral. Esta linhagem é altamente invasiva e tumorigênica, sendo encontradas metástases em múltiplos órgãos. Os experimentos realizados com esta linhagem tumoral foram conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

8.2 Manutenção das células

As células foram cultivadas em garrafas de culturas de 25 cm² e 75 cm² contendo 5mL e 10 mL de meio de cultura completo respectivamente. Meio de cultura utilizado: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Life, EUA*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (*Life, EUA*) e 1% de antibiótico (Penicilina – Streptomina, *Life, EUA*) (v/v), e mantidas em estufa umidificada (*Thermo Scientific, EUA*) a 37°C e 5% de CO₂.

8.3 Tripsinização celular

A linhagem tumoral 4T1 se adere facilmente na garrafa de cultura celular. Sendo assim, foi utilizada a tripsina (enzima que hidrolisa as ligações peptídicas), com intuito de desprender as células presentes na superfície da garrafa. Para a realização deste ensaio, primeiramente se descartou o meio de cultura presente na garrafa, e foram adicionados 3 mL na garrafa de 25 cm² ou 4 mL na garrafa de 75 cm² de tripsina (Tripsina 0,25%, *Life, EUA*). Posteriormente a garrafa foi incubada

na estufa a 37°C e 5% de CO₂ pelo período de 3 à 6 minutos. Em seguida, as células foram observadas em microscopia de luz para conferir o desprendimento das células. Afim de que a células não sofressem mais estresse, foram adicionados o mesmo volume utilizado de tripsina de DMEM completo, neutralizando o efeito da trispsina. O volume total que se encontra na garrafa, foi vertido em um tubo tipo Falcon de 15 mL estéril para ser centrifugado durante o período de 3 minutos a 1341 g em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante presente no tubo foi descartado e o *pellet*, depositado no fundo do tubo, foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultura completo e utilizado nos nas próximas etapas que serão descritas adiante.

8.4 Plaqueamento das células

Para realizar este procedimento, foi utilizado 10µL das células que anteriormente foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura após a centrifugação e dispensados em um microtubo de 0,6 mL e adicionados junto a ele 90 µL de Azul de Tripán (0,4 %). Este corante tem o intuito de corar de azul às células que estejam com a membrana plasmática rompida ou defeituosa, indicando que a célula não está viável. O contrario ocorre com células vivas, pois estas apresentam membrana plasmática íntegra, desta forma, o corante é rapidamente expulso da célula ou então não adentra a mesma e a célula conservar-se com uma coloração menos intensa.

Após a coloração, a mistura acima foi ressuspendida por quatro vezes no microtubo a fim de realizar a homogeneização. Em seguida, 10µL foram depositados em uma câmara de Neubauer para contagem celular em microscópio de luz invertido. Para calcular o número de células encontradas a fórmula a seguir fora utilizada:

$$\text{Número de células / mL} = \frac{\text{Número de células contadas} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Em placa de 96 poços de fundo plano foram depositadas 5×10^3 células/poço para que o volume de células não alcançasse a confluência durante o tempo total do experimento. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . No ensaio de migração celular foram depositadas $1,5 \times 10^5$ células/poço, em placas de 24 poços, sendo utilizado meio DMEM sem soro fetal.

8.5 Tratamentos

As nanoemulsões à base de óleo de açaí, óleo livre e seus respectivos controles brancos, etanol, e DMSO em concentrações de $360 \mu\text{g/mL}$, $180 \mu\text{g/mL}$ e $90 \mu\text{g/mL}$ e AA em concentrações de $3,125 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$ e foram diluídos em meio de cultura DMEM completo e água ultrapura objetivando obter as concentrações almeçadas para cada o tratamento. O controle negativo foi preparado com água ultrapura em meio de cultura DMEM completo no qual foi adicionado volumes equivalentes aos volumes acrescentados para os grupos experimentais. No momento de aplicação do tratamento nas células previamente plaqueadas, o meio de cultura DMEM completo de cada poço foi descartado na medida em que eram adicionados $200 \mu\text{L}$ das diferentes amostras. Durante os ensaios realizados neste trabalho, foram testados as AçNE, AA, AçNEs com adição de AA simultaneamente e AçNEs com adição de AA de forma sequenciada. As placas foram devidamente incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas.

Os grupos dos tratamentos experimentais estão descritos na tabela 2.

Tabela 3. Grupos dos tratamentos experimentais.

SIGLAS	AMOSTRAS REFERENTES
CTL	DMEM e água
Branco	Água com lecitina
AçNE	Nanoemulsão à base de óleo de açaí com lecitina
Branco CH	Lecitina e quitosana (CH)
AçNE CH	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, lecitina e quitosana (CH)
Branco PEG	Lecitina e polietilenoglicol (PEG)
AçNE PEG	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, lecitina e polietilenoglicol (PEG)
Óleo Livre	Óleo de Açaí Livre
AA	Ácido Anacárdico
AAEtanol	Etanol diluído em água (Mesma concentração do óleo de açaí)
DMSO	Dimetilsulfóxido (Mesma concentração do AA)
Branco + AA	Lecitina e Ácido Anacárdico
AçNE + AA	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, água e lecitina associada ao Ácido Anacárdico
Branco CH + AA	Lecitina e água com CH associado ao Ácido Anacárdico
AçNE CH + AA	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, água e lecitina com quitosana, associada ao Ácido Anacárdico
Etanol + AA	Etanol diluído em água (Mesma concentração do óleo de açaí) associado ao Ácido Anacárdico

9. TESTES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

9.1 Ensaio de determinação da viabilidade celular – MTT (BROMETO DE 3-(4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL-TETRAZOL)

Esta técnica é baseada na proporção do dano produzido pelo composto/extrato para a pesquisa do metabolismo celular de glicídeos por via da análise de atividade de desidrogenases encontradas nas mitocôndrias. Desta forma, entende-se como viabilidade celular, a viabilidade mitocondrial sendo quantificada pela redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazol) - sal que possui coloração amarela e solúvel em água - a formazan - sal que possui coloração roxa e é insolúvel em água - por via das atividades aquelas enzimas. Com isto, a redução de MTT em cristal de formazan é diretamente proporcional à viabilidade celular (FERNANDES, 2010).

Para a realização deste ensaio colorimétrico, primeiramente as células 4T1 foram expostas pelo período de 24 horas a tratamentos de diversas concentrações em placa de cultivo celular de 96 poços. Em seguida, os tratamentos foram descartados e foi adicionado 150 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura completo – 15 µL de MTT (*Life, EUA*) com 135 µL de meio de cultura - DMEM) em cada poço. A placa permaneceu em repouso durante 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Logo após o MTT fora retirado e em seu lugar foi adicionado 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma, EUA*) para dissolver os cristais de formazan que durante o tempo de incubação foram formados. A leitura da absorbância deste teste foi avaliada no espectrofotômetro (*Molecular devices, EUA*) a 595 nm. E por fim, os resultados obtidos foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular tendo em vista a absorbância do controle negativo (água

ultrapura com meio DMEM completo) em viabilidade de 100%. Os experimentos foram realizados de forma independente por três vezes e em triplicatas.

9.2 Citometria de fluxo

Trata-se de um método que possui a capacidade de avaliar concomitantemente múltiplos parâmetros de partículas ou células que se encontram suspensas em meio aquoso. O princípio desta técnica está na emissão de uma fonte de luz laser que captura cada partícula, logo após o espalhamento da luz provê dados a despeito do tamanho e granularidade da partícula interceptada. Estes dados coletados são enviados para um software para posterior análise. Partículas, moléculas ou estruturas de interesse podem ser marcadas com fluorocromos ou anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos (VIEIRA, 2003).

Os experimentos foram realizados em um equipamento chamado citômetro (*BD FACSVerser™, EUA*) do Departamento de Biologia Celular no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. As células foram tripsinizadas e contadas em câmara de *Neubauer* e o volume total de 1mL de meio completo DMEM contendo 10^4 células foi inserido em cada poço de uma placa de 24 poços para cultivo celular. A placa permaneceu incubada cerca de 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

O tratamento seriado foi realizado em concentração de 180µg/mL com as AçNE, Branco, AçNE associado ao AA em concentração de 100 µM e AA em concentração de 50 µM, controle negativo (água ultrapura) e o controle positivo (peróxido de hidrogênio – H₂O₂). Para cada dia de tratamento a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No terceiro dia deste experimento (após tratamento de AA e incubação), o sobrenadante presente em cada um dos 24 poços foi coletado e dispensado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL devidamente

nomeados a cada um dos poços. Em seguida, cada poço recebeu a adição de 150 μ L de tripsina, logo após a placa foi incubada na estufa a 37°C pelo período de 5 minutos. Os sobrenadantes presentes nos microtubos anteriormente retirados da placa foram recolocados em cada um dos poços correspondentes a fim de neutralizar a ação da tripsina. Posteriormente, as células foram ressuspensas neste volume total contido nos poços e coletadas novamente para os microtubos correspondentes para serem centrifugados a 3083 *g*, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante destes microtubos foi descartado e o *pellet* restante foi ressuspendido em PBS 1X e retornou a ser centrifugado para que o excesso de meio DMEM e tratamento fossem retirados. Em seguida, as células que passaram por todo o processo foram direcionadas para cada experimento distinto, descritos nos tópicos a seguir.

Durante todas as análises realizadas por citometria de fluxo (FACS), 10000 eventos foram obtidos para cada uma das amostras e cada experimento. Em cada avaliação de citometria de fluxo foi realizado um experimento independente em forma de triplicata.

9.2.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular

Para realizar a pesquisa de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas, foi adicionado iodeto de propídeo (PI). Trata-se de um corante que possui afinidade por ácido desoxirribonucleico (DNA), utilizado especialmente em análises de citometria de fluxo (FACS), devido a sua capacidade de adentrar entre as pequenas sequências de nucleotídeos.

O *pellet* formado pelas células tratadas foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% gelado e armazenado em - 20 °C pelo período mínimo de 24 horas ou até o dia da análise deste experimento. Para análise do mesmo, cada um dos microtubos

foram centrifugados a 3083 g, durante 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes presentes em cada um dos microtubos foram descartados e as amostras foram lavadas com PBS 1X e retornaram à centrifugação. Novamente os sobrenadantes foram descartados e adicionados ao *pellet* 100 µL de PBS 1X contendo RNase (50 µM). As amostras permaneceram incubadas na estufa a 37°C pelo período de 30 minutos ao abrigo de luz. Posteriormente, foram adicionados à temperatura ambiente e ao abrigo de luz 100 µL de PI (20 µg/mL) (*Probes – Thermo Fisher, EUA*) preparado em PBS por 30 minutos. Logo após este processo, as células foram analisadas por FACS. Este experimento foi realizado em formato de triplicata.

9.2.2 Potencial de membrana mitocondrial

Para analisar o potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a Rodamina 123 (*Probes – Thermo Fisher, EUA*). É um composto catiônico de fluorescência verde que se junta às membranas das mitocôndrias conforme a sua polarização. A solução estoque de Rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL. Ao pellet das células tratadas foram adicionados. O volume de 300 µL de Rodamina 123 (5 µg/mL) em PBS e em seguida foram incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz e mantidos em temperatura ambiente. As amostras passaram pela centrifugação a 3083 g, por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado e 300 µL de PBS foram acrescentados. Esta lavagem celular foi realizada duas vezes, com objetivo de retirar o excesso de Rodamina 123. Logo após estas amostras foram colocadas em gelo e analisadas por FACS imediatamente. Este experimento foi realizado em triplicata

9.2.3 Exposição de fosfatidilserina

Na parte superficial da membrana plasmática das células encontra-se um fosfolípido denominado fosfatidilserina, no qual durante processo apoptótico o mesmo é redirecionado para a camada externa da membrana plasmática atuando como sinalizador para a fagocitose. Existe uma proteína conhecida como Anexina V que possui alta afinidade por fosfatidilserina, sendo utilizada para identificação em células que apresentam a fase inicial de apoptose. Em experimentos por FACS, a Anexina V esta associada a um flurocromo (agentes que emitem luz após excitação luminosa) do tipo FITC usualmente utilizada concomitantemente ao PI. Apenas as células que apresentam danos na membrana plasmática ou que estejam mortas são permeáveis ao PI, sendo ele um indicador importante de morte por necrose e/ou apoptose tardia (BD Pharmigen™). Para o controle positivo de morte celular foi utilizado o paclitaxel (PTX) em concentração de 50 nM e para o controle positivo de morte celular por necrose foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na concentração 29,4 µM. Estes controles foram utilizados devido ao PTX ser medicamento que se liga à tubulina, proteína do citoesqueleto das células, reduzindo a proliferação celular e induzindo a morte celular por apoptose e concomitante a este processo o H₂O₂ por ser um agente oxidante que age diretamente na membrana lipídica e no DNA, acaba por ocasionar a ruptura da membrana celular e conseqüentemente levando morte celular por necrose.

Após o tratamento, o pellet das células foi ressuspendido em 500 µL de PBS refrigerado e centrifugado a 3083 g, por 5 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado ao pellet 100 µL de tampão de ligação (0,1 M de Hepes (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂). Posteriormente foi acrescentado 5 µL de solução de Anexina V (BD, EUA) e 10 µL de solução de PI (50 µg/mL) em

cada microtubo. Esta solução permaneceu em repouso pelo período de 15 minutos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Logo após, foi acrescentado 300 µL de tampão de ligação. As amostras foram mantidas em gelo e analisadas por FACS imediatamente. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

9.2.4 Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular

Para a realização do teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular, primeiramente as células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços de fundo achatado contendo 10^4 células por poço. Após 24 horas, as células foram submetidas ao tratamento seriado as células foram tripsinizadas, e centrifugadas, o pellet obtido foi ressuspensionado em 100 µL de meio de cultura complet. Destes, 10 µL da suspensão de células foram retirados e foi adicionada uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA) na proporção de 1:1 (v/v). A contagem de células totais foi determinada conforme descrito no qual foram consideradas células que possuíam coloração azul e não azul. Este experimento foi realizado em triplicata.

10. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR *IN VITRO*

Após o plaqueamento celular, foram adicionadas $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços de fundo achatado até atingirem confluência necessária para a formação da monocamada (tapete celular) no fundo dos mesmos. Em seguida, de forma manual, com a ponteira p200 μ L foi feita uma lacuna artificial chamada de "scratch" na monocamada celular na parte central de cada poço. As células que ficaram na borda do espaço recém-criado se movimentarão para a abertura a fim de fechar a lacuna feita artificialmente até que novos contatos de célula-célula sejam reestabelecidos. Em seguida, foram retirados os 500 μ L de meio DMEM utilizado para o plaqueamento e adicionados 1 mL de PBS estéril em cada poço sendo este ressuspendido uma vez para realizar a lavagem dos poços com intuito de retirar células que ficaram suspensas ao realizar o scratch. Logo após a primeira parte do tratamento seriado foi adicionada e a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, foi retirada a primeira etapa do tratamento seriado e a segunda etapa fora adicionada, posteriormente a placa retornou a estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Pontos de referencia foram delimitados na tampa de cada placa em cada poço com marcador permanente de ponta fina a fim de obter fotomicrografias realizadas em microscópio óptico Leica com software Leica Application Suite Version 3.0 das mesmas regiões em cada etapa sendo elas após o strach seguido da lavagem com PBS e posteriormente a cada etapa do tratamento seriado. A migração das células foi analisada como área livre (arbitrariamente marcada em região que não apresentavam celularidade) e a mesma foi medida com o programa Image J (Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA), sendo que a redução percentual da

área do strach caracterizou o índice de migração celular. Os ensaios foram obtidos em triplicata.

11. TESTES ESTATÍSTICOS

Todos os resultados de ensaios celulares e caracterização foram obtidos em triplicata e apresentados como a média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Prism 5.01 (EUA). As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise ANOVA, teste Tukey, considerando-se estatisticamente significativo em $p < 0,05$ com padronização com um intervalo de confiança de 95%. Os gráficos foram plotados no programa Prism 5.01.

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho a superfície da nanomulsão AçNE foi modificada com a adição de quitosana (AçNE CH) ou PEG (AçNE PEG) com objetivo de analisar sua interferência nas nanogotículas com relação a estabilidade e atividade em células 4T1 de câncer de mama.

Estudos na literatura mostram que a quitosana vem sendo utilizada no processo de síntese de nanopartículas em consequência de sua carga positiva conferir maior eficiência nos processos de absorção/associação pelas membranas negativas de células tumorais através da interação e atração eletrostática, além de promover o transporte paracelular pela regulação das junções oclusivas; por estas razões a mesma foi empregada neste estudo (CAMPOS; VARAS-GODOY; HAIDAR, 2017; CONG et al., 2017; DE MATTEIS et al., 2016). O PEG foi utilizado para recobrir a nanogotícula a base de óleo de açaí (AçNE) visto que apresenta o potencial de impedir adsorção e agregação pelas proteínas séricas, por via de hidratação e repulsão estéricas, sustentando desta forma estabilidade coloidal (DE MATTEIS et al., 2016).

A tabela 3 mostra as características físico-químicas das nanogotículas presentes nas nanoemulsões formuladas.

Tabela 4. Análise do diâmetro hidrodinâmico, IPD, carga de superfície e pH's de nanogotículas nas nanoemulsões à base de óleo de açaí.

Formulação	Z – Avarage (nm)	Índice de polidispersão (IPD)	Potencial Zeta (mV)	pH
Branco	91,9 ± 2,7	0,345	-14,3 ± 0,5	7
AçNE	174,3 ± 1,2	0,220	-17,5 ± 0,8	7
Branco CH	144,2 ± 1,3	0,259	18,4 ± 2,1	4
AçNE CH	177,6 ± 2,4	0,216	17,9 ± 0,9	4
Branco PEG	84,6 ± 0,9	0,275	-14,4 ± 0,6	7
AçNE PEG	76,03 ± 0,6	0,210	-13,7 ± 0,3	7

(AçNE) Nanoemulsão a base de óleo de açaí com lecitina (AçNE+ CH) Nanoemulsão à base de óleo de açaí e lecitina recoberta com quitosana; (AçNE PEG) Nanoemulsão à base de óleo de açaí e lecitina recoberta com polietilenoglicol.

Na tabela 3, foi mostrado que AçNEs (AçNE, AçNE CH, AçNE PEG) apresentaram um diâmetro hidrodinâmico típico de nanogotículas de nanoemulsões após sua formulação, valores estes que compreendem entre 20 nm e 200 nm (WANG et al., 2009). O diâmetro hidrodinâmico apresentado nas nanogotículas presentes na AçNE CH, corroboraram com outros estudos, que utilizaram o mesmo em diversos tipos de nanoemulsões (DE MATTEIS et al., 2016). AçNE PEG também demonstraram similaridade em estudos realizados com o mesmo (MEKKAWY et al., 2017). As nanogotículas de nanoemulsões a base de óleo açaí também demonstraram valores de diâmetro hidrodinâmico similares aos

de outras nanoemulsões a base de óleo de açaí encontrado na literatura (MONGE-FUENTES et al., 2017; RAMOS, 2013).

As nanogotículas formadas em AçNE CH obtiveram potencial Zeta com valores positivos, isto por que, a quitosana apresenta propriedades catiônicas, corroborando assim, com os demais estudos realizados com a mesma (DE MATTEIS et al., 2016). Compreende-se que, a alteração encontrada no potencial Zeta é um indício de que as moléculas catiônicas de quitosana foram adsorvidas na superfície das nanogotículas. Em contrapartida, a AçNE e a AçNE PEG apresentaram valores negativos de potencial Zeta. De acordo com Freitas e colaboradores (1998), o potencial Zeta que apresenta valores próximos a 30 mV em módulo é o considerado ideal para aquisição de nanogotículas de uma nanoemulsão estável, desta forma, pode-se afirmar que, ocorreu uma estabilidade coloidal moderada nas nanogotículas presentes nas nanoemulsões formuladas. Em contrapeso, também se encontra na literatura estudos que demonstram que nanopartículas podem manter-se estáveis por vários meses mesmo com potencial Zeta neutro ou inferior a 30 mV em módulo (FREITAS; MÜLLER, 1998; OMBREDANDE, 2016; ARAÚJO, 2016).

As AçNE e AçNE PEG (tabela 3) apresentaram nanogotículas dentro dos critérios relatados em Maeda e colaboradores (2013), que recomenda cargas superficiais moderadamente negativas para as mesmas de modo a evitar a interação com a carga negativa dos vasos sanguíneos. O diâmetro hidrodinâmico de todas as nanogotículas das formulações AçNE apresentaram valores dentro do intervalo esperado para que o transporte passivo destas ocorra dentro de um microambiente tumoral a qual apresenta fenestras de 200 e 800 nm em seus vasos sanguíneos (PASZKO et al, 2011)

Em estudos de Araújo (2017), as nanogotículas presentes nas nanoformulações a base de óleo de açaí foram avaliadas em temperatura ambiente (T.A) e a 4°C ao abrigo de luz por 120 dias. Constatou-se que, as nanoemulsões armazenadas a 4°C e ao abrigo de luz, apresentaram maior estabilidade das nanogotículas, e com exceção da formulação com CH, todas as outras apresentaram pH 7, embora as nanogotículas das nanoemulsões armazenadas em T.A indicassem queda com o passar do tempo. As nanogotículas das nanoformulações a base de óleo de açaí analisadas neste presente trabalho apresentaram valores de pH 7 corroborando com estudos de Araujo (2017), visto que, as únicas nanogotículas de nanoemulsão que apresentaram pH 4 também foi a de formulação com CH. Isto porque, por serem constituídas com a adição de quitosana, as mesmas apresentam em sua composição o ácido acético, sendo este utilizado para sua dissolução, caracterizando a nanoemulsão com nanogotículas ácidas. Desta forma, as análises das AÇNEs foram realizadas apenas para verificar se seguiam todos os critérios e caracterização previamente estabelecidos em Araujo (2017) afim de testa-las em linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino 4T1

12.1 Estabilidade das AÇNE - Período de armazenamento

As AÇNE com diferentes coberturas foram armazenadas ao abrigo da luz em temperatura ambiente e a 4 °C pelo período de 120 dias, e suas nanogotículas foram avaliadas quanto aos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, IPD e potencial Zeta seguindo parâmetros de Araujo (2017) (Figura 20).

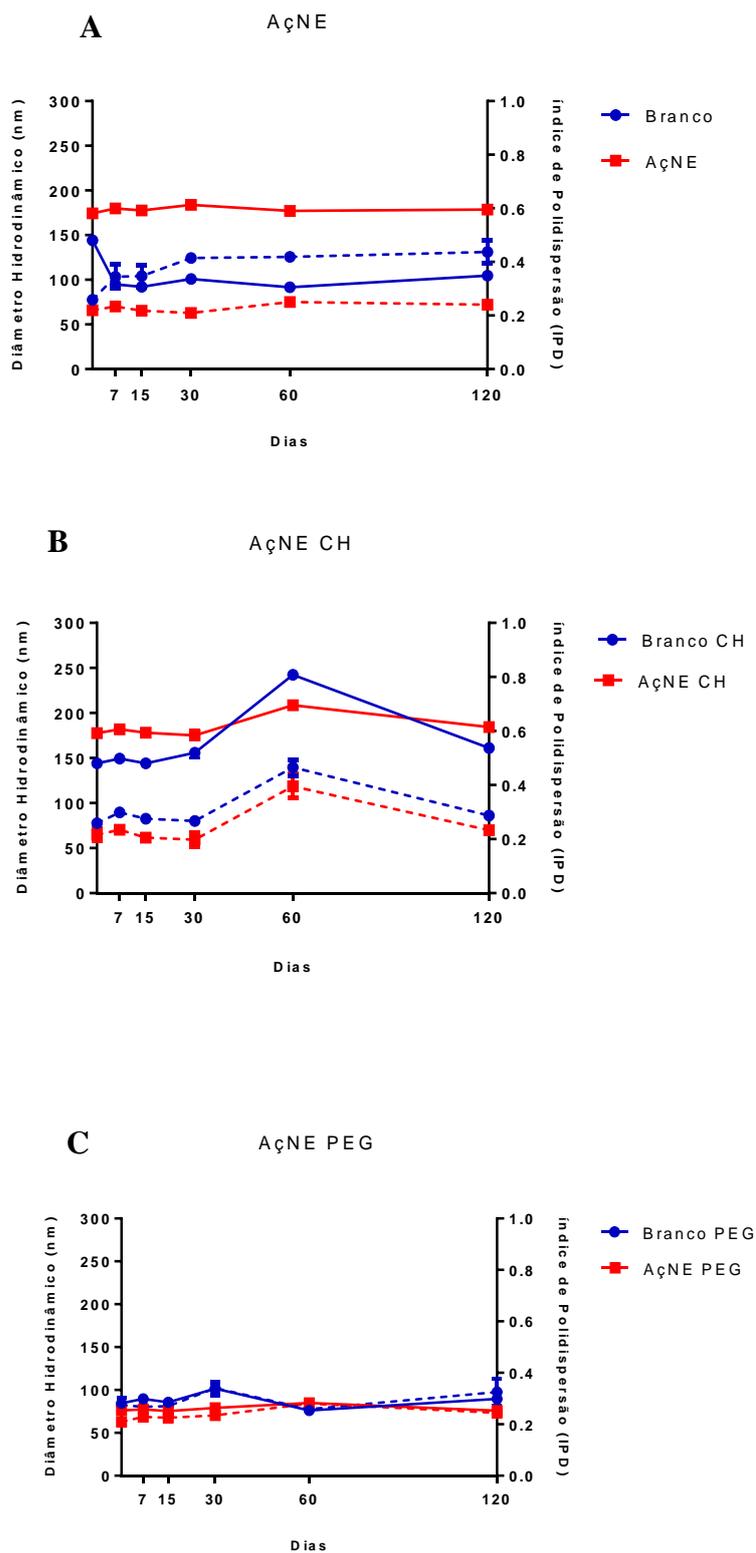


Figura 20. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua e do índice de polidispersão, linha descontinua, da formulação. **A** - AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açáí); **B** - AçNE CH (nanoemulsão com quitosana) e **C**- AçNE PEG (nanoemulsão com polietilenoglicol) e seus respectivos Brancos armazenados a 4 °C ao abrigo de luz por 120 dias.

Após 120 dias de armazenamento, as nanogotículas da formulação AçNEs apresentaram a estabilidade referente ao diâmetro hidrodinâmico, contudo, as nanogotículas das formulações branco de AçNE e branco CH apresentaram-se instáveis, visto que, os sistemas desenvolvidos não apresentaram núcleo oleoso, o que pode ter contribuído para a baixa estabilidade; em contrapartida o branco PEG manteve-se estável sugerindo impedimento estérico, desta forma, as nanogotículas não conseguem se aproximar uma das outras.

As nanogotículas das nanoformulações desenvolvidas apresentaram uma média de índice de polidispersão entre 0,210 e 0,220 (Figura 20), indicando um padrão de monodispersão, o que evita a agregação das partículas (NAYAK et al., 2015). Resultados de IPD não mostraram amplas alterações indicando que as nanogotículas presente nas formulações se mantem homogêneas. Esta estabilidade ocorre devido ao baixo tamanho das nanogotículas e de sua polidispersão, já que as mesmas asseguram prevenção do efeito de *Ostwald*, cremagem e sedimentação (WANG et al., 2009). Concluem-se desta forma que, todas as nanoformulações realizadas se apresentaram cineticamente estáveis durante o período de 120 dias.

De acordo com a figura 21, pode-se observar o fenômeno de adsorção de cargas em todas as nanogotículas presentes nos sistemas desenvolvidos no período analisado. Onde, as nanogotículas nas AçNE e AçNE PEG observou-se tendência decrescente de carga e ascendente para a AçNE CH. Contudo, todas as nanogotículas das AçNEs apresentaram cargas próximas ao ideal, $\pm 30\text{mV}$ conferindo estabilização eletrostática devido a repulsão entre as mesmas, justificando o IPD constante no período estudado (HOW et al, 2013).

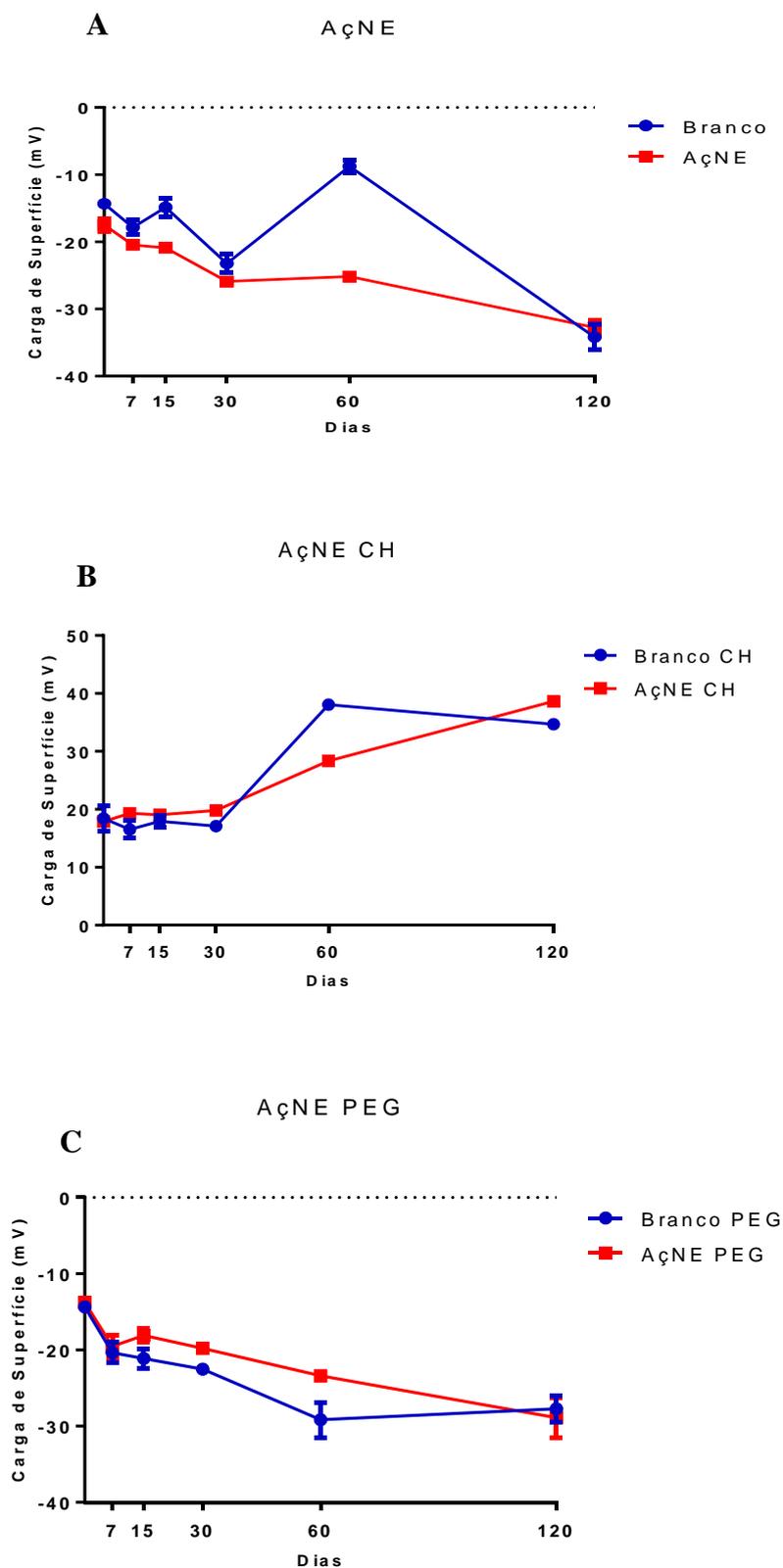


Figura 21. Gráfico comparativo do potencial Zeta da formulação. **A** - AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açaí); **B** - AçNE CH (nanoemulsão com quitosana) e **C** - AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e seus respectivos Brancos armazenados a 4 °C ao abrigo de luz por 120 dias.

12.2 Análise de morfologia por microscopia eletrônica (MEV)

A avaliação de morfologia de nanotúculas de AÇNE realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou partículas esféricas de superfície rugosa (Figura 22). Estas apresentam tamanhos homogêneos corroborando com os resultados de baixo PDI mostrados na figura 20(a). Contudo, o diâmetro hidrodinâmico fornecido pela técnica de dispersão de luz dinâmica ($174,3 \pm 1,2$ nm) apresentou-se maior que o calculado a partir das fotomicrografias de MEV (± 95 nm) devido à camada de solvatação considerado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Como o demonstrado na figura 22 (A), (B), (C) e (D).

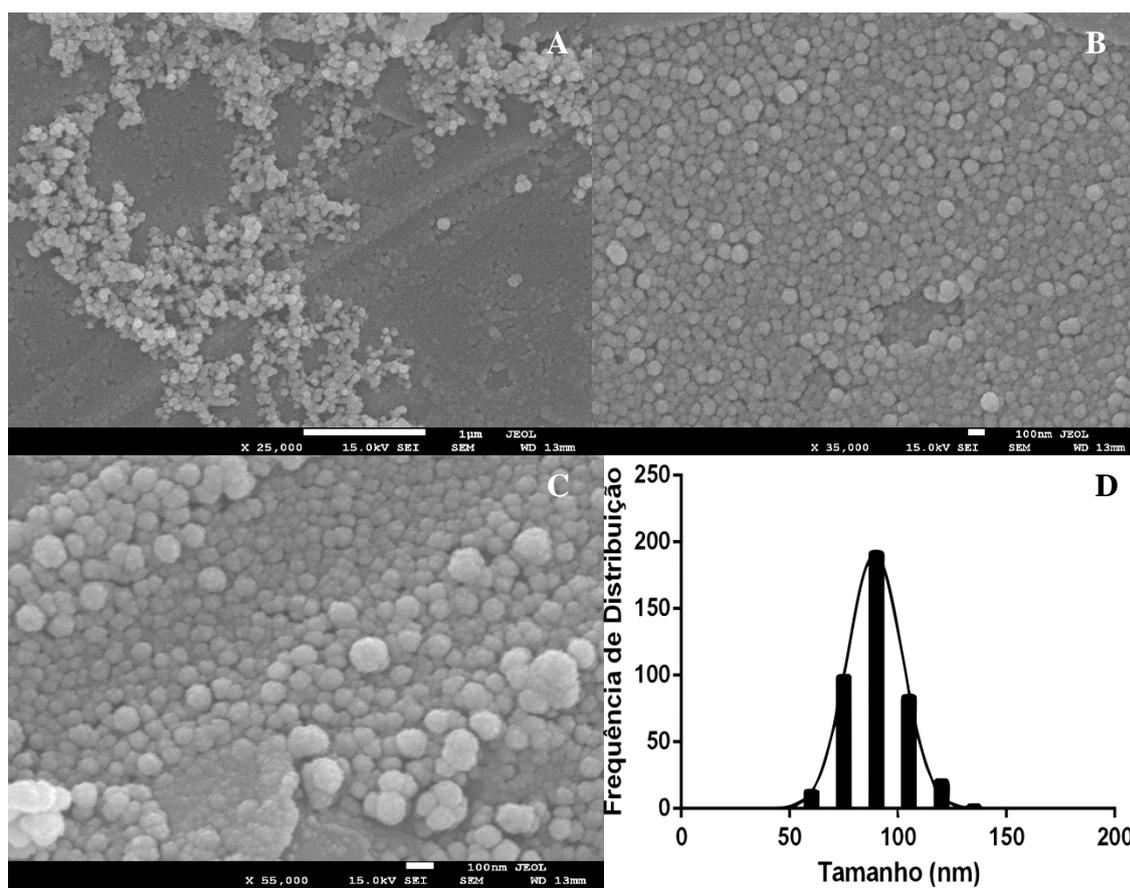


Figura 22. Avaliação da morfologia superficial das nanopartículas. AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açaí) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em **(A)**, **(B)** e **(C)**. Imagens com diferentes aproximações. **(D)** Frequência de distribuição em função dos tamanhos das nanopartículas AçNE.

13. ENSAIOS BIOLÓGICOS

13.1 Determinação da viabilidade celular (MTT)

13.1.1 Tratamento com AçNE, AçNE CH e AçNE PEG em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

O presente ensaio *in vitro* teve como principal objetivo avaliar citotoxicidade em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 tratadas com as AçNEs, AçNE CH e AçNE PEG e averiguar a melhor concentração e tempo destes tratamentos. Os tratamentos foram realizados com concentrações equivalentes a 90 µg/mL, 180 µg/mL e 360 µg/mL de óleo de açaí no período de 24 horas. Para representar viabilidade em 100% foi utilizado como controle DMEM completo com água ultrapura (Figura 23).

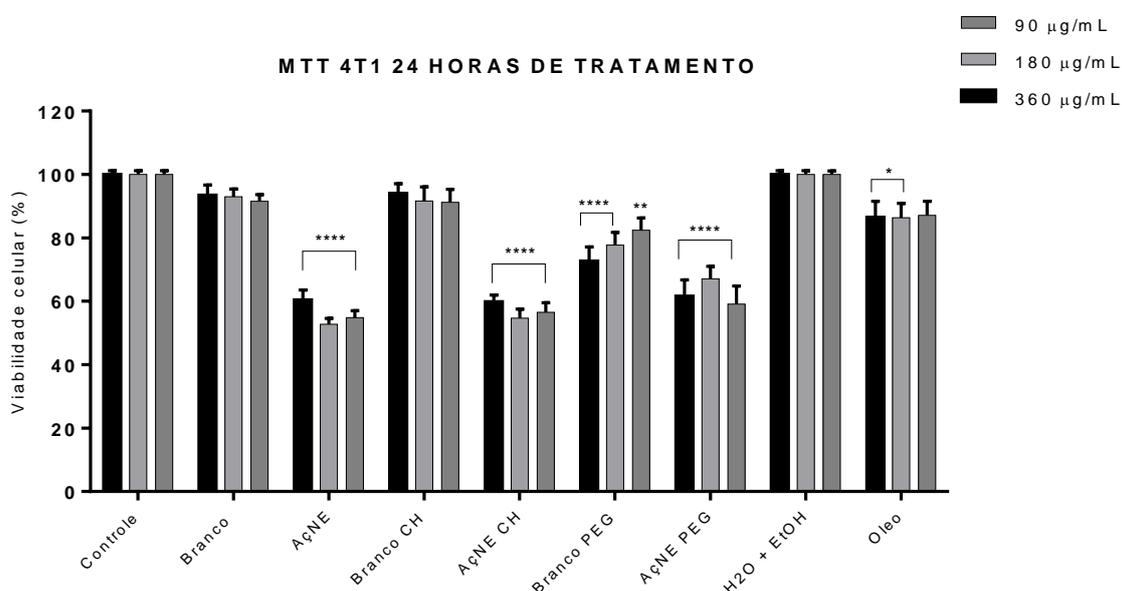


Figura 23. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) submetidas a diferentes concentrações (90 µg/mL, 180 µg/mL, 360 µg/mL) de AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol), óleo livre e seus respectivos brancos, Branco (formulação lecitina e água), Branco CH (formulação lecitina e quitosana), Branco PEG (formulação lecitina e PEG) e Água com etanol comparando-os com o controle água (H₂O com meio DMEM) por 24 horas. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (*: P<0,05 e ***: P < 0,001).

Os resultados encontrados no ensaio de viabilidade da figura 23 referentes às AÇNEs e ao óleo livre comparados aos seus controles foram de 40%, AÇNE; 41%, AÇNE CH; 39%, AÇNE PEG, e 14%, óleo de açaí livre em concentração de 90 µg/mL; 48%, AÇNE; 46%, AÇNE CH; 33%, AÇNE PEG e 14% óleo de açaí livre em concentração de 180 µg/mL e, por fim, 46%, AÇNE; 44%, AÇNE CH; 41%, AÇNE PEG e 13% óleo de açaí livre em concentração de 360 µg/mL. Estes resultados mostraram que todas as nanoemulsões (AÇNE, AÇNE CH e AÇNE PEG) induziram reduções significativas na viabilidade celular; em contrapartida, o óleo de açaí livre não apresentou baixa na viabilidade celular de forma expressiva variando apenas entre 14% e 13%.

Quando comparados os grupos de AÇNEs em 90 µg/mL, 180 µg/mL e 360 µg/mL pode-se observar que, de forma geral, todas elas apresentam similaridade em seus efeitos diante seus tratamentos em as células 4T1. Desta maneira, para ensaios subsequentes foi definido o uso das concentrações 180 µg/mL e 360 µg/mL, tendo em vista o uso de uma grande concentração e uma concentração intermediária para futura associação com ácido anacárdico. Ainda em caráter comparativo, a nanoemulsão de AÇNE PEG demonstrou menor redução de viabilidade celular em todas as concentrações testadas (39%, em 90 µg/mL, 33% em 180 µg/mL e 41% 360 µg/mL), contudo, as amostras de Branco PEG também reduziram a viabilidade similarmente em todas as concentrações testadas (28%, em 90 µg/mL, 23% em 180 µg/mL e 18% 360 µg/mL). Baseado nestes valores compreende-se que o Branco PEG apresenta por si só alto índice de citotoxicidade, não conferindo a nanoemulsão a base de óleo açaí a redução de viabilidade celular, ainda que a menor dentre as AÇNEs avaliadas. Tanto o Branco quanto os Branco CH não reduziram a viabilidade celular, indicando desta forma, o efeito do óleo de

açai nanoencapsulado e descartando a ação dos componentes presentes para a nanoformulação.

Quando comparado o grupos de AÇNEs com o óleo de açai nota-se diferenças significativas sendo elas de 26%, AÇNE; 27%, AÇNE CH e 25% AÇNE PEG em concentração de 90 µg/mL; 34%, AÇNE; 32%, AÇNE CH e 19% AÇNE PEG em concentração de 180 µg/mL; 33%, AÇNE; 31%, AÇNE CH e 28% AÇNE PEG em concentração de 360 µg/mL; compreende-se desta forma que, o encapsulamento do óleo de açai apresentou extrema importância para que houvesse redução de viabilidade celular, visto que, somado a esta análise, com exceção do Branco PEG, os Brancos (Branco e Branco CH) em todas as concentrações não apresentaram redução significativa na viabilidade celular sendo de 7%, Branco; 6%, Branco CH e 28% Branco PEG em concentração de 90 µg/mL; 8%, Branco; 9%, Branco CH e 23% Branco PEG em concentração de 180 µg/mL; 9%, Branco; 9%, Branco CH e 18% Branco PEG em concentração de 360 µg/mL, comprovando baixa citotoxicidade dos componentes que foram utilizados para a nanoformulação. Diante do exposto, compreende-se que para estudos posteriores serão utilizadas as AÇNE e AÇNE CH e seus brancos, em concentrações de 180 µg/mL e 360 µg/mL

Segundo estudos de Monge-Fuentes (2017), sua nanoemulsão a base de óleo de açai quando associada à terapia fotodinâmica (TFD), em linhagem tumoral de câncer de pele melanoma murino demonstrou potencial citotóxico nas mesmas. Outros estudos como em Ramos (2013), constatou-se potencial citotóxico com o uso de nanoemulsão a base de óleo de açai e TFD em linhagem tumoral de câncer de pele melanoma murino das mesmas.

Araujo (2017), descreve que em ensaios de MTT (viabilidade celular), suas nanoformulações a base de óleo de açaí e o óleo de açaí livre, demonstraram potencial citotóxico no período de 24 e 72 horas em linhagem A431 (câncer de pele não melanoma) no entanto, essa atividade de redução de viabilidade reduziu no decorrer dos experimentos.

13.2 Tratamento com Ácido Anacárdico em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

Para os ensaios com o AA, as células da linhagem 4T1 submetidas ao tratamento com as concentrações de 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , e 100 μM seus respectivos controles no intervalo de 24 horas com intuito de definir uma janela nas concentrações para emprega-la em associação as AçNE e AçNE CH. Foi utilizado como controle DMEM com água ultrapura (H_2O), e DMSO representando 100% da viabilidade.

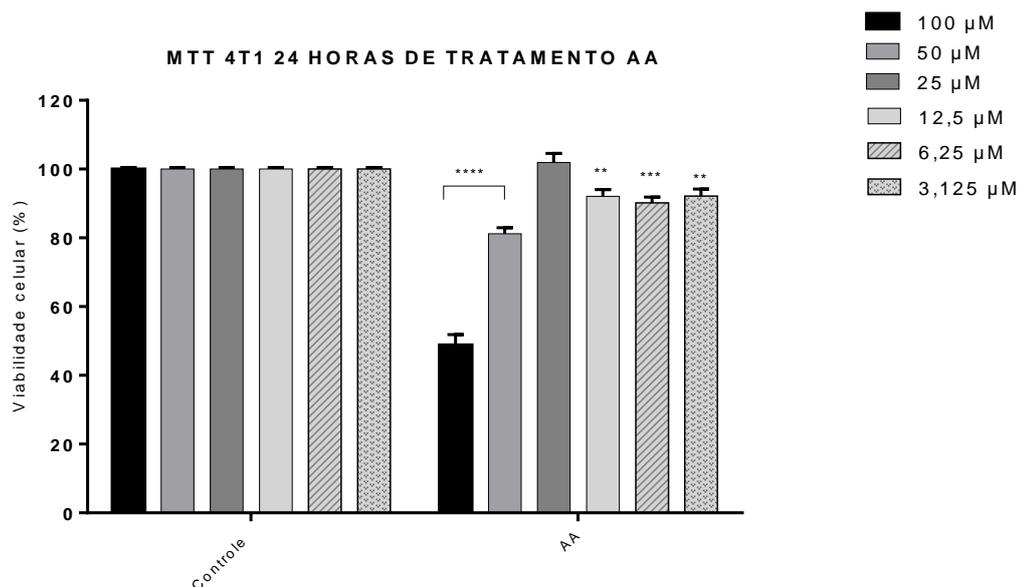


Figura 24. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) submetidas a diferentes concentrações (3,125 µM, 6,25 µM, 12,5µM, 25 µM, 50 µM, e 100 µM) de ácido anacárdico (AA) comparando-os com o controle água (DMEM com DMSO) por 24 horas. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (***: $P < 0,001$).

Passados 24 horas de tratamento celular com o uso de AA em concentrações de 3,125 µM a 100 µM, foi possível observar que as concentrações de 3,125 µM, 6,255 µM, 12,5 µM e 25 µM, não apresentaram redução significativa na viabilidade celular. Em contrapartida, concentrações de 100 µM e 50 µM representaram uma redução de 50% e 20% respectivamente. Desta forma, em ensaios posteriores foi determinado o uso de AA nas concentrações de 100 µM, 50 µM e 25 µM.

Na literatura encontram-se estudos que relatam a utilização de AA em tratamentos de tumores hipofisários, nas mamas e próstatas, melanoma e pulmonar (AL-HAZZANI et al., 2012; KIM, 2013; LIPKA et al., 2014; SUKUMARI-RAMESH et al., 2011; TAN et al., 2012). Até o presente estudo, não foram

encontrados relatos do uso de AA em aplicações em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1.

Schultz et al. (2010) demonstrou em seus estudos que o ácido anacárdico promoveu inibição a proliferação celular em linhagens de LCC9 e LY2 de câncer de mama, e também em células MCF-10A epiteliais normais da mama juntamente com a linhagem MDA-MB-231 neoplásica da mama.

Até o presente estudo, não foram encontrados relatos do uso de AA em aplicações em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1.

13.3 Tratamento das nanoemulsões à base de óleo de açaí associado AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

Neste ensaio, as AçNE, AçNE CH e seus respectivos brancos foram utilizados nas concentrações de 360 µg/mL e 180 µg/mL em tratamento simultâneo com AA (concentrações de 100 µM, 50 µM e 25 µM) em células 4T1 pelo período de 24 horas, com intuito de avaliar quais concentrações de nanoemulsões apresentaram melhores reduções de viabilidade celular juntamente com a adição de AA em diferentes concentrações definidas pelo ensaio anterior para análise de possíveis efeitos de combinação dos mesmos. Foi utilizado como controle DMEM com água ultrapura (H₂O) e DMSO, representando 100% da viabilidade.

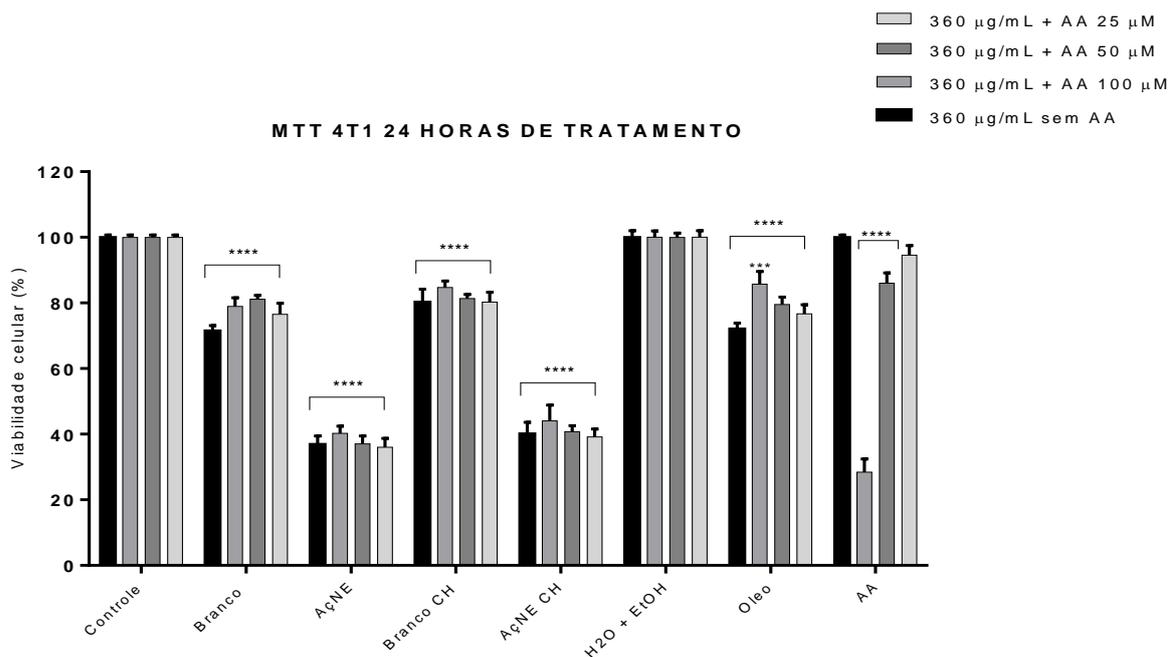


Figura 25. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) submetidas a concentração 360 µg/mL de AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), óleo de açaí e seus respectivos brancos, Branco (formulação lecitina e água), Branco CH (formulação lecitina e quitosana) e Água com etanol comparando-os com o controle água (H₂O com meio DMEM e DMSO) associadas ao ácido anacárdico (AA) em concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM por 24 horas. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (***: P < 0,001).

Na figura 25, foi observado que as AçNEs em concentração de 360 µg/mL com ou sem a adição simultânea de AA, apresentaram valores de redução de viabilidade celular similares quando comparadas ao grupo controle, reduções estas que permearam entre 56% a 64%. Nas AçNE nas concentrações de 360 µg/mL sem AA, 360 µg/mL + AA 100 µM, 360 µg/mL + AA 50 µM, 360 µg/mL + AA 25 µM houve redução de viabilidade celular, em torno de 60% à 64% valores similares foram encontrados em AçNE CH que apresentaram redução de 56% à 60%. Tendo em vista estes resultados, pode-se afirmar que ambas são estatisticamente iguais. O branco AçNE e o branco AçNE CH também demonstraram similaridade quando comparados ao grupo controle variando de 19% a 29%. Os brancos AçNE e AçNE CH quando comparados, demonstram que apesar de sutil, o branco AçNE

apresentou maior redução na viabilidade celular, possuindo a maior delas com 29%, no tratamento branco AçNE sem AA.

O óleo de açaí livre apresentou reduções na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (H₂O + ETOH) sendo elas de 28%, 14%, 20% e 24% relacionadas aos tratamentos de óleo sem AA, óleo + AA 100 µM, óleo + AA 50 µM, óleo + AA 25 µM respectivamente, pode-se compreender com os dados relatados que não ocorreu efeito de combinação com a adição de AA nos tratamentos com óleo de açaí, visto que, além de apresentar baixa redução de viabilidade celular comparada ao grupo controle, sua maior redução ocorreu na ausência do mesmo. O óleo de açaí também demonstrou reduções inferiores quando comparado as nanemulsões, alcançando, por exemplo, a diferença de 35% e 32% do óleo sem AA quando comparado as AçNE sem AA e AçNE CH sem AA respectivamente, comprovando que o óleo de açaí encapsulado apresenta melhores resultados.

O óleo de açaí livre apresentou reduções na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (H₂O + ETOH) sendo elas de 28%, 14%, 20% e 24% relacionadas aos tratamentos de óleo sem AA, óleo + AA 100 µM, óleo + AA 50 µM, óleo + AA 25 µM respectivamente, pode-se compreender com os dados relatados que não ocorreu efeito combinatório com a adição de AA nos tratamentos com óleo de açaí, visto que, além de apresentar baixa redução de viabilidade celular comparada ao grupo controle, sua maior redução ocorreu na ausência do mesmo. Estes dados demonstram que na presença do óleo, o AA tem sua atuação reduzida ou anulada. O óleo de açaí também demonstrou reduções inferiores quando comparado as nanemulsões, alcançando, por exemplo, a diferença de 35% e 32% do óleo sem AA quando comparado as AçNE sem AA e AçNE CH sem AA

respectivamente, comprovando que o óleo de açaí encapsulado apresenta melhores resultados.

Tendo em vista que os valores de redução de viabilidade celular dos tratamentos realizados com AA foram: 0%, sem AA; 72%, AA 100 μM ; 14%, AA 50 μM e 6%, AA 25 μM ; e que as A \mathcal{C} NEs 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sem AA apresentaram redução de 63% de viabilidade celular e a A \mathcal{C} NE CH 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sem AA de 60% e que as A \mathcal{C} NEs 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + AA 100 μM apresentaram redução de 60% de viabilidade celular e a A \mathcal{C} NE CH 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + AA 100 μM também de 60%, pode-se inferir que, os tratamentos realizados com as A \mathcal{C} NEs juntamente com as concentrações de AA estabelecidas não apresentaram efeito combinatório entre elas, isto porque, as A \mathcal{C} NEs mesmo sem adição de AA, apresentaram significativa redução de viabilidade celular. Ademais, o grupo de AA que apresentou maior redução de viabilidade celular com 72%, não gerou efeito de combinação nas A \mathcal{C} NEs e A \mathcal{C} NE CH que apresentaram redução de viabilidade celular de 60% e 56% respectivamente. A mesma interpretação emprega-se aos brancos, visto que, suas maiores reduções de viabilidade celular – Branco 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sem AA 29% e Branco CH 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sem AA 20% - ocorreram na ausência de AA, e com a adição de 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + AA 100 μM seus valores não sofreram grandes variações, sendo encontrados 21% e 16% para Branco e Branco CH, respectivamente. Evidenciando desta maneira que, os componentes presentes nas nanoformulações inteterferem na atuação do AA, de modo a reduzir seu efeito.

Como dito anteriormente, foram definidas a utilização de duas concentrações de A \mathcal{C} NEs (360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para analisar o efeito combinatório com a adição de AA às nanoformulações, desta forma, as análises seguiram também em concentração de 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 26).

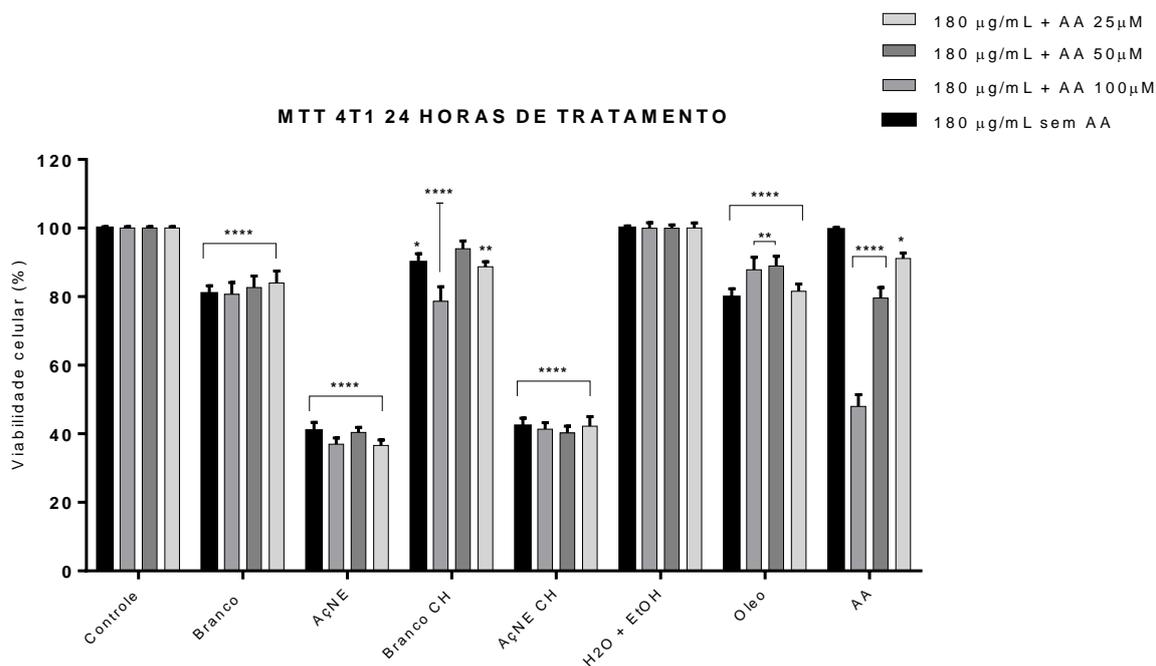


Figura 26. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) submetidas a concentração 180 µg/mL de AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), óleo de açaí e seus respectivos brancos, Branco (formulação lecitina e água), Branco CH (formulação lecitina e quitosana) e Água com etanol comparando-os com o controle água (H₂O com meio DMEM e DMSO) associadas ao ácido anacárdico (AA) em concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM por 24 horas. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (***: P < 0,001).

Neste ensaio, foi observado que as AçNEs em concentração de 180 µg/mL apresentaram redução de viabilidade celular similares em todas as concentrações testadas de AA quando comparadas ao grupo controle, reduções estas que permearam entre 58% à 64%. No entanto, a AçNE nas concentrações de 180 µg/mL sem AA, 180 µg/mL + AA 100 µM, 180 µg/mL + AA 25 µM apresentaram maior redução de viabilidade celular, em torno de 60% à 64% quando comparadas as AçNE CH que apresentaram redução de 58% à 59%, sendo que as AçNEs apresentaram valores iguais na redução de viabilidade celular de 60% apenas nas concentrações de 180 µg/mL + AA 50 µM. O Branco e o Branco CH também demonstraram similaridade quando comparados ao grupo controle variando de 12% à 22% demonstrando baixa redução de viabilidade celular.

Tendo em vista que os valores de redução de viabilidade celular dos tratamentos realizados com AA foram: 52%, AA 100 μM ; 21%, AA 50 μM e 9%, AA 25 μM ; e que as A \mathcal{C} NEs 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sem AA apresentaram redução de 60% de viabilidade celular e a A \mathcal{C} NE CH 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sem AA de 58% e que as A \mathcal{C} NEs 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + AA 100 μM apresentaram redução de 64% de viabilidade celular e a A \mathcal{C} NE CH 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + AA 100 μM de 59%, pode-se compreender que igualmente ao MTT de 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, os tratamentos realizados com as A \mathcal{C} NEs juntamente com as concentrações de AA estabelecidas não apresentaram sinergismo entre elas, isto porque, as A \mathcal{C} NEs mesmo sem adição de AA, apresentaram significativa redução de viabilidade celular, além disto, o grupo de AA que apresentou maior redução de viabilidade celular com 52% (AA 100 μM), não gerou efeito sinérgico significativo nas A \mathcal{C} NEs e A \mathcal{C} NE CH que apresentaram redução de viabilidade celular de 64% e 59%, respectivamente.

O óleo de açaí livre apresentou reduções na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (H_2O + ETOH) sendo elas de 21%, 13%, 11% e 19% relacionadas aos tratamentos de óleo sem AA, óleo + AA 100 μM , óleo + AA 50 μM , óleo + AA 25 μM respectivamente, neste contexto pode-se observar que assim como no MTT de concentração de 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não ocorreu efeito combinatório com a adição de AA nos tratamentos com óleo de açaí livre, visto que, além de apresentar baixa redução de viabilidade celular comparada ao grupo controle, sua maior redução ocorreu na ausência do mesmo. Além disto, o óleo de açaí confirmando os dados do MTT 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrou reduções inferiores quando comparado as nanemulsões, alcançando, por exemplo, a diferença de 39% e 37% do óleo sem AA quando comparado as A \mathcal{C} NE sem AA e A \mathcal{C} NE CH sem AA respectivamente, mostrando que o óleo de açaí encapsulado resulta em melhores

efeitos. O Branco e o Branco CH quando comparados, de forma geral, resultaram na redução de viabilidade celular com valores menores que 20%, sendo assim, não são diferentes entre si estatisticamente.

Estudos evidenciam que o óleo de açaí livre, quando associado ao AA demonstra efeito combinatório não específico em células HaCaT (células de queratinócitos humanos) e A431 (câncer de pele não-melanoma) na redução de viabilidade celular após tratamento de 24 horas em diversas concentrações analisadas (Araújo, 2017).

Após adquiridos os resultados dos ensaios de 360 µg/mL e 180 µg/mL, conclui-se que os mesmos apresentam similaridade em todas as concentrações dos tratamentos realizados, e o efeito combinatório do AA associado às nanoemulsões a base de óleo de açaí não foi alcançado. Sendo assim, sugeriu-se a hipótese de que os componentes presentes nas nanoformulações estariam reduzindo o efeito do AA. Como alternativa foi estabelecido o tratamento seriado, neste, cada amostra foi utilizada separadamente, ou seja, após o plaqueamento, as células foram tratadas inicialmente com as AÇNEs pelo período de 24 horas e posteriormente foi retirada as nanoformulações e em seguida as células foram tratadas com o AA durante o mesmo período, 24 horas. Desta maneira as células foram sensibilizadas primeiramente com as AÇNEs e somente depois entraram em contato com AA de forma isolada, contornando a redução de ação por contato simultâneo das mesmas. Uma vez que os resultados entre as concentrações 360 µg/mL e 180 µg/mL apresentaram valores semelhantes, foi definida a aplicação apenas das nanoemulsões e seus brancos em concentração de 180 µg/mL visto que, o uso de menor quantidade de amostra pode refletir em um menor custo de tratamento no futuro.

13.4 Tratamento seriado das nanoemulsões à base de óleo de açaí e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

No ensaio de viabilidade celular utilizando-se o tratamento seriado, as AçNE, AçNE CH e seus respectivos brancos foram testados na concentração de 180 µg/mL com diferentes concentrações de AA (concentrações de 100 µM, 50 µM e 25 µM) em células 4T1. Este tratamento foi realizado em duas etapas: o primeiro tratamento consistiu na adição das AçNEs e seus Brancos. Após 24 horas, as AçNEs foram removidas e adicionou-se o AA em concentrações já estabelecidas nos MTTs anteriores (Figura 27) por mais 24 horas, com objetivo de verificar quais tratamentos com AçNEs e Brancos associados com AA em forma seriada apresentou melhores reduções de viabilidade celular para possíveis efeitos sinérgicos dos mesmos. Foi utilizado como controle DMEM com água ultrapura (H₂O) e DMSO, representando 100% da viabilidade.

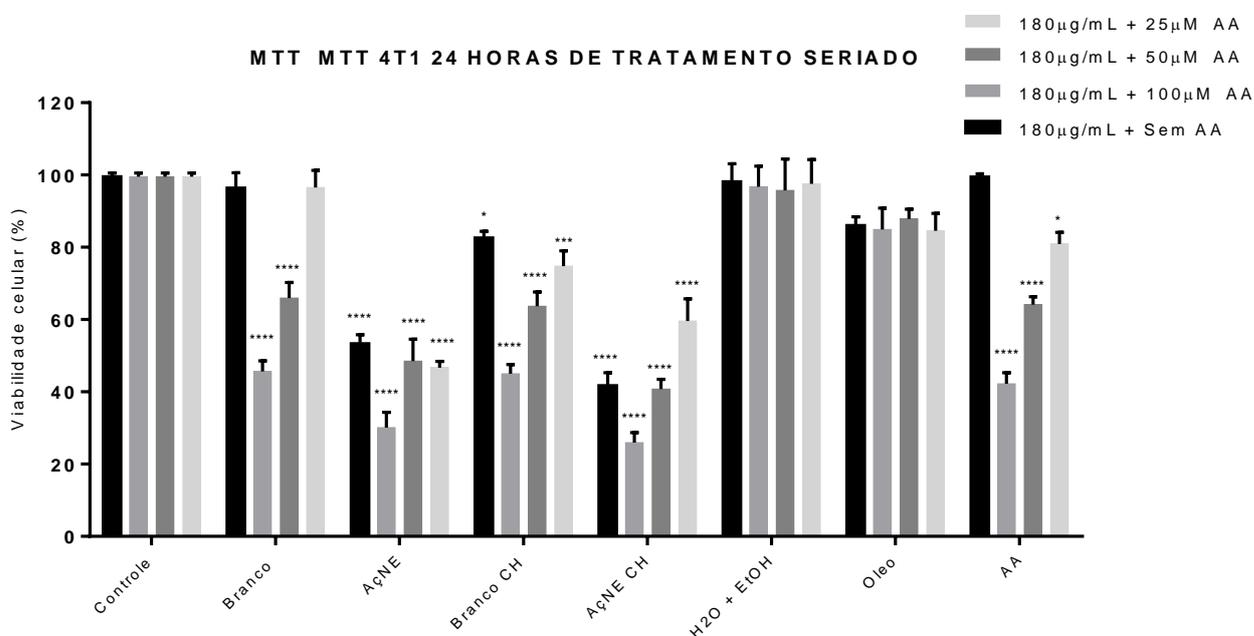


Figura 27. Ensaio de viabilidade celular (MTT) seriado em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) submetidas a concentração de 180 µg/mL AçNE + AA. AçNE (nanoemulsão a base de óleo de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), óleo livre e seus respectivos brancos, Branco (formulação lecitina e água), Branco CH (formulação lecitina e quitosana) e Água com etanol comparando-os com o controle água (H₂O com meio DMEM e DMSO) associadas ao ácido

anacárdico (AA) em concentrações de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M por 24 horas. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (***: $P < 0,001$).

No ensaio seriado de MTT com tratamento seriado (Figura 27), foram utilizadas nanemuções em concentração de 180 μ g/mL no qual apresentaram significativa redução de viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle, sendo a maior redução da AçNE CH com redução de 75%. A AçNE CH apresentou valores de redução de: 59%, 75%, 60% e 45% nas concentrações de 180 μ g/mL sem AA, 180 μ g/mL + AA 100 μ M, 180 μ g/mL + AA 50 μ M, 180 μ g/mL + AA 25 μ M, e a AçNE de 47%, 70%, 52% e 54% em concentrações de 180 μ g/mL sem AA, 180 μ g/mL + AA 100 μ M, 180 μ g/mL + AA 50 μ M, 180 μ g/mL + AA 25 μ M, respectivamente. De acordo com estes resultados, pode-se observar que ambas as nanoformulações AçNE e AçNE CH, em todas as concentrações, não apresentaram diferenças entre si estatisticamente. Os resultados encontrados do AA foram de: 1%, sem AA; 58%, AA 100 μ M; 36%, AA 50 μ M e 20%, AA 25 μ M. O efeito combinatório pode ser analisado quando as AçNE entram em contato com o AA 100 μ M. Esta afirmativa pode ser observada quando a AçNE 180 μ g/mL sem AA apresenta redução de 47%, porém, quando associada ao AA 100 μ M sua redução aumenta significativamente para 70%, o mesmo ocorreu com a AçNE CH 180 μ g/mL sem AA que apresentou redução de 59% e quando em contato com AA 100 μ M sua redução de viabilidade celular alcançou 75%. No entanto o efeito combinatório não pôde ser encontrado nas AçNE 180 μ g/mL com concentrações de AA 25 μ M e AA 50 μ M, uma vez que, a AçNE isolada, ou seja, sem a presença de AA, apresentou redução de viabilidade celular de 47%, e com a adição os valores encontrados foram de 52% em AA 50 μ M e 54% em AA 25 μ M. O mesmo ocorreu com o Branco CH, no qual apresentou redução de viabilidade celular de 59%, e

com a adição de AA os valores encontrados foram de 60% e 41% para concentrações de AA 50 μ M e AA 25 μ M, respectivamente.

No Branco CH encontramos os valores de redução de viabilidade 18%, 56%, 37% e 26% em concentrações de 180 μ g/mL sem AA, 180 μ g/mL + AA 100 μ M, 180 μ g/mL + AA 50 μ M, 180 μ g/mL + AA 25 μ M e no Branco os resultados de 4%, 55%, 35% e 4% em concentrações de 180 μ g/mL sem AA, 180 μ g/mL + AA 100 μ M, 180 μ g/mL + AA 50 μ M, 180 μ g/mL + AA 25 μ M, respectivamente. De acordo com esta análise, compreende-se que o Branco CH possui maior citotoxicidade quando comparado ao Branco, visto que quando comparados os valores de ambos em concentração de 180 μ g/mL sem AA, o Branco CH demonstra uma redução de viabilidade celular de 14%, conferindo esta citotoxicidade provavelmente a CH. Resultados obtidos nos brancos em concentrações de 180 μ g/mL + AA 100 μ M, 180 μ g/mL + AA 50 μ M não apresentaram diferenças entre si estatisticamente, porém, nota-se que a adição de AA nos mesmos aumentou significativamente a redução de viabilidade celular sendo elas em Branco 180 μ g/mL de 4% para 55 e 35%; Branco CH de 18% para 56% e 37%. O Branco 180 μ g/mL não apresentou alteração em sua redução de viabilidade celular quando adicionado a concentração de AA 25 μ M, permanecendo com o mesmo valor encontrado em Branco 180 μ g/mL sem AA de 4%, já o Branco CH aumentou sua redução para 26% quando comparado ao Branco CH 180 μ g/mL sem AA de 18%. Embora a concentração de AA 50 μ M tenha demonstrado redução na viabilidade celular em contato com os Brancos, ainda assim, a maior delas só foi observada em Branco e Branco CH em concentração de 180 μ g/mL + AA 100 μ M, sugerindo que o AA em baixas concentrações não induz a redução de viabilidade celular como a de maior concentração. E por fim o óleo de açaí, no qual demonstra de forma significativa

que o mesmo nanoestruturado possui maior redução na viabilidade celular, visto que, apresentou 14% de redução sem o AA, enquanto as AÇNE e AÇNE CH apresentaram redução sem AA de 47% e 59% respectivamente. Não foi encontrado efeito combinatório estatisticamente significativo entre o AA e as concentrações de óleo de açaí.

Em experimentos realizados em Araujo (2017), a viabilidade celular analisada em ensaios de MTT, demonstrou que no período de 24 horas as nanoformulações a base de óleo de açaí associada ao AA reduziu o potencial citotóxico em linhagens de câncer não melanoma humano (A431) e também em queratinócitos humanos (HaCaT).

Conforme os dados apresentados, e em comparação aos ensaios anteriores de MTT apresentados neste trabalho, pode-se afirmar que, o tratamento seriado apresentou uma boa alternativa quando relacionado ao efeito combinatório das AÇNEs e seus brancos associados ao AA, principalmente em concentração de 180 µg/mL + AA 100 µM. Apesar da AÇNE e AÇNE CH possuírem valores similares na redução de viabilidade celular, o Branco CH reduziu a viabilidade em 14% à mais quando comparado ao Branco, desta forma, foi definido o uso da nanoformulação de AÇNE e seu branco para o ensaio subsequente, além de apresentar custo mais vantajoso e protocolo de formulação mais simples. Juntamente a nanoemulsão de AÇNE em 180 µg/mL, as concentrações de AA que foram definidas foram a de AA 100 µM e AA 50 µM, a na primeira observou-se efeito combinatório e a segunda ação com menos potencial de redução de viabilidade celular.

13.5 Citometria de fluxo (FACS) aplicada ao tratamento seriado com AçNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

O ensaio de citometria de fluxo foi utilizado para determinação dos mecanismos de ação das AçNE, AçNE + AA 50 μ M, AçNE + AA 100 μ M, AA 50 μ M e AA 100 μ M e o branco será empregado como controle, em concentração de 180 μ g/mL em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1. Somado a estas informações, esta técnica também possibilita a determinação da morfologia celular conforme o tamanho (FSC-H) e também sua granulosidade (SSC-H).

Os *Dot plot* representado nas figuras 29 e 30, representam a morfologia das células após tratamento seriado com Branco, AçNE, AçNE + AA 50 μ M, AçNE + AA 100 μ M, AA 50 μ M e AA 100 μ M em concentração de 180 μ g/mL. As células do grupo controle foram utilizadas como referência para dividir os *Dot plot* em quatro quadrantes. Todos dos *Dot plots* relacionados aos tratamentos foram avaliados neste mesmo padrão de quadrantes e foram representados em gráficos posteriormente (Figuras 29 e 30).

O AA 100 μ M e AçNE + AA 100 μ M apresentaram uma diminuição significativa no tamanho celular, em contrapartida apenas o AçNE + AA 50 μ M aumentou de forma significativa a granulosidade das células.

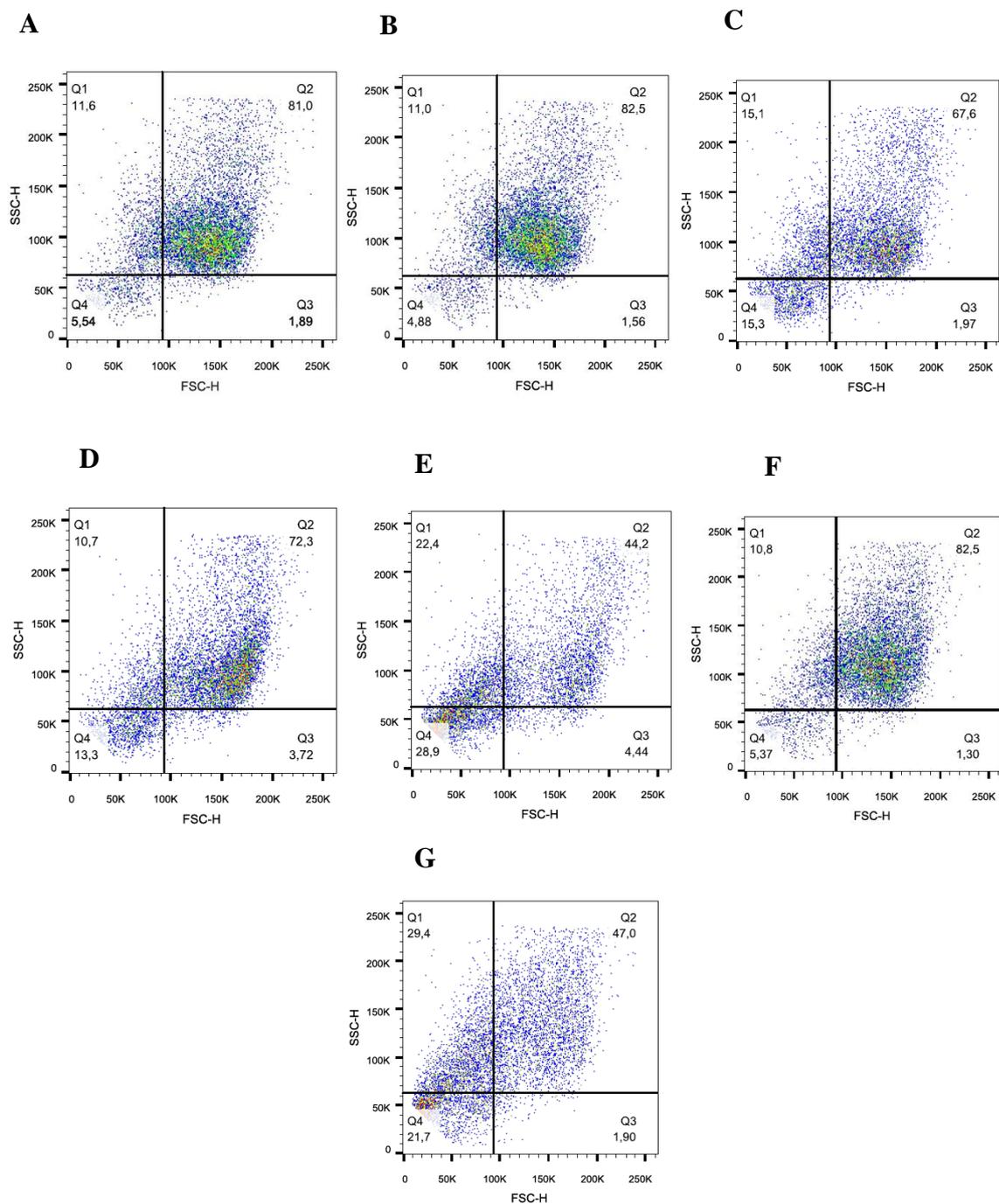


Figura 28. Dot plot de morfologia das células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (4T1). Por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com os controles água ultrapura (A), Branco (B), AçNE 180 µg/mL (C), AA 50 µM (D), AA 100 µM (E), AçNE 180 µg/mL + AA 50 µM (F) e AçNE 180 µg/mL + AA 100 µM (G).

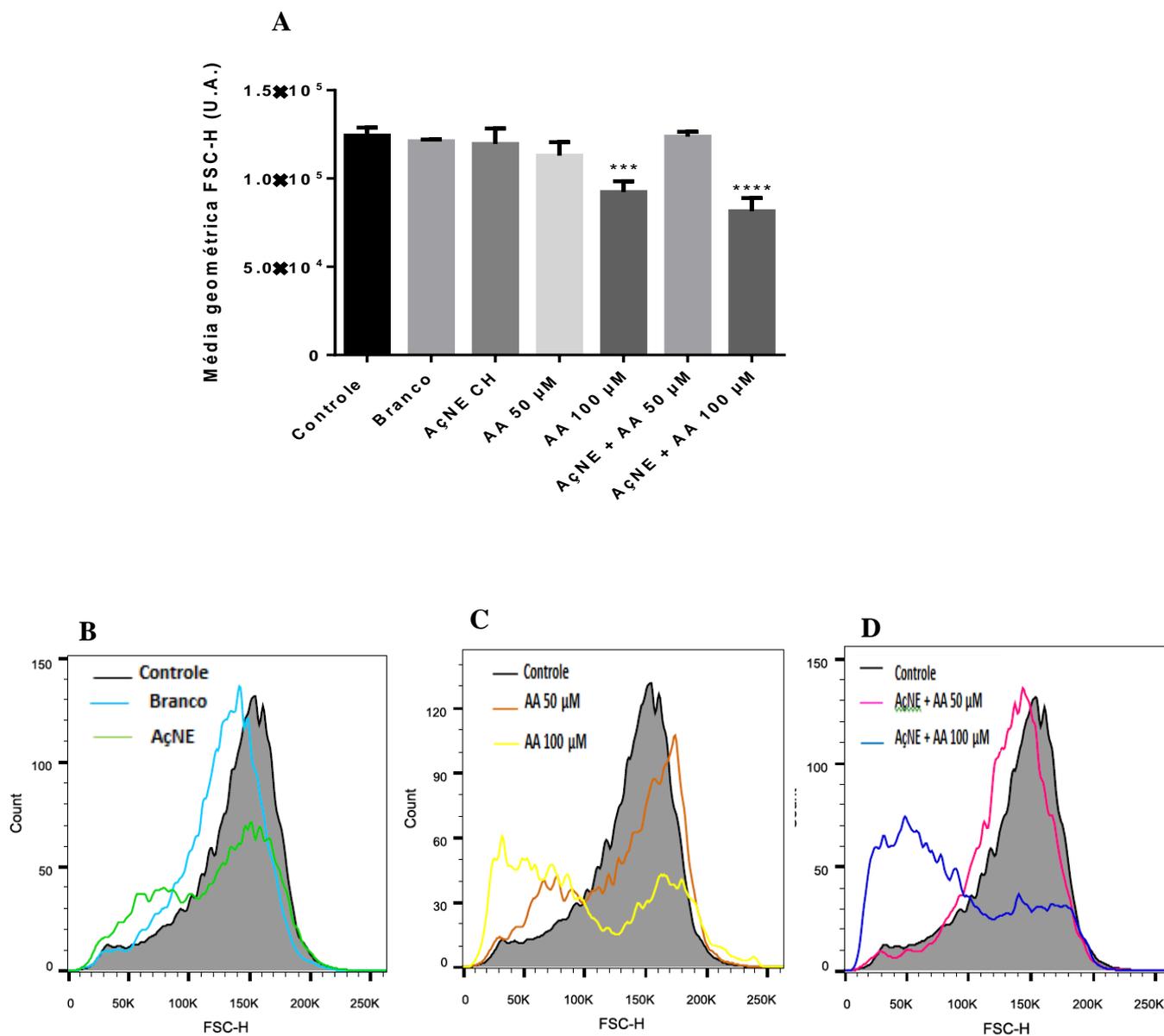


Figura 29. Avaliação de parâmetros morfológicos de tamanho FSC a partir da média geométrica da suspensão de células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (4T1) por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com Branco, AçNE na concentração de 180 µg/mL; AA nas concentrações de 50 µM e 100 µM; AçNE + AA 50 µM; e AçNE + AA 100 µM. A água com DMSO (< 1%) foram utilizados como controle negativo. Diferença significativa quando comparado com o controle pelo teste ANOVA one-way com post-teste Tukey * $p < 0,05$ - *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

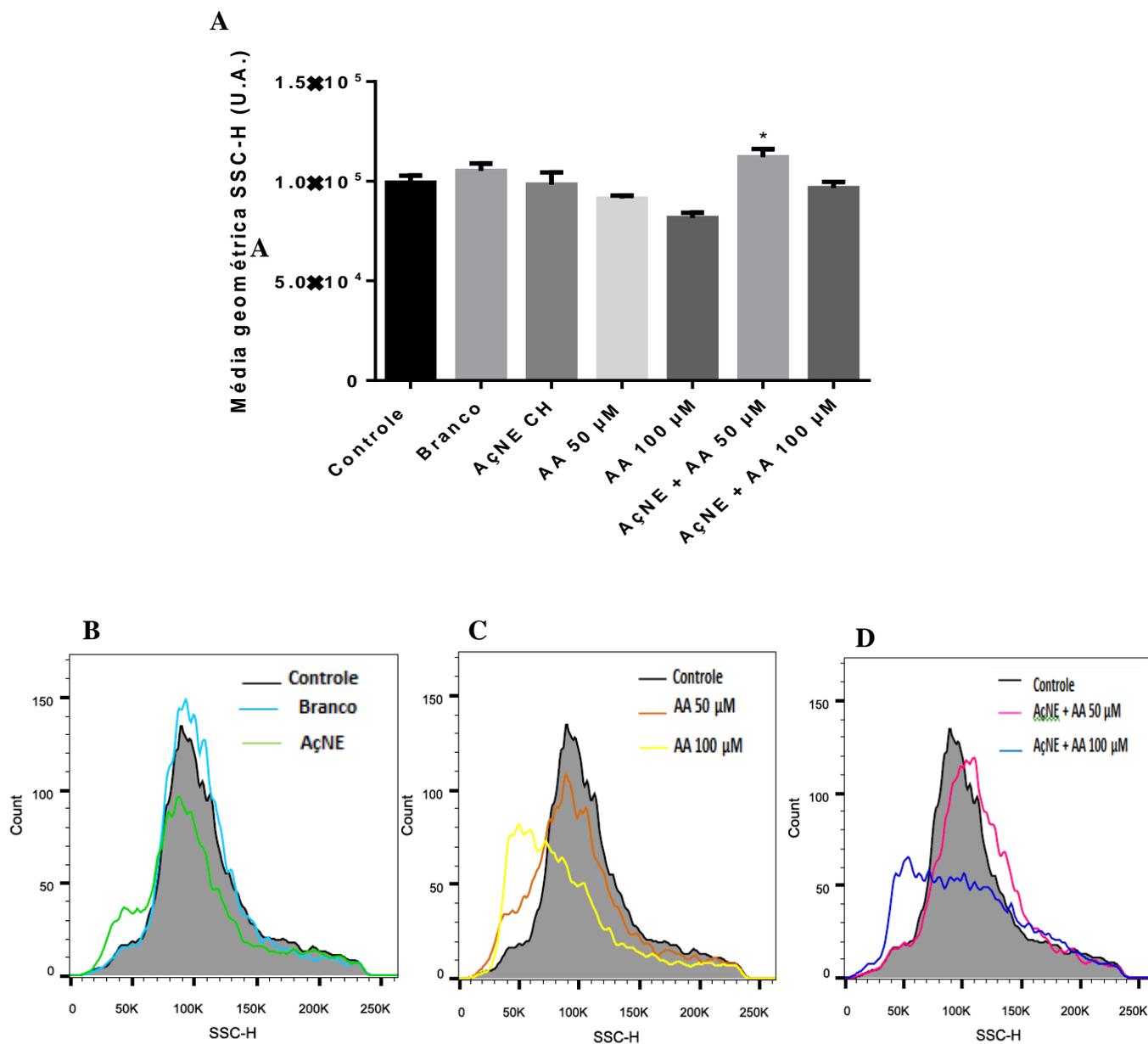


Figura 30. Avaliação de parâmetros morfológicos de tamanho SSC-H a partir da média geométrica da suspensão de células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (4T1) por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com Branco, AçNE na concentração de 180 µg/mL; AA nas concentrações de 50 µM e 100 µM; AçNE + AA 50 µM; e AçNE + AA 100 µM. A água com DMSO (< 1%) foram utilizados como controle negativo. Diferença significativa quando comparado com o controle pelo teste ANOVA one-way com post-teste Tukey * $p < 0,05$ - *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

13.6 Potencial de membrana mitocondrial aplicada ao tratamento seriado em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

Para a realização do ensaio de potencial de membrana mitocondrial as células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 foram tratadas em formato seriado com Branco, AçNE, AçNE + AA 50 μM , AA 100 μM , AA 50 μM e AA 100 μM AçNE concentração de 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtendo assim os resultados de potencial de membrana mitocondrial.

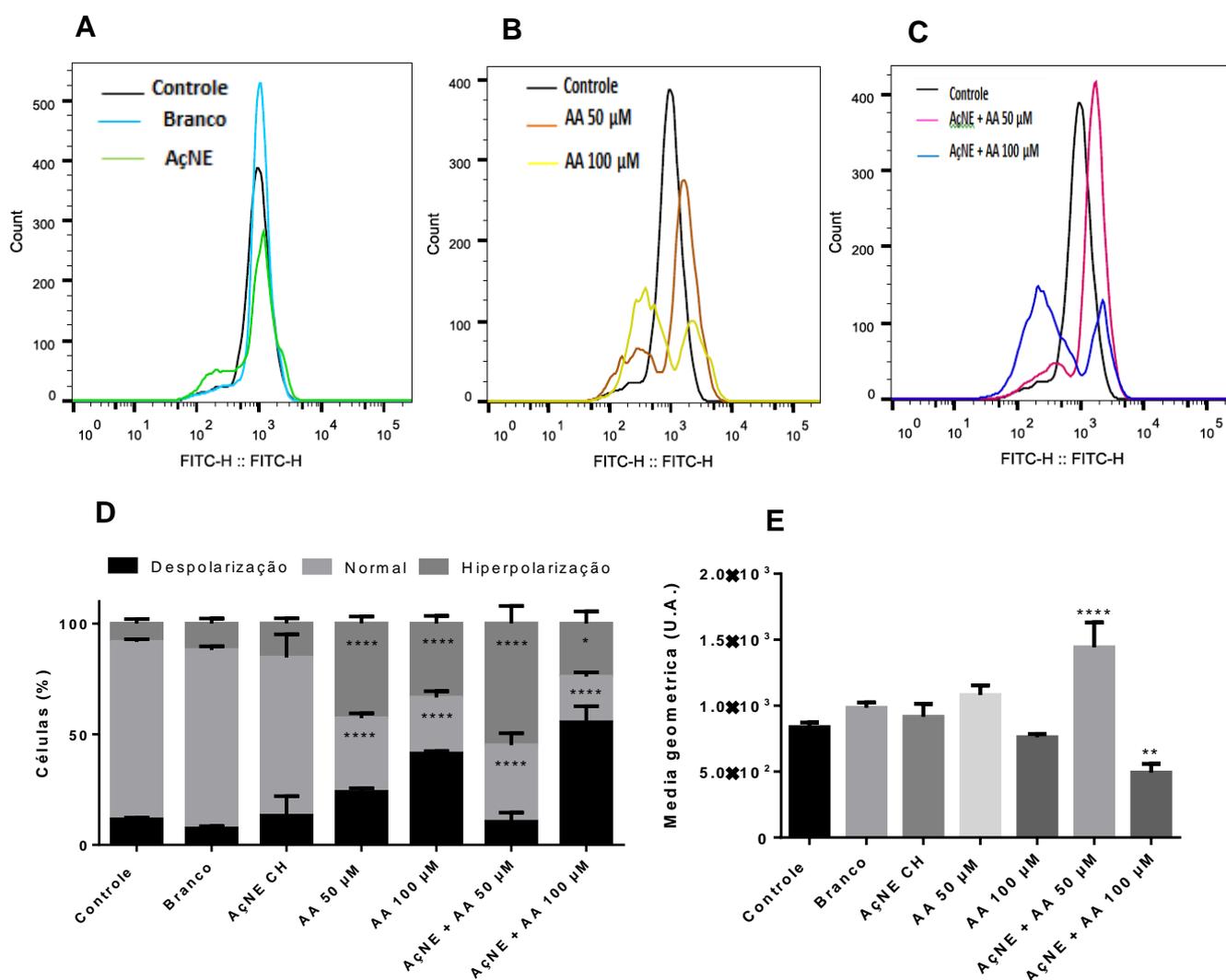


Figura 31. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) avaliado por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição das células de carcinoma mamário murino 4T1 à AçNE e Branco (A), AA 50 μM e 100 μM (B) e AçNE + AA 50 μM , AçNE + AA 100 μM (C) comparados com o controle. Representação gráfica dos histogramas com a porcentagem de células com despolarização,

potencial normal e hiperpolarização da membrana mitocondrial **(D)**. Representação do $\Delta\psi_m$ a partir da média geométrica após os diferentes tratamentos **(E)**. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$).

Estudos realizados evidenciam que a nanoemulsão a base de óleo de açaí quando associada ao AA não induziram lesão de membrana plasmática e também não alteraram a proliferação celular além de não aumentar o índice na taxa de fragmentação de DNA. Entretanto, esta associação possibilitou o aumento da proporção de células em fase G1 e juntamente a este resultado, aumentou o potencial de membrana mitocôndria (PMM) posteriormente ao período de 24 horas de exposição celular ao tratamento de concentração de 90 μ g de AçNE com 125 μ M de ácido anacárdico (ARAÚJO, 2017)

De acordo com os dados encontrados no presente estudo (Figura 31), pode-se compreender que, a AçNE e seu Branco em concentração de 180 μ g/mL não apresentaram alterações significativas na análise de potencial de membrana mitocondrial (PMM). Juntamente a estes dados, o AA testado em ambas as concentrações (AA 50 μ M e 100 μ M) da mesma forma que a nanoemulsão e seu branco, não apresentaram alterações no valor do PMM das células 4T1 quando analisado a média geométrica (D). Em contrapartida, nota-se no histograma B (Figura 31) que ambas as amostras avaliadas apresentaram 2 picos representativos e 2 populações celulares com deslocamento para a esquerda e para direita, respectivamente em comparação ao grupo controle. Estes dados relatados sugerem que uma parte das células avaliadas demonstrou despolarização da membrana mitocondrial, enquanto a outra parte apresentou hiperpolarização respectivamente. Após as células serem expostas a AçNE + AA 50 μ M, observa-se um aumento significativo do PMM, o que sugere uma hiperpolarização da membrana mitocondrial. No entanto, a AçNE + AA 100 μ M

demonstrou uma diminuição de PMM, podendo sugerir uma despolarização da membrana mitocondrial. Os resultados encontrados mostram que conforme a concentração de AA utilizado, a amostra apresentou efeito distinto no PMM (Figura 31).

Os dados adquiridos nesta avaliação mostram que o pré-tratamento das células 4T1 com AçNE antes da sua incubação por 24 horas com AA apresentou maior citotoxicidade quando comparado com o AçNE e AA incubados separadamente.

13.7 Exposição a fosfatidilserina após tratamento seriado com AçNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

Neste ensaio as células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 foram tratadas em formato seriado com AçNE, AçNE + AA 50 μ M e AA 50 μ M concentração de 180 μ g/mL. Em seguida as células foram marcadas pelo marcador de apoptose (Anexina V-FITC) e com o Iodeto de Propídeo (IP). Estas marcações foram realizadas com intuito de analisar o perfil de morte das células 4T1 posteriormente a sua exposição ao tratamento seriado. Os parâmetros utilizados para a citometria foram regulados através de dois grupos de células 4T1 sendo elas expostas pelo período de 24 horas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Um grupo foi marcado unicamente com Anexina V - FITC e o outro unicamente com IP. Na figura 32 foram realizados os ajustes dos parâmetros para detecção dos marcadores, o eixo “x” refere-se à marcação por Anexina V (FITC-H: FITC-H) e o eixo “Y” refere-se à marcação por iodeto de propídio (PerCP-H: PerCP-H); na figura 33 podemos analisar as marcações nos controles e amostras avaliadas. Cada um dos gráficos denominados *Dot plot* são divididos em quatro quadrantes, sendo que, o Quadrante 1 (Q1) tem como objetivo indicar as células que foram marcadas unicamente com

IP (células em necrose), o Quadrante 2 (Q2) por sua vez, representa as células 4T1 que possuem dupla marcação, tanto com a Anexina V-FITC quanto por IP (células em apoptose ou apoptose tardia), o Quadrante 3 (Q3) apresenta as células marcadas unicamente com Anexina V-FITC (células em apoptose) e, por fim, o Quadrante 4 (Q4) apresenta as células 4T1 que não foram marcadas com nenhum dos dois marcadores (células vivas). Todos dos *Dot plots* relacionados aos tratamentos foram avaliados neste mesmo padrão de quadrantes e foram representados em gráficos posteriormente (Figura 34).

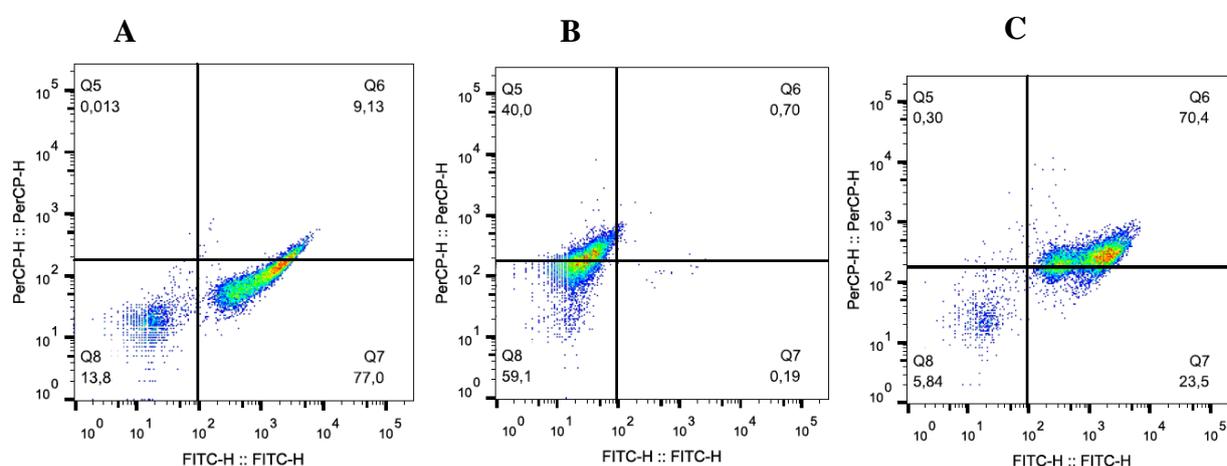


Figura 32. *Dot plot* dos ajustes dos parâmetros para a detecção dos marcadores. Após o tratamento das células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a marcação apenas com Anexina-V-FITC (A), apenas com Iodeto de Propídeo (PI) (B) e com ambas as marcações (C).

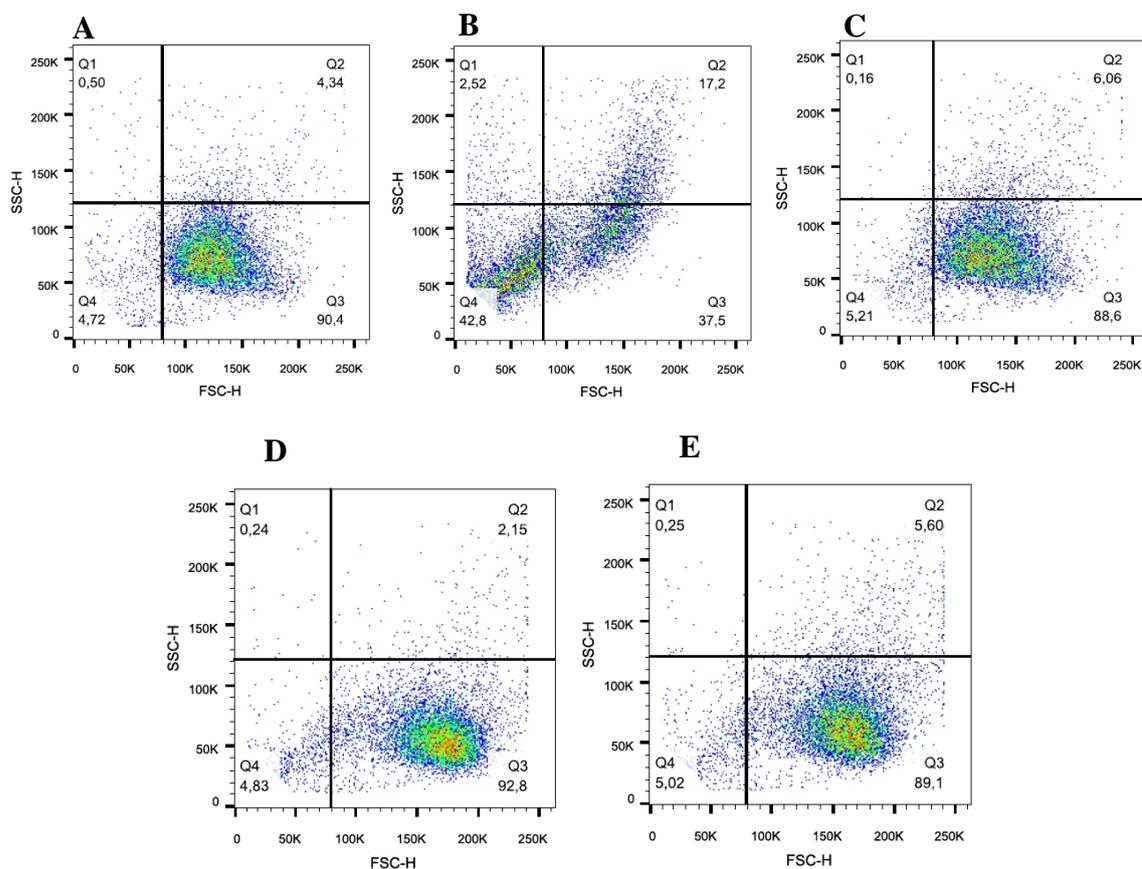


Figura 33. Dot plot de morfologia das células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (4T1) por Citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com os controles água ultrapura (A) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (B) e as diferentes amostras Branco (C), AçNE + AA 50 µM (D) e AA 50 µM (E).

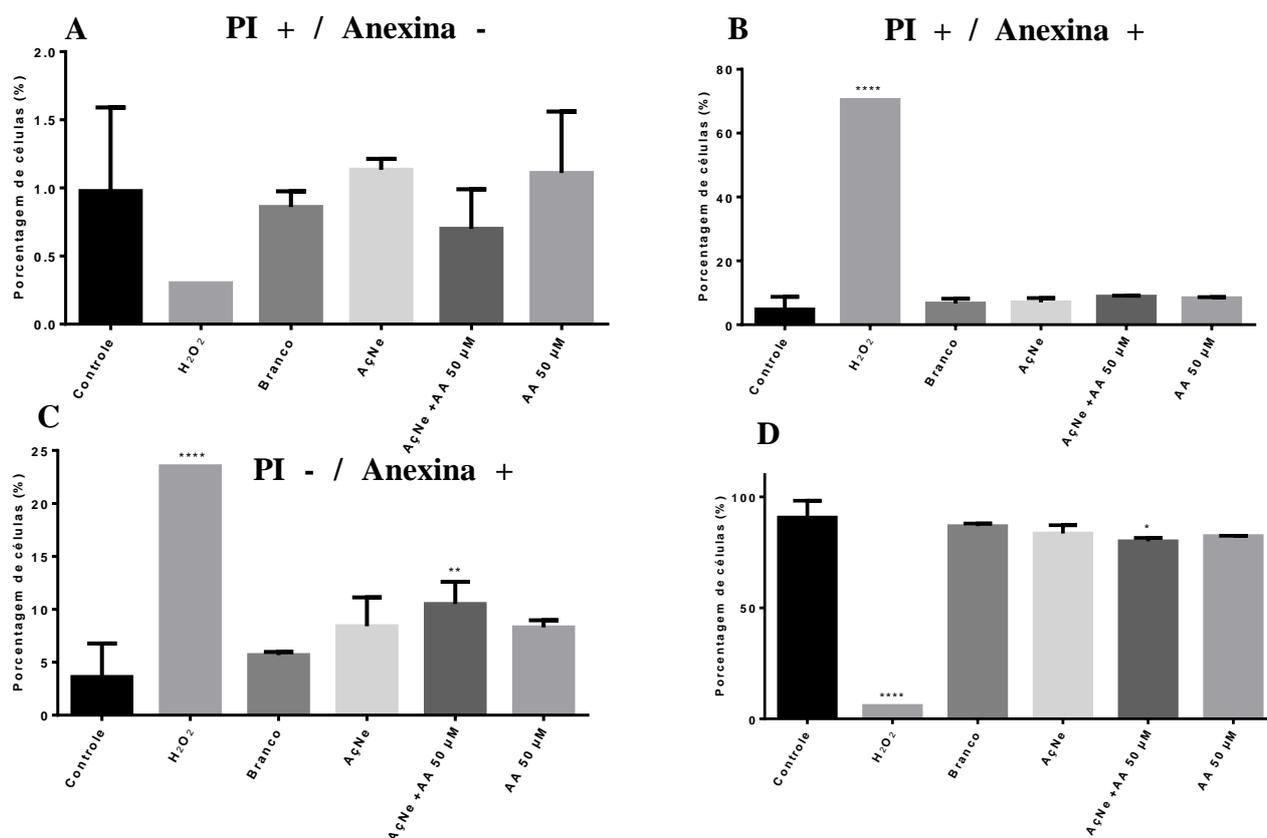


Figura 34. Avaliação do perfil de exposição de fosfatidilserina de células da linhagem de adenocarcinoma mamário murino (4T1) através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após o Branco, AçNE, AçNE + AA 50 µM AA 50 µM. Os gráficos representam: células com lesão de membrana, possível necrose (PI + / Anexina -) (A); células em estágio de apoptose tardia ou necrose (PI + / Anexina +) (B); células em estágios iniciais de apoptose (PI - / Anexina +) (C) e células viáveis (PI - / Anexina -) (D). A água ultrapura (H₂O) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram utilizados como controles. Diferença significativa quando comparado com controle (****: P<0,0001).

Conforme os dados apresentados na figura 34, pode-se inferir que, somente as células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 que foram expostas a AçNE + AA apresentaram um aumento significativo na marcação de Anexina V-FITC. Este aumento foi apenas de aproximadamente 10%, no entanto é capaz demonstrar a tendência do potencial de indução de apoptose desta amostra após o período de 24 horas de exposição. Tais resultados de AçNE + AA se assemelham a Araújo (2017) apenas na dupla marcação indicando morte por apoptose após o período de 24 horas exposição celular ao tratamento seriado. Ao contrário da Anexina V-FITC, o PI não apresentou marcação significativa assim como a dupla marcação.

Os experimentos de exposição à fosfatidilserina, após tratamento seriado com AÇNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 deverão ser repetidos para confirmar esta tendência à apoptose e incluindo a concentração de AA 100 μM .

13.8 Avaliação do número total de células após tratamento seriado com AÇNE e AA em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

Após 24 horas de exposição ao tratamento seriado com AÇNE, AÇNE + AA 50 μM , AÇNE + AA 100 μM , AA 50 μM e AA 100 μM AÇNE, as células foram contadas (Figura 35), tripsinizadas e suspensas em Azul de Tripán (0,4%, p/v) para contagem das mesmas, Esta contagem foi realizada em microscópio óptico e em triplicata.

Os resultados encontrados mostram que ocorreu uma diminuição significativa do número total das células 4T1 em AA 100 μM com 46% e com o AÇNE + AA 100 μM com 67%, visualizadas através do ensaio com Azul de Tripán posteriormente ao tratamento, como pode-se observar na figura 35. Somado a isto, pode-se observar uma tendência na diminuição do número de células 4T1 após a exposição ao AÇNE + AA 50 μM com 24%, entretanto, não significativo. Estes resultados mostram que o AA em concentração de 100 μM reduz significativamente a quantidade de células e possui efeito combinatório, visto que, apresenta redução ainda maior quando associado a nanoemulsão AÇNE 180 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 35).

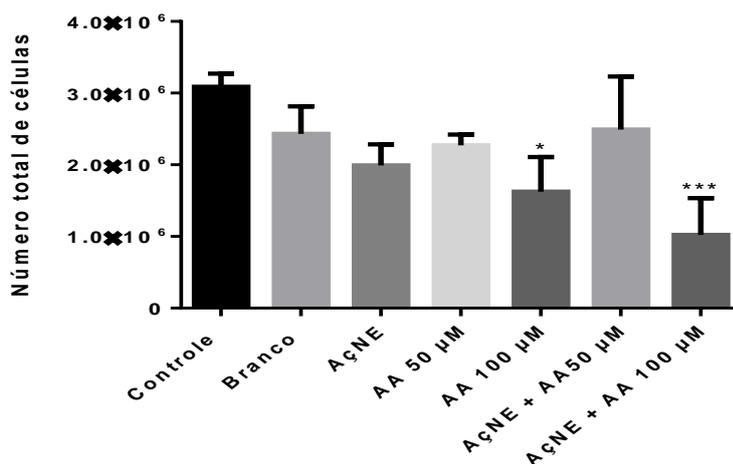


Figura 35. Avaliação por Azul de tripan do número total de células. Adenocarcinoma mamário murino (4T1) após exposição por 24 horas o Branco, AçNE, AçNE +AA 50 µM AçNE +AA 100 µM e AA 50 µM e AA 100 µM e ao controle com água ultrapura (H₂O). Contagem das células em câmara de Neubauer. Valores representados pelos gráficos com intervalo de 95% de confiança. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (*: P<0,05 e ***: P < 0,001).

13.9 Avaliação da integridade de membrana após tratamento seriado em células de adenocarcinoma mamário murino (4T1)

Após 24 horas de exposição ao tratamento em formato seriado com Branco, AçNE, AçNE + AA 50 µM , AçNE + AA 100 µM, AA 50 µM e AA 100 µM AçNE concentração de 180µg/mL, apenas o AçNE + AA 100 µM apresentou um aumento significativo de 43% no número de células (Figura 36) com lesão de membrana. Em contrapartida, tratamentos com AA 100 µM e o AçNE + AA 50 µM apresentaram tendência de aumento da proporção de células com lesão de membrana representando valores de 25% e 20%, respectivamente. Contudo estes valores não foram estatisticamente significativos.

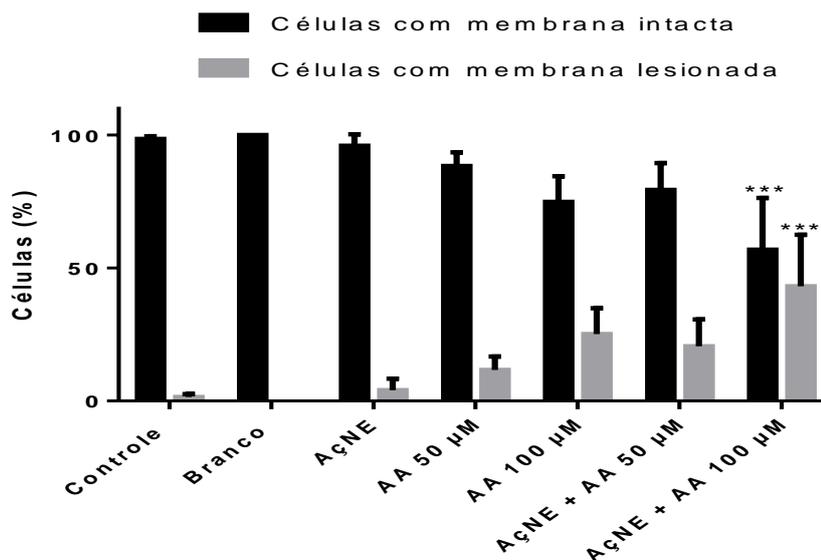


Figura 36. Porcentagem de células de carcinoma mamário murino (4T1) com e sem lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas o Branco, AçNE, AçNE +AA 50 µM AçNE +AA 100 µM e AA 50 µM e AA 100 µM e ao controle água ultrapura (H₂O). Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (***: P < 0,001).

13.10 Ensaio de migração celular

O presente ensaio *in vitro* teve como principal objetivo avaliar o efeito do tratamento seriado com Branco, AçNE, AçNE + AA 50 µM, AçNE + AA 100 µM, AA 50 µM e AA 100 µM AçNE concentração de 180µg/mL na migração em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1, para isto, utilizou-se o ensaio de *wound healing*. Neste experimento é avaliado o efeito das nanoemulsões e seus brancos, associados ou não ao AA em concentrações de 50 µM e 100 µM, observando capacidade de fechamento do *scratch* realizada na monocamada celular ao longo do tempo; sendo eles 0h (dia do *scratch*), 24h (tratamento 01) e 48h (tratamento 02). Foi utilizado para controle, DMEM sem soro fetal e água ultrapura. Em anexo 1 e 2, estão representados os valores encontrados em relação de redução e expansão do *scratch*, avaliando o mesmo por mm² em cada tratamento.

Todas as fotomicrografias foram realizadas em microscópio óptico Leica com software Leica Application Suite Version 3.0 tomadas em vários pontos de tempo (0, 24, 48 horas), em seus respectivos tratamentos (Figuras 37 e 39), e suas medições foram representadas em gráficos posteriormente (Figuras 38 e 40).

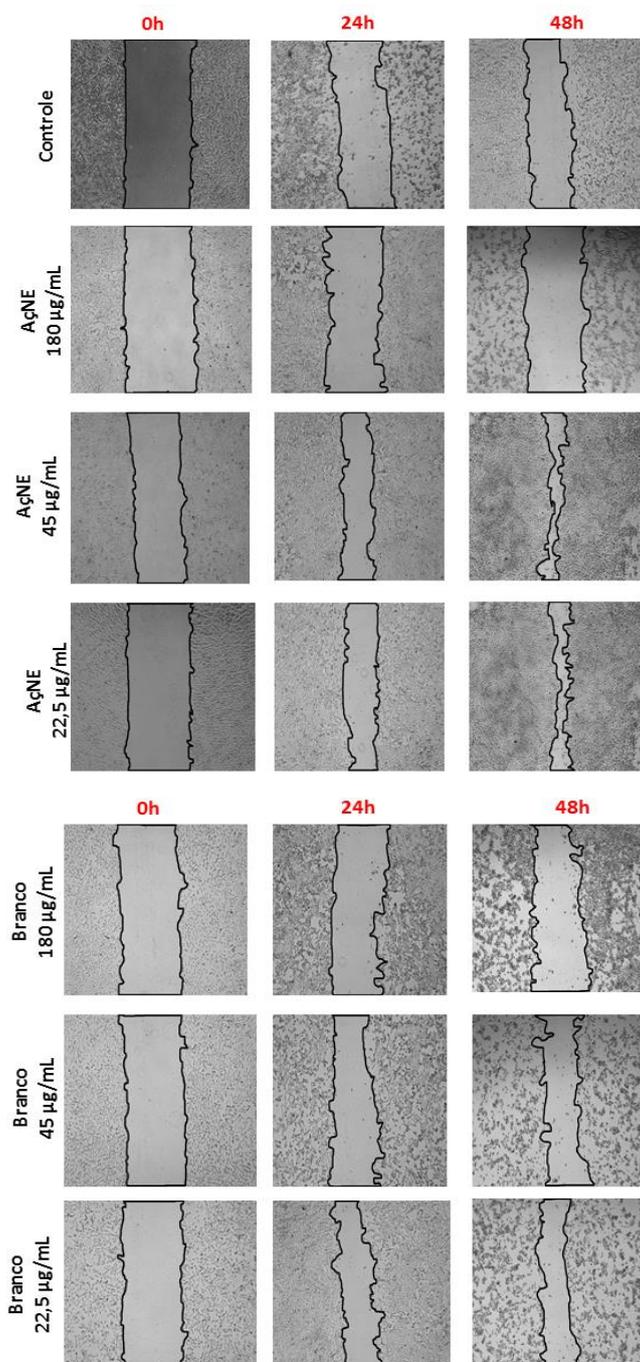


Figura 37. Fotomicrografias de ensaio de migração 180µg/mL CTL/ Br/ AçNE. A migração celular foi avaliada com o ensaio *wound healing* após o tratamento seriado com Branco e AçNE em concentrações de 22,5 µg/mL, 45 µg/mL e 180µg/mL e ao controle água ultrapura (H₂O). Um zero padronizado (scratch) foi aplicado à monocamada e as fotomicrografias foram realizadas em vários pontos de tempo (0, 24, 48 horas). Os experimentos foram realizados em triplicata.

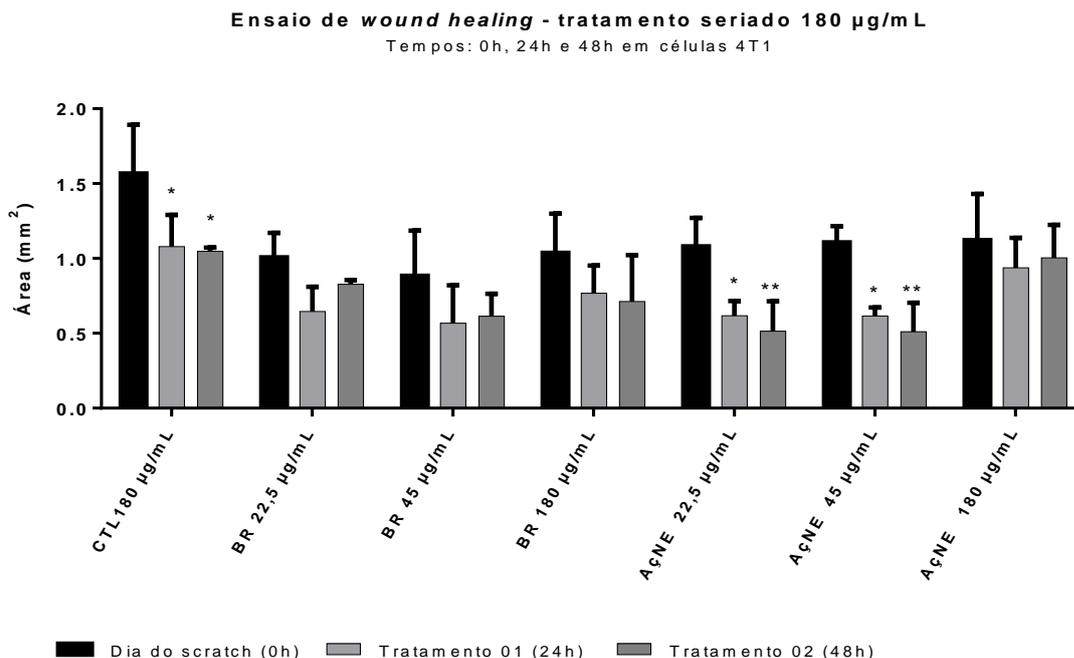
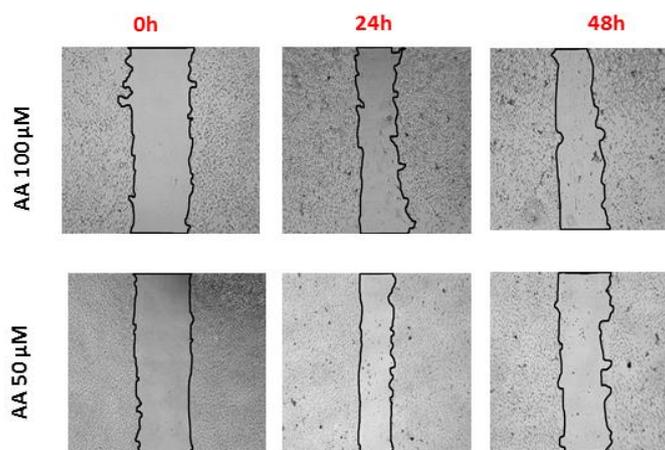


Figura 38. Ensaio de migração seriado 180µg/mL CTL/ Br/AÇNE. A migração celular foi avaliada com o ensaio de *wound healing* após o tratamento seriado com Branco e AÇNE em concentrações de 22,5 µg/mL, 45 µg/mL e 180µg/mL e ao controle com DMEM e água ultrapura (H₂O). Um 0h foi padronizado com o *scratch* aplicado à monocamada e os tratamentos foram adicionados em 24h e 48horas. Os experimentos foram realizados em triplicata. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (*: P<0,05 e ***: P < 0,001).

De acordo com os resultados adquiridos no ensaio de *wound healing* (Figuras 37 e 38) pode-se observar que o grupo controle do dia do *scratch* (0h) para o último dia de tratamento (48h), obteve redução de cicatriz de 33,33% (Tabela 4 e 5), indicando migração celular, dado este esperado, pois o grupo controle recebeu apenas o meio de cultivo nos dois dias de ensaio, favorecendo desta forma, o efeito migratório. Os Brancos AÇNE também apresentaram redução do *scratch* durante este mesmo período de 0 horas à 48 horas, sendo eles de 18%, 30% e 31% para o Branco 22,5 µg/mL; Branco 45 µg/mL e Branco 180 µg/mL respectivamente. Diante do exposto, entende-se que os mesmos não apresentaram fatores em sua formulação capazes de inibir a migração, juntamente a isto, no segundo dia de tratamento (24h), assim como o grupo controle, os brancos recebem meio de cultivo celular, favorecendo o efeito migratório.

As AçNE em 48 horas de tratamento, resultaram na redução do *scratch* indicando migração celular, os valores obtidos neste ensaio foram de 52% em AçNE 22,5 µg/mL; 53% em AçNE 45 µg/mL e 10% AçNE 180 µg/mL. Conforme os resultados encontrados, inferiu-se que as nanoformulações não apresentaram capacidade de inibição celular isoladamente.



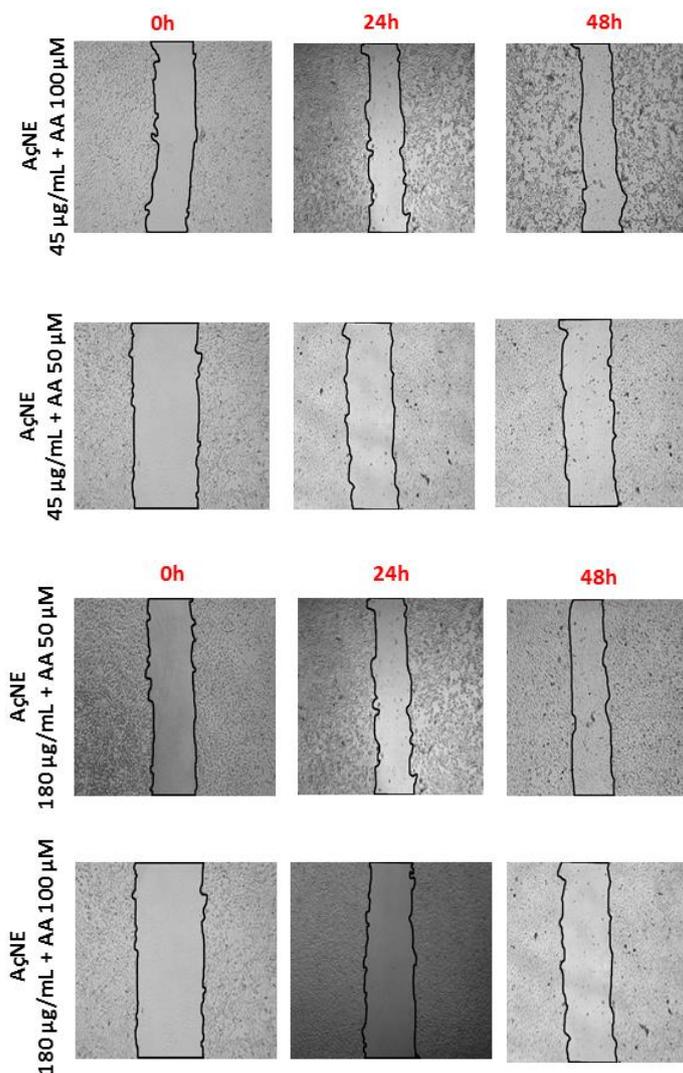


Figura 39. Fotomicrografias de ensaio de migração 180µg/mL AA e AçNE + AA. A migração celular foi avaliada com o ensaio *wound healing* após o tratamento seriado com AçNE em concentrações de 22,5 µg/mL, 45 µg/mL e 180µg/mL e posteriormente associadas a AA 50 µM, e AA 100 µM; AA 50 µM e AA 100 µM; e ao controle água ultrapura (H₂O). Um zero padronizado (*scratch*) foi aplicado à monocamada e as fotomicrografias foram realizadas em vários pontos de tempo (0, 24, 48 horas). Os experimentos foram realizados em triplicata.

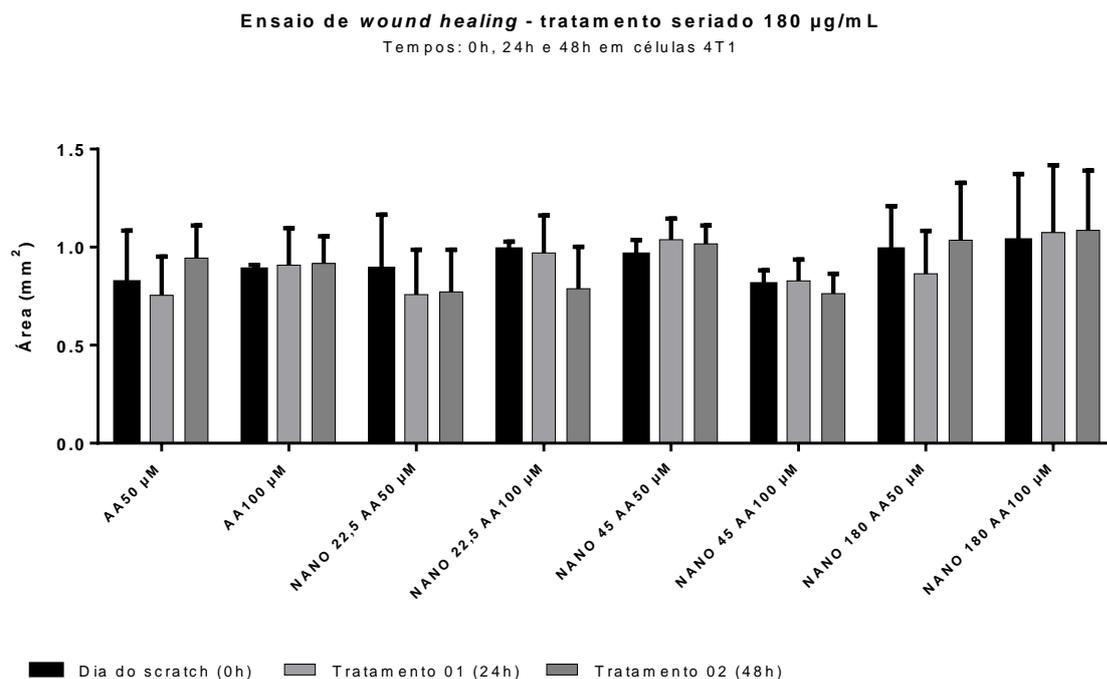


Figura 40. Ensaio de migração seriado 180µg/mL, AA e AçNE + AA. A migração celular foi avaliada com o ensaio de *wound healing* após o tratamento seriado com AçNE em concentrações de 22,5 µg/mL, 45 µg/mL e 180µg/mL e posteriormente associadas a AA 50 µM, e AA 100 µM; AA 50 µM e AA 100 µM; e ao controle água ultrapura (H₂O). Um 0h foi padronizado com o *scratch* aplicado à monocamada e os tratamentos foram adicionados em 24h e 48horas. Os experimentos foram realizados em triplicata. Test ANOVA one-way e post-teste Tukey, diferença significativa em comparação com o grupo controle (*: P<0,05 e ***: P < 0,001).

Conforme os resultados adquiridos no ensaio de *wound healing* (Figuras 39 e 40) pode-se observar que, no dia do *scratch* (0h) para o último dia de tratamento (48h) o ácido anacárdico em ambas as concentrações apresentou inibição de migração celular, visto que, a área de *scratch* analisada ao final do ensaio foi de 14% em AA 50 µM e de 3% em 100 µM. No mesmo período de 24 horas à 48 horas, As AçNE 22,5 µg/mL + 50 µM e 22,5 µg/mL + 100 µM apresentaram redução de *scratch* em 13% e 21%. Desta forma, não correu efeito combinatório ou não ocorreu efeito combinatório suficiente para que as mesmas inibissem a migração celular. Em contrapartida em 48 horas de tratamento, pode-se observa inibição celular na AçNE 45 µg/mL + AA 50 µM, visto que expandiu o *scratch* em 14%, no entatanto a concentração de AçNE 45 µg/mL + AA 100 µM reduziu o *scratch* em 6%. Neste

mesmo período analisados por outras nanoemulsões, a AÇNE 180 µg/mL em ambas concentrações de AA tiveram seus *scratches* aumentados em 5% em AA 50 µM e 4% em AA 100 µM. Todos os ensaios que apresentaram expansão dos seus *scratches* levantam a hipótese de início de morte celular, uma vez que regridem após o tratamento 1 e/ou tratamento 2.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos no presente experimento pode-se chegar às seguintes conclusões:

- Todas as AçNEs (AçNEs, AçNEs PEG e AçNE CH) apresentaram características físico-químicas dentro da escala nanométrica sendo reprodutíveis e semelhantes às publicadas por Araujo, 2017.

- AçNE não apresentou efeito de citotoxicidade dose dependente no período de 24 horas em células 4T1; em contrapartida, o AA induziu citotoxicidade dose dependente nas mesmas condições experimentais.

- Tratamentos nos quais as AçNEs e AA foram aplicados simultaneamente não apresentaram efeito combinatório na citotoxicidade de células 4T1. No entanto, no tratamento seriado, (sendo um aplicado 24 hs após o outro), houve um aumento de 20% na redução de viabilidade de tais células.

- O tratamento seriado com AçNE + AA resultou em alteração no potencial de membrana mitocondrial (PMM) de células 4T1 induzindo hiperpolarização (AçNE 180µg/MI + AA 50 µM) ou despolarização (AçNE 180µg/mL + AA 100 µM) da mesma dependendo da concentração dos tratamentos.

- O tratamento seriado com AçNE 180µg/mL + 100 µM AA induziu alterações morfológicas, redução de 67% no número total de células e lesão de membrana plasmática em 43% das células tratadas.

- As AçNEs alteraram o perfil de migração de células 4T1 de forma dose-dependente estimulando tal efeito nas concentrações de 22,5 µg/mL e 45 µg/mL e reduzindo a migração no tratamento com AçNE 180 µg/mL. O AA inibiu a migração celular em ambas concentrações avaliadas (50 ou 100 µM). No tratamento seriado com AçNE + AA houve redução no perfil de migração celular em todas as combinações avaliadas, sendo mais expressiva após os tratamentos com AçNE 180 µg/mL + 50 µM AA e AçNE 180 µg/mL + 100 µM AA.

- Até o presente momento esse é o primeiro trabalho a descrever os efeitos do óleo de açaí, de AçNEs e de AA em células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 e a sugerir que o tratamento seriado com tais amostras pode ser uma ferramenta adjuvante potencialmente promissora na terapia contra o câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-LAZIKANI, B. et al. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature Biotechnology**, v. 30,n. 7, p. 679-692, 2012.

ALMEIDA, S.S.; AMARAL, D.D.; SILVA, A.S.L. Análise florística e estrutura de florestas de várzea no estuário amazônico. **Acta Amazônica**. v. 34, p. 513-524, 2004.

ARAÚJO, H. L.L (b). **Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, *in vitro***. Dissertação Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

ARAÚJOa, V. H. S (a) **Nanoemulsões à base de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*): síntese, caracterização e avaliação do efeito em células de carcinoma mamário**. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016

ARAÚJOb, V. H. S. et al. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões (o/w) à base de óleos de frutos nativos do Cerrado associados a polímeros de quitosana**. In: 20º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 11o Congresso de Iniciação Científica do DF, 03 a 06 de novembro de 2014, Brasília, DF, Brasil.

BARCELOS, G. R. M. et al. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1468-1475, 2007.

BARREIRA, M. R. **Caracterização físico-química do endocarpo do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para aplicação em síntese de poliuretana**. Dissertação de mestrado em Engenharia Mecânica. Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

BARROS, L.C. et al. The powerful *in vitro* bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v.76, p.318-322, 2015.

BALASUBRAMANYAM, K. et al. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19134-19140, 2003.

BALLAL, N. V. et al. Evaluation of antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* leaves against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **International Journal of Clinical Dentistry**, v. 6, n. 2, 2013.

BERAL, V. et al. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. **The Lancet**, v.360, n.9328, p.187-195, 2002.

BERNARDI, D. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. Dissertação Mestrado em Farmácia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer**. 2012. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v.36, n.9, p.1827-1840, 2012.

CAMARGO, M. F.P., **Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica**, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CAPEK, I., Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions, *Advances in Colloid Interfacial Science*, **Amsterdam**, v. 107, n.3 p. 125-55, 2004.

CATHER, J. C.; CROWLEY, J. J. Use of Biologic Agents in Combination with Other Therapies for the Treatment of Psoriasis. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 15, n. 6, p. 467–478, 2014.

CAMPOS, J.; VARAS-GODOY, M.; HAIDAR, Z. S. Physicochemical characterization of chitosan-hyaluronan-coated solid lipid nanoparticles for the targeted delivery of paclitaxel: a proof-of-concept study in breast cancer cells. **Nanomedicine**, v. 12, n. 5, p. 473–490, mar. 2017.

CARVALHO, A. L. N. et al. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 730- 736, 2011.

ČESLA, P. et al. Characterization of anacardic acids by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, n. 1, p. 253-259, 2006.

CHAMMAS, R. Biologia do Câncer: uma breve introdução. In: P. M. G. Hoff; A. Katz; R. Chammas; V.Odone-Filho; Y.S. Novis. (Org.). **Tratado de Oncologia**. 1ed.São Paulo: Editora Atheneu. v. 1, p. 3-8, 2013.

COISSON, J. et al. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, v.38, n. 8–9, p.893–897, 2005.

CONG, Z. et al. Design and optimization of thermosensitive nanoemulsion hydrogel for sustained-release of praziquantel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 5 jan. 2017.

CONTENTE, D. M. L, **Obtenção e caracterização de nanoemulsão óleo em água a partir de óleo de açaí *Euterpe oleracea* M.** Dissertação de mestrado em Faramácia. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

COSTA-LOTUFO L.V et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer. **Rev Virtual Quim**, v.2, n.1, p. 47-58, 2010.

CORTAZAR, P. et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **The Lancet**, v. 384, n.9938, p.164-172, 2014.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2, n.1, p. 47-58, 2010.

DANHIER F, feron O, Prétat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **J Contr Release**, n. 4, v.33, p 135-46, 2010

DAWOOD, S. et al. International Expert Panel on Inflammatory Breast Cancer: Consensus Statement for Standardized Diagnosis and Treatment. **AnnalsofOncology**, v.22, n.3, p.515-523, 2011.

DEDAVID, B. A. et al. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007.

DE MATTEIS, L. et al. Controlling Properties and Cytotoxicity of Chitosan Nanocapsules by Chemical Grafting. **Marine Drugs**, v. 14, n. 10, p. 175, 30 set. 2016.

DIAS, M.M.S. et al. Pro-Apoptotic Activities of Polyphenolics From Açai (*Euterpe oleracea* Martius) in Human SW-480 Colon Cancer Cells. **NutritionandCancer**, v.66, n.8, p. 1-12, 2014.

DEL POZO-INSFRAN, D. et al.,. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). J. Agr. **Food Chem**, v. 52, n. 6, p.1539–1545, 2004.

EISENBERG, A.L.A. et al. Hormone receptors: association with prognostic factors for breast câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.1, p.49-58, 2001.

FANG, Jun; NAKAMURA, Hideaki; MAEDA, Hiroshi. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 3, p. 136-151, 2011.

FAO (Statistic Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations) **Faostat**, 2018. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> Acesso em: 17 de fevereiro de 2018.

FAVACHO, H. A. S. et al . Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., *Arecaceae*, oil. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba , v. 21, n. 1, p. 105-114, 2011 .

FAVACHO,H, A. S. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo fixo *Euterpe oleracea* Mart.** Dissertação de mestrado em Farmácia. Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

FELSSNER, K. S. **Avaliação nutricional da semente de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) como ingrediente em alimentos extrusados para cães.** Tese de doutorado em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

FERNANDES D. A. S. **Citotoxicidade e Captação de Nanopartículas de Ouro em Modelo Celular de Epitélio Intestinal Humano: Importância da**

Funcionalização. Faculdade da Farmácia da Universidade do Porto. Departamento de Toxicologia. Dissertação de Mestrado. 2010.

FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. In: Annual Meeting of the American Physical Society, 20 dez 1959. **California Institute of Technology (Caltech). Eng Sci. California: Caltech**, fev 1960.

FILHO, F. O., **Isolamento em escala preparativa de ácidos anacárdicos provenientes do líquido da casca da castanha do caju (LCC)**, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FORGIARINI, A., ESQUENA, J. GONZALEZ, C; SOLANS, C. **Formations of nanoemulsions by low – energy emulsification methods at constant temperature.** *Langmuir*, v.17, n.7, p 2076-2083, 2001.

FRAGOSO, M. F.et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p.68-78, 2013.

FREITAS, D. S. **Análise citotóxica e caracterização química de frações do extrato hidroalcoólico da semente de *Euterpe oleracea* Mart.** Dissertação de mestrado em Saúde do Adulto e da criança. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, jun. 1998.

GAO, Y. et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 4, p. 761-777, 2014.

GALLORI, S.; BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; BARBOSA, W.L.R.; VINCIERI, F.F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai palm). **Chromatographia**, v.59, n. 11/12, p. 739-743, 2004.

GANDHI, T.; PATEL, M.; DHOLAKIYA, B. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. **Journal of Natural Products Plant Resource**, v. 2, n. 1, p. 135, 2012.

GIULIANO A. E. et al. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v.305, n.6, p.569-575, 2011.

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

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n.16, p.2784-2795, 2010.

HASSIMOTTO, N. M. A.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem**, v.53, p. 2928-2935, 2005

HEINRICH, M. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 10–21, 2011.

HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

HEPPNER, G. H. Nontransgenic models of breast cancer. **Breast Cancer**, v.2, n.5, p. 331-334, 2000.

HOGAN, S., et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açaí. **Food Chem**, v.118, n.2, p.208–214. 2010.

HSCCC-ESI-/APCI-MS/MS). In: (Ed.). **Recent Advances in the Analysis of Food and Flavors: ACS Publications**, 2012. p.145-165.

HULL, L. C.; FARRELL, D.; GRODZINSKI, P. Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research—View from NCI Alliance for nanotechnology in cancer. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 4, p. 666-678, 2014.

HU, C.J. et al. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1104–1111, 2012.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **All Cancers (excluding non-melanoma skin cancer) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** France. 2018. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Em janeiro, IBGE prevê safra 6,0% inferior à de 2017.** São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/19942-em-janeiro-ibge-preve-safra-6-0-inferior-a-de-2017.html>> Acesso em: 17 de fevereiro de 2018.

INCAa (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **O que é o câncer?** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> . Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAb (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **INCA estima cerca de 600 mil casos novos de câncer para 2018.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2018/inca-estima-cerca-600-mil-casos-novos-cancer-para-2018>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAc (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAd (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Como é o processo de carcinogênese?** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319> . Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAe (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Tipos de câncer. MAMA.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAf (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Fatores de risco.** Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/pr>

ograma_controle_cancer_mama/fatores_risco>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAg (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Sintomas MAMA**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

INCAh (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). **Estadiamento**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

JÄNICKE, R. U. et al. Caspase-3 is required for α -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.25, n.273, p.15540-15545, 1998.

JERZ, G. et al. Anacardic acid profiling in cashew nuts by direct coupling of preparative high-speed countercurrent chromatography and mass spectrometry (prep

JOANITTI, G.A. et al. 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, 2010.

KOURNIATIS, Loretta R. et al . Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 295-300, 2010.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 34, n. 6, p. 970-973, 1986..

LAI, L et al. Piperine suppresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Nature**, v.33, p. 523-530, 2012.

LAUREN, C.D et al. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v.30, n.2, p. 3-15, 2003.

LICHTENTHÄLER, R, et al. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.56, n.1, p. 53-64 2005.

LIECHTY WB, PEPPAS NA. Expert opinion: responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. **Eur J Pharm Biopharm** v. 80, n.2, p. 241-246, 2011.

LEGUT, M. et al. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines—in vitro studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n.1, p. 653, 2014.

LIMA, C. P. et al. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p. 321-326, 2012.

LOSCHIAVO, E.A.A. et al. Efeitos colaterais da terapia antitumoral em pacientes submetidos à quimio e à radioterapia. **Revista Biociências**, v.11, n.1-2, p.515-523, 2005.

MASON, T. G.; WILKING, J. N.; ELEMSON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. Nanoemulsions formation, structure and physical properties. **Journal os Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 635, 2006.

MARTINO, D. H.S. et al. Antilipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (*Euterpe oleracea* Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Functional Foods**, v.23, p.432–443, 2016.

MEKKAWY, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 759–777, jan. 2017.

MENDES, N. M. et al. Atividade moluscicida da mistura de ácidos 6-n-alquil salicílicos (ácido anacárdico) e dos seus complexos com cobre (II) e chumbo (II). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 217-224, 1990.

MEYAGUSKU, V.M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo Ciprofloxacino**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara-SP, 2014.

MORAN, M.S. et al. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 88, n.3, p.553-564, 2014.

MOREIRA, J. R. L. **A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama.** Conclusão de Curso em Farmácia. Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, 2013.

MOKHTARI, R. B. et al. Combination therapy in combating cancer. **Oncotarget**, v.8, n.23, p 38022–38043, 2017.

MIGNANI, S. M. et al. Advances in combination therapies based on nanoparticles for efficacious cancer treatment: an analytic report. **Biomacromolecules**, v.16, n. 1, p. 1-27, 2015.

MONGE-FUENTES, V. **Terapia fotodinâmica mediada por fotossensibilizante à base de óleo de açaí em nanoemulsão para o tratamento de melanoma *in vitro* e *in vivo*.** Tese de Doutorado em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília 2014.

MORACHIS, J. M.; MAHMOUD, E. A.; ALMUTAIRI, A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 3, p. 505–519, 1 jul. 2012.

MORAIS, S. M. et al. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 1, p. 31, 2017.

NASCIMENTO, R. J. S., et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Rev. Bras. Frutic.** v. 30, 2008.

NAYAK, D. et al. Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431 85 carcinoma. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 457, p. 329–338, 2015.

NETO, M. P. et al. Monitoração terapêutica da azatioprina: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.44, n.3, p.161-167, 2008.

NETO, L. et al. Characterization of cytotoxic activity of compounds derived from anacardic acid, cardanol and cardol in oral squamous cell carcinoma, **BioMed Central**. v.8, n. 4,p.30, 2014.

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). **Side Effects.** Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects/>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

O'COLLINS, V. E. et al. Evaluation of Combination Therapy in Animal Models of Cerebral Ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 585–597, 2012.

OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO, R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, 2012.

OLIVEIRA, P. A. et al . Chemical carcinogenesis. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro , v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

OMBREDANDE, 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)**. Dissertação Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

ÖZGÜR, E. et al. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells. **Clinical and Experimental Medicine**, v.2, n.13, p.119-126, 2013.

PALA, D. **Efeito do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre o estado oxidativo e a influência nas transferências de lípidos para HDL em mulheres**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Ouro Preto, 2016.

PACHECO-PALENCIA, L. Phytochemical antioxidant and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Res Int**, v.40, n. p.620, 2007.

PANTALEÃO, C. et al. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.4, p.439-1445, 2010.

PARAMASHIVAPPA, R. et al. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2548-2551, 2001.

PASZKO, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p.14–29, 2011 .

PEREIRA, J. M. et al. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 8889- 8895, 2008.

PHILIP, J. Y. N. et al. Isolation of anacardic acid from natural cashew nut shell liquid (CNSL) using supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9350-9354, 2008.

PORTO, A. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão o/a a base de óleo de copaíba, incorporadas com nanopartículas magnéticas de zinco**. Dissertação Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PULASKI, B. A. et al. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, unit 20.2.1-20.2.16, 2001.

RAMOS, K. L. V. **Avaliação da citotoxicidade da terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí contra câncer de pele não-melanoma**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

ROSANI, L. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais**. Dissertação Mestrado em Química, Universidade de Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.

SADURN, N., SOLANS, C., AZEMAR, N; GARCA-CELMA, M. **Studies on the formation of o/w nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications.. European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26, n.5, p.438–445.

SANTOS L.C.T et al. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 11, p. 656-660, 2005.

SAJJADI; S.; ZERFA, M.; BROOKS, B.W.; Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair. Sorbitano monolaurate/polyoxyethylene sorbitano monolaurate (Span 20/tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 252, p.27-32, 2003.

SCHAUSS A.G.; WU X.; PRIOR R.L.; OU B.; PATEL D.; ET AL. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 8598–8603, 2006.

SCHULTZ, D. J. et al. Bioactivity of anacardic acid against colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7522-7529, 2006.

SCHULTZ, D. J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante de açais de *Euterpe edulis* Martius e *Euterpe oleracea* Martius submetidos a tratamentos para sua conservação.** Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Agrárias curso de Agronomia, Florianópolis, 2008.

SEONG, Y.A. et al. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n.2, p. 369-377, 2014.

SILVAa, D. F. et al. Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 175, p. 1-9, 2014

SILVAb, E. J. et al. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas*, v.14, n. 1, p.115-122, 2013.

SILVAc, M. et al. Prolonged breastfeeding reduces risk of breast cancer in Sri Lankan women: A case–control study. **Cancer Epidemiology**, v.34, n.3, p.267-273, 2010.

SILVAd, D. F. et al. “Cytotoxic Effects of *Euterpe Oleracea* Mart. in Malignant Cell Lines.” **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p.175, 2014

SIMSTEIN, R., M. et al. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. **Experimental biology and medicine**, v.9, n.228, p. 995-1003, 2003.

SOLANS, C et al. **Nanoemulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, n. 4, p. 102-110, 2005.

SONNEVILLE-AUBRUN, O., SIMONNET, J.T., L'ALLORET, F. **Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. Journal os Physics: Condensed Matter**, v. 108-109, p 145-149, 2004.

SPADA, P.D.S, et al.. Frozen Fruit Pulp of *Euterpe Oleraceae* Mart. (Acai) Prevents Hydrogen Peroxide-Induced Damage in The Cerebral Cortex, Cerebellum, and Hippocampus of Rats. **J. Med. Food**, v.12, n. 5, p. 1084–1088, 2009.

SRIRAMAN, S.K. et al. Barriers to drug delivery in solid tumors. **Tissue Barriers**, v. 2, n. e29528, p. 1-7, 2014.

TADROS, T., IZQUIERDO, P, ESQUENA, J, SOLANS, C. Formations and stability of nanoemulsions. **Advances in Colloid Interface Science**, v. 108-109, p.303-318, 2004.

TAN, J.et al. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. **Oncology Reports.**, v. 38, n. 3, p.1373-1382, 2017.

TEIXEIRA, G. H. A., Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food chemistry**, v. 136, n. 3, p. 1160-1664, 2015.

TORCHILIN, Vladimir. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 3, p. 131-135, 2011.

TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188- 197, 2006.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: como produzi-las em Escala Industrial**. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Departamento de Engenharia Química. Tese de Doutorado. Porto Alegre. 2009.

THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. **Science**, v.281, n.5381, p.1312- 1316.

UICC (International Union Against Cancer). **TNM Classification of Malignant Tumours**. Singapore, 2018. Disponível em: < <https://www.uicc.org/resources/tnm>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

VIEIRA, L. M. et al. Otimização da técnica de citometria de fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.3, n.25, p. 141-147, 2003.

XU, R. Light scattering: **A review of particle characterization applications. Published by Elsevier B.V. on behalf of Chinese Society of Particuology and Institute of Process**, partic-683; no. of pages11, 2014.

WANG, XU et al. "Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology." **Cancer Research and Treatment.Official Journal of Korean Cancer Association**, v.41, n.1, p. 1-11, 2009.

WHO (World Health Organization). **Breast cancer: prevention and control**. 2018. Disponivel em: < <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

WOLFF A. C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, v.31, n.31, p.3997-4013, 2013.

WONG. H.L. et al. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**. v. 59. p 491-504, 2007.

HOW, C.W. et al. Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: Characterization, stability assessment and cytotoxicity. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v.112, p.393–399 2013.

WU, Y. et al. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n.2, p. 403-411, 2011.

YAP, A.T.; OMLIN, A.; BONO, J.S. Development of Therapeutic Combinations Targeting Major Cancer Signaling Pathways. **Journal of Clinical Oncology**, v.31, n.12, p. 1592-1605, 2013.

YE, D. et al. A TEM protocol for quality assurance of *in vitro* cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. **Royal Society of Chemistry**, v.140, p.83-97, 2014.

ANEXOS

Anexo 1. Percentual de diferença durante os três dias de ensaio de *wound healing*

Grupos ($\mu\text{g/mL}$)	Dia do <i>scratch</i> (mm^2)	Tratament o 01 (mm^2) (24h)	Diferença do <i>scratch</i> para o Trat 01 (mm^2)	Tratamento 02 (mm^2) (48h)	Diferença do Trat 01 para Trat 02 (mm^2)	Diferença do dia do <i>scratch</i> para <i>scratch</i> após tratamento 2	Percentual do dia do <i>scratch</i> para <i>scratch</i> após tratamento 2
CTL	1.560	1.080	480	1.040	40	520	33,33%
Branco 22,5 $\mu\text{g/mL}$	1.000	640	360	820	-180	180	18,00%
Branco 45 $\mu\text{g/mL}$	0.880	560	320	610	-50	270	30,68%
Branco 180 $\mu\text{g/mL}$	1.030	760	270	710	320	320	31,07%
AçNE 22,5 $\mu\text{g/mL}$	1.080	610	470	510	50	570	52,78%
AçNE 45 $\mu\text{g/mL}$	1.100	610	490	510	100	590	53,64%
AçNE 180 $\mu\text{g/mL}$	1.120	930	190	1.000	-70	120	10,71%
AA 50 μM	820	750	70	940	-190	-120	- 14,63%
AA100 μM	880	900	-20	910	-10	-30	- 3,41%
AçNE 22,5 + AA 50 μM	890	750	140	770	-20	120	13,48%
AçNE 22,5 + AA 100 μM	990	970	20	780	190	210	21,21%
AçNE 45 + AA 50 μM	880	1.030	-150	1.010	20	-130	- 14,77%
AçNE 45 + AA 100 μM	810	820	-10	760	60	50	6,1%

AçNE 180 + AA 50 µM	980	860	120	1.030	-170	-50	-5,10%
AçNE 180 + AA 100 µM	1.030	1.070	-40	1.080	-10	-50	-4,8%

Anexo 2. Percentual de diferença durante os três dias de ensaio de *wound healing*

Grupos (µg/mL)	Percentual do dia do scratch (0h) para scratch após tratamento 2 (48h) (%)	Migração	Inibição
CTL	33,33%	X	
Branco 22,5 µg/mL	18,00%	X	
Branco 45 µg/mL	30,68%	X	
Branco 180 µg/mL	31,07%	X	
AçNE 22,5 µg/mL	52,78%	X	
AçNE 45 µg/mL	53,64%	X	
AçNE 180 µg/mL	10,71%	X	
AA 50 µM	-14,63%		X
AA100 µM	-3,41%		X
AçNE 22,5 + AA 50 µM	13,48%	X	
AçNE 22,5 + AA 100 µM	21,21%	X	

AçNE 45 + AA 50 μ M	- 14,77%		X
AçNE 45 + AA 100 μ M	6,1%	X	
AçNE 180 + AA 50 μ M	- 5,10%		X
AçNE 180 + AA 100 μ M	-4 ,8%		X
