



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE
PEQUI E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM DOCETAXEL E ÁCIDO
ANACÁRDICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, *in vitro* E *in vivo*.**

ALICIA SIMALIE OMBREDANE

2020

ALICIA SIMALIE OMBREDANE

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE PEQUI E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM DOCETAXEL E ÁCIDO ANACÁRDICO EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA, *in vitro* E *in vivo*.

Tese 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 Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

ORIENTADORA:

PROFA. DRA. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI

BRASÍLIA, DF

2020

AGRADECIMENTOS

À Julie e ao Herdson, minha família que sempre me apoia e me dar força, principalmente na reta final do doutorado. Obrigada pela paciência e pelo amor.

À minha orientadora Graziella Anselmo Joanitti. Não tenho palavras para descrever minha gratidão por esses anos de ensinamentos, de paciência, de carinho e de amizade. Muito obrigada por tudo. Você é um grande exemplo para mim.

Aos membros da banca, prof. Dr. João Paulo Longo Figueiro, profa. Dra. Elaine Amaral Leite, profa. Dra. Eliana Martins Lima e profa. Dra. Sônia Nair Bão. Obrigada por ter aceito o convite.

Aos professores e colegas cuja colaboração foi primordial para finalizar este trabalho: profa. Dra. Eliza Duarte e sua equipe pela parte de histologia, prof. Dr. Sebastião W. da Silva e sua doutoranda Ísis pela caracterização das formulações por FTIR, prof. Dr. Luiz E.C.B Romeiro pela doação da biomolécula ácido anacárdico.

À equipe incrível dos ensaios *in vivo*: Dr. Willie Pinheiro, profa. Dra. Laise Rodrigues, Gabriel, Dra. Patrícia, Thyago e Fernanda.

Ao Carlos pelo auxílio no ensaio da capsase.

À dra. Márcia pela caracterização das formulações por MET

Aos membros do LCBNano e em especial à Natália e Gabriela que colaboraram ativamente neste trabalho.

Ao responsável do Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, o Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo e a todos os professores e colegas do laboratório. Obrigada por esses anos de convívio e aprendizado.

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

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para execução desse trabalho.

“Je crois que l’avenir de l’humanité est dans le progrès de la raison par la science.”
Emile Zola (1840-1902)

(“Eu acredito que o futuro da humanidade se encontra no progresso da razão pela ciência”)

RESUMO

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) representa a forma mais agressiva da doença e apresenta elevada taxa de mortalidade atribuída à metástase. O docetaxel (DTX) é um quimioterapêutico frequentemente usado no tratamento do CMTN. No entanto, efeitos adversos limitam sua aplicação como monoterapia. A biodiversidade brasileira representa fonte rica de moléculas bioativas que podem contribuir para o tratamento do CMTN. O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb), planta originária do Cerrado brasileiro, é constituído principalmente por ácidos graxos e carotenoides que lhe conferem diversas propriedades biológicas, incluindo efeito antitumoral. Além disso, o ácido anacárdico (AA), isolado da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*), também apresenta potencial anticâncer. Entretanto, a hidrofobicidade dessas moléculas representa limite à suas administrações. Portanto, nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE) foi projetada como sistema de transporte e liberação do óleo sozinho ou em associação com DTX e AA baseando-se em terapia combinatória. Neste trabalho, as investigações foram conduzidas em 4 capítulos: (I) síntese e caracterização de PeNE e avaliação da citotoxicidade em células 4T1 e NIH3T3; (II) investigação dos efeitos antitumorais do PeNE em células 4T1, *in vitro*, na proliferação celular, morfologia, funcionamento de organelas (lisossomo, mitocôndria, núcleo), mecanismos celulares (produção de ROS e liberação de cálcio) e perfil de morte; (III) síntese, caracterização e avaliação do efeito antitumoral da associação da PeNE com DTX (PDTX) e AA (PAA) em células 4T1 na morfologia, proliferação celular, organelas, mecanismos celulares, perfil de morte, *in vitro* (IV) e avaliação da eficácia e toxicidade por meio de análises clínicas, bioquímicas, hematológicas e histopatológicas em modelo de camundongos fêmeas balb/c, *in vivo*. Os resultados demonstraram sucesso na obtenção de PeNE estável e com características adequadas à proposta de ser utilizada como plataforma para transporte de biomoléculas. Além disso, PeNE apresenta atividade citotóxica em células 4T1 dose e tempo dependente com diminuição da proliferação celular, indução de lesão da membrana plasmática, bloqueio do ciclo celular, fragmentação de DNA, permeabilidade da membrana lisossomal, despolarização da membrana mitocondrial, alteração da morfologia celular, da produção intracelular de ROS e no nível de cálcio. Adicionalmente, a associação de DTX e AA à PeNE aumentou a eficácia dos tratamentos, *in vitro*. A combinação PAA+PDTX apresentou efeito aditivo e foi considerada como tratamento mais promissor, *in vitro*. Contudo, os ensaios *in vivo* sugeriram que a combinação AA+DTX livres administrados por via intratumoral é o tratamento de maior eficácia com diminuição significativo do volume tumoral, regressão tumoral em 50% dos animais tratados e impedindo processo de metástase em 100% dos animais. Apesar dessa diferença observada entre modelos *in vitro* e *in vivo*, pode-se concluir que a associação de AA e DTX, livres (*in vivo*) ou nanoencapsulado (*in vitro*) apresentou melhoria quando comparado com os demais tratamentos. Dessa forma, essas combinações são promissoras e merecem futuros estudos para investigar melhor o potencial anticâncer.

Palavras chaves: óleo de pequi, docetaxel, ácido anacárdico, nanoemulsão, 4T1

ABSTRACT

Triple negative breast cancer (CMTN) is the most aggressive form of breast cancer and presents high mortality rate attributed to metastasis process. Docetaxel (DTX) is a chemotherapeutic frequently used in the treatment of CMTN. However, adverse effects limit its application as monotherapy. Brazilian biodiversity represents a rich source of bioactive molecules that can contribute to the treatment of CMTN. Pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb), a plant native to the Brazilian Cerrado, is mainly constitute of fatty acids and carotenoids that give it several biological properties, including antitumor effect. In addition, anacardic acid (AA), isolated from the cashew nut shell (*Anacardium occidentale*), also demonstrates anticancer potential. However, the hydrophobicity of these molecules represents a limit to their administrations. Therefore, pequi oil-based nanoemulsion (PeNE) was designed as a transport and release system for oil alone or in association with DTX and AA based on combinatorial therapy. In this work, investigations were conducted in 4 chapters: (I) synthesis and characterization of PeNE and evaluation of cytotoxicity in 4T1 and NIH3T3 cells; (II) investigation of the antitumor effects of PeNE in 4T1 cells, *in vitro*, on cell proliferation, morphology, organelle functioning (lysosome, mitochondria, nucleus), cellular mechanisms (production of ROS and release of calcium) and death profile; (III) synthesis, characterization and evaluation of the antitumor effect of the association of PeNE with DTX (PDTX) and AA (PAA) in 4T1 cells in morphology, cell proliferation, organelles, cellular mechanisms, death profile, *in vitro* (IV) and evaluation of efficacy and toxicity by clinical, biochemical, hematological and histopathological analyzes in a model of female balb / c mice, *in vivo*. The results demonstrated success in obtained stable PeNE with characteristics appropriate to the proposal to be used as a platform for transporting biomolecules. In addition, PeNE shows dose and time dependent cytotoxic activity in 4T1 cells with decreased of cell proliferation, induction of plasma membrane damage, cell cycle block, DNA fragmentation, lysosomal membrane permeability, mitochondrial membrane depolarization and alteration of cells morphology, intracellular production of ROS and the level of calcium. Additionally, the association of DTX and AA with PeNE increased the effectiveness of treatments, *in vitro*. The PAA + PDTX combination presented an additive effect and this treatment group was considered the most promising, *in vitro*. However, *in vivo* trials suggested that the combination AA + DTX administered intratumorally is the most effective treatment with significant reduction in tumor volume, tumor regression in 50% of treated animals and preventing metastasis in 100% of animals. Despite this difference observed between *in vitro* and *in vivo* models, it can be concluded that the association of AA and DTX, free (*in vivo*) or nanoencapsulated (*in vitro*) showed improvement when compared with the other treatments. Thus, these combinations are promising and deserve future studies to better investigate their anticancer potential.

Key words: pequi oil, docetaxel, anacardic acid, nanoemulsion, 4T1

LISTAS DE FIGURAS

Referencial teórico

Figura 1. Etapas da carcinogênese

Figura 2. Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese

Figura 3. (A) Aspecto da fruta do pequi. **(B)** Estrutura química do ácido oleico e do ácido palmítico, principais ácidos graxos do pequi.

Figura 4. Produtos do cajueiro: castanha e pedúnculo **(A)**. Partes da castanha: epicarpo, mesocarpo (onde se encontra o líquido da casca da castanha de caju), amêndoa e película **(B)**.

Figura 5. Principais componentes do líquido da casca da castanha de caju.

Figura 6. Estrutura química do paclitaxel e do docetaxel.

Figura 7. Tipos de nanopartículas utilizadas no diagnóstico e tratamento do câncer de mama.

Figura 8. Tipos de nanoemulsões.

Capítulo I

Figure 1. Evaluation of stability of pequi oil-based nanoemulsion at different pH values.

Figure 2. Evaluation of stability of pequi oil-based nanoemulsion at different dilution rates.

Figure 3. Evaluation of stability of pequi oil-based nanoemulsion over time storage at 4 °C, room temperature (RT), and 37 °C.

Figure 4. FTIR spectra of pequi oil-based nanoemulsion.

Figure 5. Cytotoxicity on the viability of breast cancer cells (4T1) and fibroblast (NIH /3T3).

Capítulo II

Figure 1. Cytotoxic effect on adenocarcinoma mammary cells (4T1).

Figure 2. Morphologic analysis of adenocarcinoma mammary cells (4T1)

Figure 3. Effect of PeNE and free pequi oil on cells proliferation of carcinoma mammary cells (4T1), *in vitro*.

Figure 4. Effect of PeNE and free pequi oil on keys organelles and plasmatic membrane.

Figure 5. Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) analysis.

Figure 6. Representation of apoptotic cells stained by Annexin V-FITC in 4T1 cells

Capítulo III

Figure 1. Transmission electron micrograph of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated with anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX).

Figure 2. Evaluation of stability of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated to anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX) over time storage at 4°C.

Figure 3: Infrared absorbance spectrum

Figure 4: (a) Infrared absorbance spectrum in the region of 2800 to 3050 cm⁻¹

Figure 5. Morphologic analysis of adenocarcinoma mammary cells (4T1)

Figure 6. Evaluation of cytotoxic effect on key organelles, plasma membrane and intracellular physiology of adenocarcinoma mammary cells (4T1) by flow cytometry.

Figure 7. Effect on cell proliferation.

Figure 8. Mechanism of death: apoptosis vs necrosis, and caspase activation.

Capítulo IV

Figura 1. Avaliação do peso corporal dos camundongos (A-B). O peso corporal começou a ser monitorado 3 dias antes da indução tumoral até o dia da eutanásia.

Figura 2. Avaliação do consumo de ração (A-B) ao longo do tempo. O consumo de ração foi monitorado a partir do 3º dia após indução tumoral.

Figura 3. Observação de alopecia em camundongos após as sessões de tratamentos. Imagens representativa do grupo.

Figura 4. Imagens representativas da evolução do volume tumoral ao longo do tempo

Figura 5. Análise do volume tumoral dos camundongos fêmeas Balb/c ao longo do tempo.

Figura 6. Análise do volume tumoral dos camundongos fêmeas Balb/c *ex vivo*, após eutanásia.

Figura 7. Avaliação do peso do baço (A) e sua correlação com peso do tumor

Figura 8. Avaliação do peso do tumor e dos órgãos (pulmão, linfonodo, fígado e rins) *ex vivo*.

Figura 9. Análises bioquímicas.

Figura 10. Análise do eritrograma após tratamentos.

Figura 11. Avaliação do efeito dos tratamentos no número total de leucócitos

Figura 12. Análise histológica do tecido tumoral por coloração hematoxilina/eosina.

Figura 13. Análise histológica de metástase em fígado, pulmão e linfonodo por coloração hematoxilina/eosina.

Figura 14. Avaliação do pulmão.

LISTAS DE TABELAS

Capítulo I

Table 1. Physicochemical characteristics of the PeNE formulations

Capítulo III

Table 1. Physicochemical characteristics of the different formulations.

Table 2. Cytotoxic effect on adenocarcinoma mammary cells and fibroblasts after 24 and 48 hours.

Table 3. Combination index values 24 hours.

Capítulo IV

Tabela 1. Descrição do tratamento dos grupos experimentais.

Tabela 2. Análises bioquímicas em camundongos fêmeas Balb/c após aplicação de diferentes tratamentos.

Tabela 3. Eritrograma em camundongos fêmeas Balb/c após aplicação de diferentes tratamentos.

Tabela 4. Leucograma em camundongos fêmeas Balb/c após aplicação de diferentes tratamentos.

Tabela 5. Características tumorais de composição entre os diferentes grupos experimentais.

Tabela 6. Número de animais com metástase nos diferentes órgãos de cada grupo experimental de acordo com a classificação M0 – M1 – M2 – M3 e M4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido anacárdico
4T1	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino
BALB/C	Linhagem de camundongo
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTX	Docetaxel
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	<i>European medicines agency</i>
ESI	Ionização por eletrospray
FTIR	Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier
FDA	<i>Food and drug administration</i>
IC50	<i>Inhibitory concentration of 50%</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MTT	3,4,5-dimetilthiazol-2,5 bifenil tetrazolium bromide
NIH3T3	Linhagem celular de fibroblastos murinos
PeNE	Nanoemulsão à base de óleo de pequi
PAA	Nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo ácido anacárdico
PDTX	Nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo docetaxel
PdI	Índice de polidispersão
PI	Iodeto de propídeo
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTCA	<i>Real Time Cell Analysis</i>
SFB	Soro fetal bovino
U.A.	Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Câncer – carcinogênese e <i>hallmarks</i>	5
2.1.1 Câncer de mama.....	6
2.2 Terapia combinatória.....	9
2.2.1 Óleo de pequi.....	10
2.2.2 Ácido anacárdico.....	12
2.2.3 Docetaxel.....	14
2.3 Nanociência, nanotecnologia e nanomedicina.....	16
2.3.1 Nanoemulsão.....	19
2.3.2 Aplicação em nanotecnologia.....	22
3- OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4- DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
CAPÍTULO I.....	26
Abstract.....	26
1- Introdução.....	27
2- Materials and methods.....	28
2.1 Materials.....	28
2.2 Fatty acid profile of pequi oil.....	29
2.3 Development of pequi oil-based nanoemulsion (PeNE).....	29
2.4 Physicochemical parameters of PeNE.....	29
2.4.1 Dynamic light scattering (DLS).....	29
2.4.2 Stability of nanoemulsions under stress conditions.....	30
2.4.3 Stability of nanoemulsion under different storage conditions.....	30
2.4.4 Analysis of infrared spectrophotometry – FTIR.....	30
2.5 Cell culture.....	30
2.6 Cell treatment.....	31
2.7 Cell viability assay.....	31
2.8 Statistical analysis	31
3- Results and discussion.....	32
3.1 Preparation and optimization of pequi oil-based nanoemulsions.....	32
3.2 Stability evaluation of PeNE under pH and dilution stresses.....	34
3.3 Stability evaluation of PeNE over time.....	35
3.4 Infrared spectra of PeNE.....	36
3.5 Antitumoral activity of PeNE.....	38
4- Conclusion.....	41
Reference.....	42

CAPÍTULO II.....49

Abstract.....	49
1- Introduction.....	50
2- Materials and methods.....	51
2.1 Materials.....	51
2.2 Development of PeNEs.....	51
2.3 Hydrodynamic Diameter, Polydispersity Index and Surface Charge.....	52
2.4 Cell culture.....	52
2.5 Cytotoxicity assay.....	52
2.6 Real-time cell analysis (RTCA).....	53
2.7 Plasma membrane integrity and cell count.....	53
2.8 Flow cytometry.....	53
2.8.1 Cells treatment.....	53
2.8.2 Annexin-V FITC/propidium iodide (PI) staining.....	53
2.8.3 Mitochondrial membrane potential and cells morphologic aspects.....	54
2.8.4 DNA fragmentation assay and cell-cycle.....	54
2.8.5 Lysosomal membrane permeabilization / Detection of acidic vesicular organelles (AVOs).....	54
2.8.6 ROS level.....	55
2.8.7 Intracellular calcium level	55
2.9 Cell morphology analysis by optical microscopy.....	55
2.10 Statistical analysis.....	55
3- Results.....	56
3.1 Dose- and time-dependent effect of PeNE on adenocarcinoma mammary cells.....	56
3.3 PeNE altered cells morphology.....	56
3.3 PeNE impaired cell proliferation and decreased total cell number without affecting cell cycle.....	58
3.4 PeNE induced damage in plasma membrane, DNA fragmentation, and alteration on lysosomes membrane permeability and on mitochondrial membrane potential	59
3.5 PeNE reduced ROS level and increased intracellular calcium proportion.....	61
3.6 PeNE increased the proportion of apoptotic cells.....	62
4- Discussion.....	63
5- Conclusion.....	65
References.....	66

CAPÍTULO III.....68

Abstract.....	68
1- Introduction.....	69
2- Materials and methods.....	70
2.1 Materials.....	70
2.2 Development of formulations.....	71
2.3 Dynamic light scattering (DLS) and stability under time.....	71

2.4	Analysis of infrared spectrophotometry – FTIR.....	71
2.5	Electronic transmission microscopy.....	72
2.6	Cell culture.....	72
2.7	Cell treatment.....	72
2.8	Cell viability assay.....	73
2.9	Plasma membrane integrity and cell count.....	73
2.10	Flow cytometry.....	74
2.10.1	Cells treatment.....	74
2.10.2	Lysosomal membrane permeabilization.....	74
2.10.3	Mitochondrial membrane potential and cells morphologic aspects.....	74
2.10.4	ROS level.....	74
2.10.5	DNA fragmentation assay and cell-cycle.....	75
2.10.6	Annexin-V FITC/propidium iodide (PI) staining.....	75
2.10.7	Multicaspase assay.....	75
2.11	Clonogenic assay.....	75
2.12	Cell morphology analysis by optical microscopy.....	76
2.13	Statistical analysis.....	76
3-	Results and discussion.....	77
3.1	Preparation and characterization of nanoemulsions.....	77
3.2	Additive effect of PAA and PDTX on adenocarcinoma mammary cells (4T1).....	81
3.3	PAA+PDTX altered cells morphology.....	83
3.4	PAA+PDTX significantly altered key organelles.....	85
3.5	PAA+PDTX inhibited cells proliferation.....	87
3.6	PAA+PDTX induced phosphatidylserine exposure and multicaspase activation.....	89
4-	Conclusion.....	90
	References.....	91
CAPÍTULO IV.....		94
1-	Introdução.....	95
2-	Metodologia.....	95
2.1	Ensaio <i>in vivo</i>	95
2.1.1	Manutenção dos animais.....	95
2.1.2	Indução tumoral.....	95
2.1.3	Tratamento.....	97
2.1.4	Avaliação do volume tumoral.....	97
2.1.5	Análise por tomografia computadorizada.....	98
2.1.6	Avaliação de marcadores bioquímicos.....	98
2.1.7	Hemograma.....	98
2.1.8	Análise histopatológica.....	99
2.2	Análises estatísticas.....	99
3-	Resultados.....	100
3.1	Monitoramento clínico dos animais.....	100
3.2	Efeito dos tratamentos no volume tumoral.....	101
3.3	Análises bioquímicas.....	106

3.4 Análises hematológicas.....	108
3.5 Análises histopatológicas.....	112
3.5 Avaliação do efeito dos tratamentos no pulmão.....	116
4- Discussão.....	118
5- Conclusão.....	127
6- Perspectivas.....	127
Referências	128
CONCLUSÃO GERAL.....	133
Referências da introdução.....	135
Referências do referencial teórico.....	137
ANEXO I.....	142
ANEXO II.....	143
ANEXO III.....	144

1- INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda doença crônica não transmissível de maior incidência no Brasil e no mundo com aproximadamente 9,6 milhões de morte em 2018 (WHO, 2020). Por definição, o câncer representa um conjunto de doenças caracterizadas pela presença de células em crescimento contínuo e descontrolado (INCA, 2020).

Depois do câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais comum dentre as mulheres e representa mais de 25% dos casos de câncer no Brasil (INCA, 2020). Em 2018, 66.280 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados no Brasil, principalmente nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. O câncer de mama pode apresentar uma taxa de desenvolvimento variável de acordo com o seu grau de agressividade e aparece, geralmente, depois dos 50 anos de idade (INCA, 2020). Além disso, o câncer de mama pode manifestar-se como um tumor maligno capaz de desencadear metástase no fígado, pulmões, cérebro, ossos e linfonodos próximos à mama, se não for detectado precocemente. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil relata que ainda não se conhece a causa principal do surgimento do câncer de mama. Portanto, vários fatores de risco podem atuar como agentes co-carcinogênicos tais como fatores ambientais e comportamentais, fatores hormonais e/ou fatores genéticos (INCA, 2020).

Os tratamentos convencionais são a cirurgia completa ou parcial da mama e a radioterapia, empregadas quando o tumor é localizado, e a quimioterapia, frequentemente utilizada para tratar o tumor em fase metastática (Harbeck et al. 2019). Portanto, a escolha do tratamento depende do local e do estágio do tumor. Esses tratamentos apresentam grandes chances de cura quando aplicados em estágios precoces da doença. Em estágio avançado, 20 a 35% de pacientes apresentam recorrência do tumor e metástase após cirurgia completa ou parcial (Li et al., 2015). A radioterapia, geralmente associada à cirurgia, causa danos em células normais e irritação no local da aplicação. A quimioterapia representa a administração de fármacos por via endovenosa. Os efeitos colaterais dependem do tipo de fármaco utilizado e consistem em baixa seletividade levando à morte de células normais, alopecia (perda de cabelo), distúrbios gastrointestinais, infertilidade entre outros (Sanchez-Barcelo et al., 2012). Além disso, alguns estudos ressaltaram que as células cancerígenas podem apresentar resistência aos fármacos utilizados. Portanto, a busca para novas estratégias terapêuticas se tornou uma necessidade.

Nos últimos anos, têm-se intensificado estudos utilizando compostos obtidos a partir de fontes naturais que possam contribuir para o tratamento do câncer. Os primeiros relatos referentes ao uso de planta nos tratamentos de doenças no mundo ocidental datam do século XVIII (Al-Hazzani et al. 2012). O ácido anacárdico (AA) é um composto natural isolado da espécie de caju *Anacardium occidentale*. Esta planta possui várias propriedades biológicas tais como fungicida, inseticida e atividades antioxidante e antitumoral (Al-Hazzani et al. 2012). O AA é considerado o principal princípio ativo natural do líquido da casca da castanha de caju, representando 60-65% da sua composição, e já demonstrou o seu grande potencial antitumoral contra vários tipos de cânceres como ovário (Xiu et al., 2014), adenocarcinoma de pulmão (Seong et al., 2013), mama (Schultz et al., 2010), melanoma (Mateus et al., 2014) entre outros (Hemshekhar et al., 2011). Entretanto, a aplicação do AA é limitada devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas.

Em 1971, o Paclitaxel (PTX) foi identificado e isolado da planta *Taxus brevifolia* e é utilizado, até hoje, como agente quimioterápico. O Docetaxel (DTX) é um agente citotóxico semissintético desenvolvido em 1990 a partir do Paclitaxel (Barreiro, 2015) e já demonstrou um efeito antitumoral duas vezes maior que o PTX contra vários tipos de cânceres tais como mama, ovário, pulmão, gástrico e próstata (Kang et al., 2015). Em 2010, a sua comercialização atingiu 3,1 bilhões de dólares em venda no mundo (Barreiro, 2015). O DTX comercial é composto pelo surfactante não-iônico Tween 80 e por etanol. Portanto, o seu uso clínico é limitado devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas, a sua rápida eliminação no organismo e a sua baixa seletividade e distribuição (Tan et al., 2012). Além disso, vários efeitos colaterais das suas formulações comerciais (Taxotere® e Duopafei®) foram relatadas como neutropenia, toxicidade músculo-esquelético, neuropatia periférica e reação de hipersensibilidade (Tan et al., 2012). Adicionalmente, a resposta do DTX em paciente em estágios avançados de câncer de mama é de apenas 48% (Li et al., 2015).

Diante deste cenário, o uso de terapia combinatória pode apresentar um grande potencial para o tratamento de câncer. De fato, a eficiência de tais terapias em cânceres já foi demonstrada em vários estudos com efeitos aditivos ou sinérgicos de compostos associados (Al Lazikani et al., 2012). Além disso, o *National Comprehensive Cancer Network guideline* recomenda a combinação do DTX com outras drogas como a capecitabina em paciente em estágios avançados de câncer de mama (Li et al., 2015). Adicionalmente, Hejazi e colaboradores (2015) demonstraram o efeito sinérgico do DTX

junto ao extrato de isoflavona de soja em linhagem de câncer de mama murino 4T1. Até o momento, nenhum estudo referente ao efeito da combinação do DTX junto com AA em câncer de mama foi encontrado. Dessa forma, a investigação para essa estratégia seria de grande relevância dado o potencial terapêutico de ambas moléculas.

Adicionalmente, o emprego da nanotecnologia pode ser uma promissora estratégia para melhorar os efeitos do DTX e do AA aplicados concomitantemente e minimizar os possíveis efeitos adversos. A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que estuda a utilização e o desenvolvimento de sistemas em escala nanométrica (Ferrari, 2005). Na área da saúde humana, um dos seus objetivos é a formulação de nanossistemas biocompatíveis capazes de transportar e liberar medicamentos de interesse até o alvo (Parveen et al., 2012). Vários estudos já relataram o uso de diversos nanocarreadores para transportar o DTX como lipossomos, nanopartículas lipídicas, nanoemulsões entre outros (Tan et al., 2012). Até o momento, o uso de nanocarreadores para o transporte de AA é pouco investigado. O AA é principalmente utilizado para funcionalizar e tornar mais biocompatíveis nanopartículas poliméricas e metálicas (Willi et al., 2013; Milowe et al., 2014).

Nanoemulsões são emulsões com partículas dispersas de tamanho nanométrico e apresentam diversas vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilidade e facilidade de produção em larga escala. As nanoemulsões podem ser aplicadas em várias áreas tecnológicas sendo utilizadas, principalmente, como sistema de liberação de fármacos (Anuchapreeda et al., 2012). Ganta e colaboradores (2012) ressaltaram que o efeito de DTX foi mais eficiente quando associado à nanoemulsões em câncer de ovário *in vitro*. O uso de nanoemulsões a base de óleo de soja contendo DTX também demonstrou maior eficiência em linhagem de câncer de mama MCF-7 *in vitro* e *in vivo* após administração oral em camundongos fêmeas Swiss (Sanchez barcelo et al., 2012). O uso de AA nanoencapsulado para o tratamento de câncer é ainda pouco investigado. Contudo, Al-Hazzani e colaboradores (2012) ressaltaram a atividade citotóxica do extrato de *A. occidentale* em nanoemulsões em linhagem de câncer de mama MCF-7.

A maioria dos estudos referente à síntese de nanoemulsões utilizam óleo de soja devido ao fácil acesso e baixo custo. Entretanto, a combinação das propriedades de outro tipo de óleo pode ser de grande relevância. O pequi da espécie *Caryocar brasiliense* Camb é uma importante cultura originária do Brasil e é principalmente encontrado nas regiões do bioma cerrado. O extrato da fruta do pequi é considerado uma fonte natural de

compostos antioxidantes como vitamina C, carotenóides, compostos fenólicos e óleos essenciais (Colombo et al., 2012). Colombo e colaboradores (2012) demonstraram a diminuição do estresse oxidativo e dos danos no DNA após aplicação do óleo de pequi em células de câncer de pulmão. Além disso, o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti já desenvolveu com sucesso nanoemulsões a base de óleo de pequi (Silva et al., 2015; Rocha et al., 2014). Adicionalmente, essas nanoemulsões apresentaram um efeito terapêutico promissor e de maior eficiência, em comparação com o óleo de pequi livre, em linhagem de câncer de mama MCF-7 (Rocha et al., 2014). Dessa forma, o uso do óleo de pequi na formulação de nanoemulsões pode levar a um efeito aditivo e/ou sinérgico na atividade antitumoral.

Considerando-se a necessidade do desenvolvimento de estratégias terapêuticas complementares às convencionais para o câncer de mama, a proposta do presente trabalho busca investigar os efeitos de um tratamento combinado, associando-se óleo de pequi, ácido anacárdico e docetaxel com o objetivo de induzir efeito antitumoral promissor, com a redução das doses necessárias para cada composto, e a minimização de efeitos adversos em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama triplo negativo. Para isso, o trabalho utilizará conceitos e contará com ferramentas da nanotecnologia para o desenvolvimento de nanoemulsões capazes de carrear os compostos antitumorais de interesse, os quais apresentam natureza hidrofóbica, visando otimizar sua administração e interação com as células-alvo.

A presente tese está estruturada da seguinte forma: revisão da literatura; objetivos geral e específicos; capítulos referentes aos resultados; conclusão; perspectivas e anexos. Os três primeiros capítulos já se encontram na forma de artigo. Os capítulos I e II tratam do desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE) (Capítulo I) e investigação dos possíveis mecanismos de ação em células de câncer de mama (4T1), *in vitro* (Capítulo II). Os capítulos III e IV referem-se à investigação da associação do docetaxel e do ácido anacárdico a nanoemulsão à base de óleo de pequi como terapia combinatória em células de câncer de mama (4T1) *in vitro* (capítulo III) e *in vivo* (Capítulo IV).

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer – carcinogênese e *hallmarks*

O câncer representa um conjunto de doenças caracterizadas pela presença de células em crescimento contínuo e descontrolado (INCA, 2020). É a segunda doença crônica não transmissível de maior incidência no Brasil e no mundo com aproximadamente 8,8 milhões de morte por ano (INCA, 2020).

A formação do câncer conhecida como carcinogênese, na maioria das vezes, é de progressão lenta e requer múltiplas etapas (Figura 1).

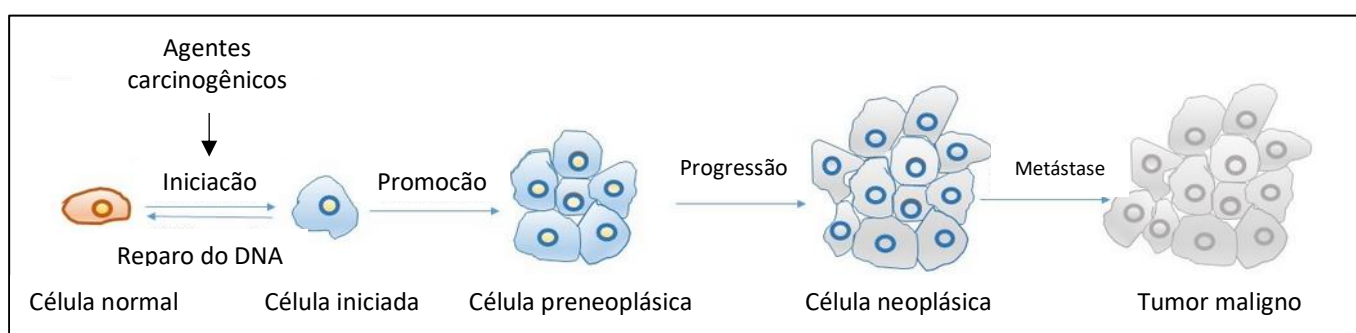


Figura 1. Etapas da carcinogênese. A célula normal se transforma em tumor maligno após passar por várias fases: iniciação, promoção, progressão e metástase onde o tumor se espalha no organismo. Adaptado de: [https://med.libretexts.org/Courses/American_Public_University/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_\(Byerley\)/Text/07%3A_Nutrition_and_Cancer/7.02%3A_Carcinogenesis](https://med.libretexts.org/Courses/American_Public_University/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_(Byerley)/Text/07%3A_Nutrition_and_Cancer/7.02%3A_Carcinogenesis) (acessado em novembro de 2020).

A iniciação do tumor é o primeiro estágio da carcinogênese. Durante esta fase, as células sofrem modificações genéticas após exposição aos agentes carcinógenos químicos, físicos e/ou biológicos (Weinberg, Douglas 2017). O segundo estágio da carcinogênese é a promoção tumoral onde o tecido hiperplásico passa a ser chamado de tecido displásico (Weinberg, Douglas 2017). A fase é reversível e está associada à exposição prolongada de agente carcinógeno que resulta em um aumento anormal da proliferação celular e de alterações na expressão gênica (Oliveira et al. 2007). Dessa forma, o DNA modificado é transferido para as células filhas e o tumor se expande. As células alteram sua morfologia e função de origem, mas ainda é considerado como benigno (Weinberg, Douglas 2017). A última etapa da carcinogênese é a de progressão. As células modificadas se multiplicam de forma descontrolada e adquirem a capacidade de invadir outros tecidos por vias linfáticas e a partir da angiogênese, o processo de formação de novos vasos sanguíneos. Dessa forma, as células tumorais podem entrar em

metástase, se espalham nos tecidos próximos ou distantes do sitio inicial e formam o câncer maligno propriamente dito (Oliveira et al. 2007).

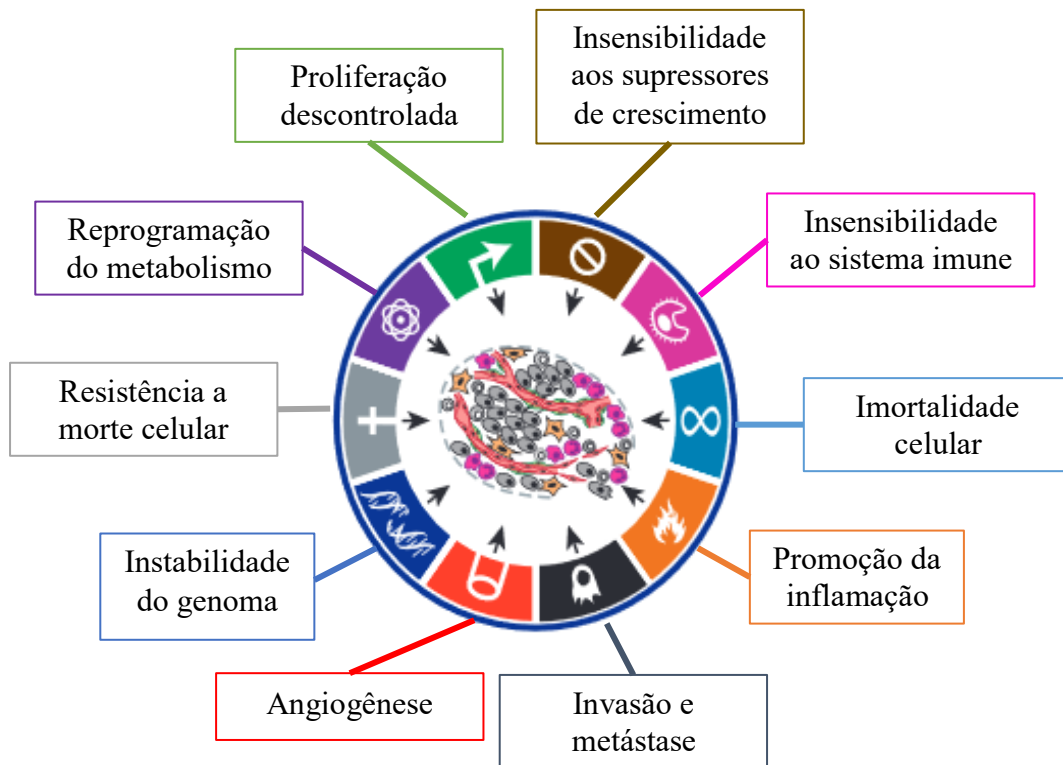


Figura 2. Características adquiridas pelas células ao longo da carcinogênese (*Hallmarks of cancer*). Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2017.

Ao longo da carcinogênese, o tecido tumoral passa a adquirir várias características, como as ilustradas na figura 2. Uma desregulação na resposta dos sinais supressores à divisão celular leva as células a adquirir a característica fundamental de célula tumoral, a proliferação descontrolada. Dessa forma, as células se replicam infinitamente e se tornam resistentes aos sinais de morte celular. Além disso, a angiogênese possibilita que as células cancerígenas recebam os nutrientes e o oxigênio necessários para o crescimento, assim como propicia a sua invasão em outros tecidos e, conseqüentemente, o processo de metástase (Weinberg, Douglas 2017).

2.1.1 Câncer de mama

Depois do câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais comum dentre as mulheres e representa mais de 29,5 % dos casos de câncer no Brasil (INCA,

2020). No Brasil, 17.763 mortes devido ao câncer de mama foram registradas em 2018 e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima a 66.280 novos casos em 2020.

Diversos fatores de riscos participam ao desenvolvimento do câncer de mama e podem agir como agentes co-carcinogênicos tais como fatores ambientais (exposição a raios x) e comportamentais (sobrepeso / obesidade, consumo de álcool, tabagismo e sedentarismo), fatores hormonais (pílula anticoncepcional oral e terapia de reposição hormonal), história reprodutiva (menarca, gravidez, amamentação e menopausa) e/ou fatores genéticos e hereditários (Rudolph et al., 2018; INCA, 2020). Fatores genéticos estão associados a mutações em alguns genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM* e *CHEK2*) que são transmitidos aos descendentes e aumentam os riscos de desenvolver o câncer de mama (Kapoor et al., 2020).

Como todo tipo de câncer, o diagnóstico precoce da doença permite maior chance de cura e diminuição da mortalidade entre os pacientes. As técnicas mais usadas para diagnosticar o *câncer de mama* são mamografia, ressonância magnética, ultrassom, tomografia computadorizada, tomografia por emissão de pósitrons e biópsia (Wang 2017). Outras técnicas baseadas em biomarcadores também podem ser empregadas como radioimunoensaio, imuno-histoquímica, ensaio imunoenzimático (ELISA) e fluoroimunoensaio (Wang 2017). As proteínas Ki67, PCNA e MCM são um dos biomarcadores de proliferação celular mais usados no diagnóstico do câncer de mama (Jurikova et al., 2016). O câncer de mama pode apresentar uma taxa de desenvolvimento variável de acordo com o seu grau de agressividade e aparece, geralmente, depois dos 50 anos de idade (INCA, 2020). Além disso, o câncer de mama pode manifestar-se como um tumor maligno capaz de desencadear metástase no fígado, pulmões, cérebro, ossos e linfonodos próximos à mama, se não for detectado precocemente.

A classificação do câncer de mama evoluiu ao longo dos anos e se tornou cada vez mais específica se baseando em características histológicas e moleculares (Harbeck et al. 2019). De acordo com características histológicas, o câncer de mama se divide principalmente em carcinoma ductal (70-75%) e carcinoma lobular (10-14%) quando as células são provenientes de células do ducto e do lóbulo mamário, respectivamente. Outros 17 subtipos (tubular, cribriforme, mucinoso, carcinoma lobular pleiomórfico, carcinoma metaplásico de alto grau e carcinoma micropapilar entre outros) também são relatados pela Organização Mundial da Saúde (WHO) (Harbeck et al. 2019). Entretanto,

a classificação mais usada na clínica se baseia nas características moleculares e divide o câncer de mama em cinco grupos principais: luminal tipo A (60-70%), luminal tipo B com receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 negativo (HER2-) (10-20%), HER2 positivo do tipo não luminal e luminal tipo B HER2+ (13-15%) e triplo negativo (10-15%). O subtipo triplo negativo se define pela ausência de expressão dos receptores a estrogênio (ER), progesterona (PR) e HER2. Ele representa o tipo mais agressivo, com grande potencial de desencadear metástase e baixo prognóstico (Garrido-Castro et al., 2019).

A escolha do tratamento depende do subtipo e do estágio do tumor. Os tratamentos mais convencionais são a cirurgia completa ou parcial da mama (mastectomia), a radioterapia, a quimioterapia, a hormonioterapia (terapia hormonal) e a imunoterapia. A cirurgia representa o tratamento principal do câncer de mama e é usada na maioria dos casos em associação com outras terapias para garantir eliminação total do tecido tumoral. Todavia, como toda intervenção cirúrgica, há riscos para o paciente e impacto emocional pós-operação é elevado. A radioterapia, geralmente associada à cirurgia (antes e, principalmente depois), consiste em expor o paciente à radiação ionizante que causa danos ao material genético das células e morte celular. Entretanto, essa terapia causa também danos em células normais e irritação no local da aplicação (Moo et al., 2019). A quimioterapia consiste na administração de fármacos do tipo bloqueadores endócrinos, antraciclinas ou quimioterápicos baseados em taxano por via endovenosa. Contudo, a baixa seletividade com morte de células normais, efeitos adversos e surgimento de resistência aos fármacos podem ser reportados. No caso do câncer de mama com receptores hormonais positivos (ER + / PR +), a terapia hormonal é usada com administração de tamoxifeno que se liga ao ER e inibe seu efeito no crescimento tumoral. Quando o tumor está avançado, o tamoxifeno é administrado em conjunto com hormônio liberador de gonadotrofina (Harbeck et al. 2019). Mais recente, a imunoterapia demonstra potencial no tratamento do câncer de mama com a aplicação de anticorpos monoclonais como o transtuzumab e o bevacizumab para estimular o sistema imunitário do paciente e levar as próprias células de defesa a combater o tumor (Meulendijks et al. 2016). Esses tratamentos apresentam grandes chances de cura quando aplicados em estágios precoces da doença. Entretanto, suas limitações tornam necessário a busca e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Nos últimos anos, têm-se intensificados estudos

utilizando compostos obtidos a partir de fontes naturais que possam contribuir para o tratamento do câncer.

2.2 Terapia combinatória

Devido à complexidade e heterogeneidade da massa tumoral a aplicação de um único tratamento é cada vez menos usada. De fato, a monoterapia pode não ser suficiente para controlar todas as células cancerosas e aumenta a possibilidade de recorrência do câncer. A outra desvantagem da terapia única é a necessidade de prolongar o tratamento por mais tempo o que pode levar as células a desenvolverem resistência (Bhatia et al., 2020). Portanto, a associação de várias terapias representa estratégia eficaz no combate ao câncer. A terapia combinatória pode ser a combinação de duas terapias tais como radioterapia e cirurgia, radioterapia e imunoterapia, quimioterapia e imunoterapia entre outras. Adicionalmente, a combinação de várias drogas em quimioterapia também consiste em terapia combinatória (Bhatia et al., 2020).

O uso de vários fármacos permite focar o tratamento em diversos alvos celulares, aumentar sua eficácia por efeito de sinergismo ou aditivo, diminuir doses e, conseqüentemente, minimizar efeitos adversos e resistência (Mokhtari et al., 2017; Bhatia et al., 2020). A conceptualização da terapia combinatória surgiu em 1965 com a associação de metotrexato, 6-mercaptopurina, vincristina e prednisona no tratamento sucedido de leucemia aguda pediátrica (Al-Lazikani et al., 2012; Bayat et al., 2017). Entretanto, é importante levar em consideração o desenho experimental da terapia combinatória para determinar o tipo de fármaco e seu alvo celular, a dose de cada fármaco, a ordem de aplicação no paciente e o tempo de tratamento (Chen et al., 2016).

O interesse para uso de produtos naturais de origem vegetal como agente anticâncer cresce cada vez mais ao longo dos anos. Principalmente utilizados em medicina tradicional, extratos de plantas são compostos por diversas classes de moléculas tais como flavonóides, alcalóides, polissacarídeos, óleos essenciais, quinonóides, terpenóides, cumarinas e saponinas (Zhang et al., 2020). A associação dessas moléculas com quimioterápicos representa nova opção para o tratamento do câncer de mama.

2.2.1 Óleo de pequi

A biodiversidade brasileira representa uma fonte rica de produtos naturais. A família *Caryocaraceae* está dividida em 26 espécies diferentes distribuídas em 2 gêneros: *Caryocar* e *Anthodiscus*. A espécie mais estudada é *Caryocar brasiliense* Camb., popularmente conhecida como pequizeiro, piqui, pequi, pequiá, amêndoa do espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil, e é originária do bioma Cerrado (Nascimento-Silva e Naves, 2019). O termo “pequi” possui como origem o tupi-guarani, idioma indígena, e significa “pele de espinho” (*py* (pele) e *qui* (espinho)) (Amaral et al., 2014).

O pequi representa grande valor econômico para o país com uma produção nacional de 27.183 toneladas em 2019 e receita de mais de 3 milhões de reais para os diferentes extrativistas (<http://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2019>; Conab B, 2019).

O pequi é dividido em epicarpo, mesocarpo externo, mesocarpo interno e endocarpo espinhoso (Figura 3A). A polpa do pequi corresponde ao mesocarpo externo e interno e é rica em carotenoides, vitaminas, polifenóis, zinco, magnésio, fibras, cálcio e lipídeos. A quantidade de carotenoides varia de acordo com a região de plantação do pequi e lhe confere sua coloração amarela. O endocarpo espinhoso possui o papel protetivo da semente ou amêndoa que é rica em proteínas, lipídeos e fibras (Nascimento-Silva e Naves, 2019).

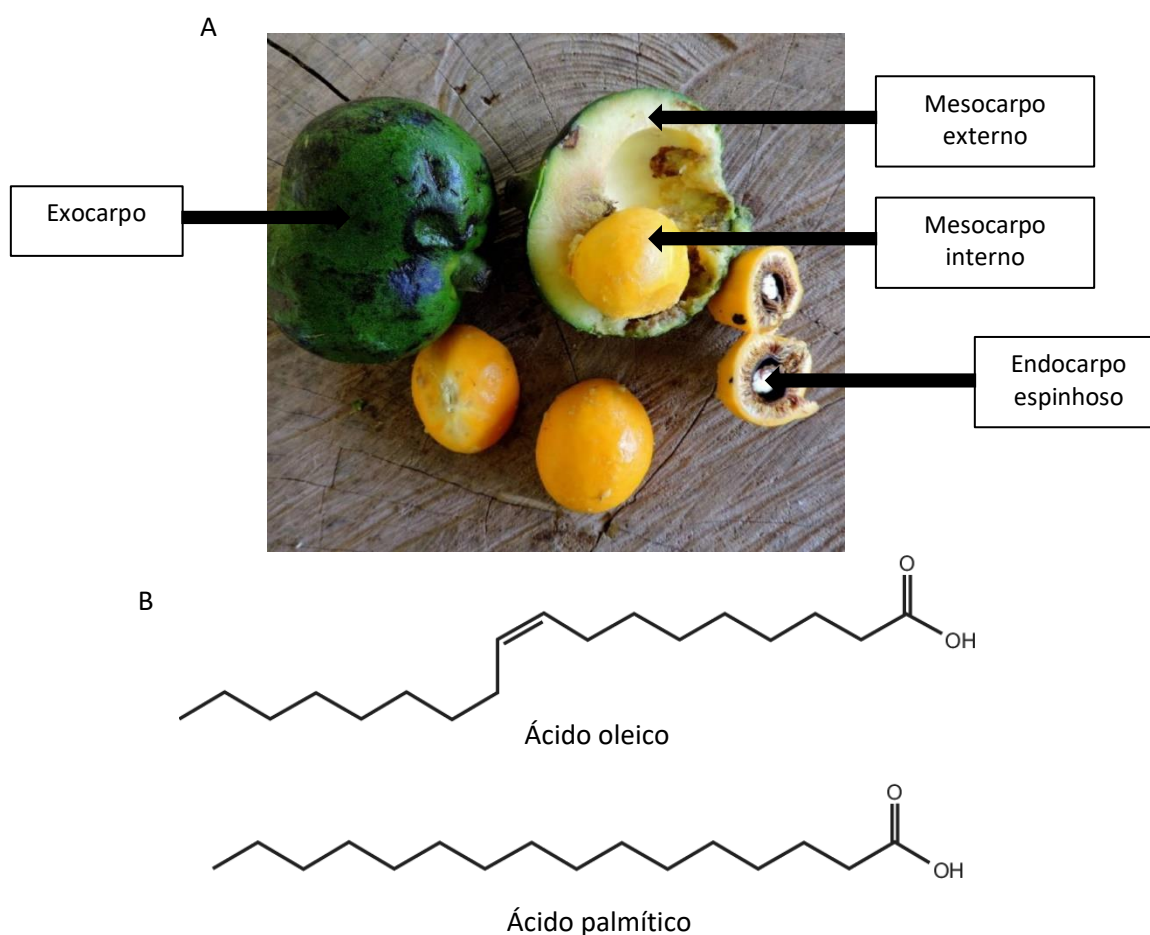


Figura 3. (A) Aspecto da fruta do pequi. (B) Estrutura química do ácido oleico e do ácido palmítico, principais ácidos graxos do pequi.

Fonte: <https://paladar.estadao.com.br/noticias/comida,pequi-o-rei-do-cerrado-da-polpa-a-castanha,70001648354> com adaptação.

O óleo do pequi, originário da polpa e da semente, possui grande quantidade de ácidos graxos insaturados e saturados como ácido oleico (~50%) e ácido palmítico (~40%), respectivamente (Figura 3B). Principalmente usado na culinária nacional, várias comunidades indígenas usam o pequi e seu óleo para fins medicinais para tratar diversas enfermidades como doenças respiratórias, edema, problemas oftálmicos relacionados à baixa ingestão de vitamina A, queimaduras, cicatrização de feridas, hematomas, inchaço e distúrbios menstruais (Miranda-Vilela et al., 2009; Torres et al., 2018; Roll et al., 2018). Ao longo dos anos, o óleo de pequi e suas atividades biológicas chamou a atenção para os setores farmacêutico e cosmético.

A administração oral do óleo de pequi apresentou efeito antioxidante com a diminuição de lesões hepáticas causadas por estresse oxidativo em ratos submetidos a exercício físico intenso (400 mg/kg) (Vale et al., 2019), efeitos anti-inflamatório e analgésico em camundongos submetidos a processos de inflamação (1000 mg/kg) (Jorge et al., 2020), efeito protetor contra anemia, inflamação e estresse oxidativo (Roll et al., 2018) e redução da taxa de colesterol total em camundongos (Silva et al., 2020). Adicionalmente, o seu uso em modelo animal apresentou segurança na concentração de 1000 mg/kg sem efeitos genotóxico e clastogênico significantes (Traesel et al. 2017).

O efeito do óleo de pequi na prevenção e no tratamento do câncer, também é reportado. Colombo e colaboradores (2015) mostraram que a suplementação oral com óleo de pequi diminuiu os danos ao DNA e a peroxidação lipídica em um modelo de carcinogênese pulmonar induzida quimicamente, *in vivo* (Colombo et al. 2015). Em modelos animais de câncer de mama, a suplementação oral de óleo de pequi inibiu o crescimento do tumor (Miranda-Vilela et al. 2011), reduziu os efeitos colaterais induzidos pela quimioterapia (Miranda-Vilela et al. 2014) e potencializou os efeitos anticâncer da terapia de hipertermia magnética (Miranda-Vilela et al., 2013). O óleo de pequi demonstrou efeito de quimioprevenção reduzindo lesões hepáticas em modelo de câncer de fígado *in vivo*, após administração oral diária por 25 semanas na dose de 400 mg/kg (Palmeira et al. 2016).

2.2.2 Ácido anacárdico

O cajueiro da espécie *Anacardium occidentale* L. é originária do Brasil, e foi introduzido em outras partes do mundo como Ásia e África. Conhecido pelo seu fruto (castanha) e seu pseudofruto, ou pedúnculo (caju) consumido na forma de suco ou doces, o cajueiro representa importância econômica para o Brasil. De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a safra de 2020 levou à produção de 149,1 mil toneladas de castanhas de caju e coloca o Brasil como um dos países de maior produção no mundo após a Índia e o Vietnã (IBGE, 2020).

O fruto propriamente dito, a castanha do caju, é protegido por uma casca que foi considerada por muito tempo como desperdício no agronegócio. Entretanto, a casca é composta por um líquido viscoso denominado líquido da casca da castanha de caju (LCCC) e representa subproduto de grande importância biológica. De fato, o LCCC

representa 25% do peso da castanha e possui naturalmente diversas biomoléculas como ácido anacárdico (AA) (60-65%), cardol (15-20%) e cardanol (10%) (Figura 4). A proporção dessas moléculas pode variar de acordo com o método de extração. Com uso de elevada temperatura ou uso de solvente, o ácido anacárdico tende a formar cardanol por descarboxilação (Morais et al. 2017).

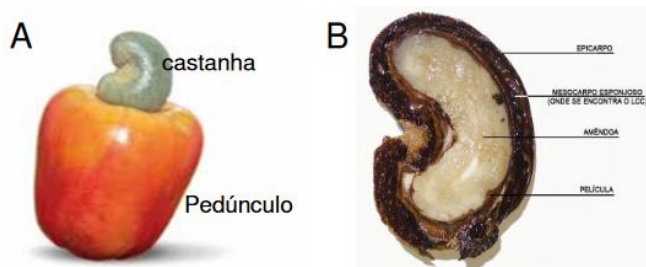


Figura 4. Produtos do cajueiro: castanha e pedúnculo (A). Partes da castanha: epicarpo, mesocarpo (onde se encontra o líquido da casca da castanha de caju), amêndoa e película (B).

Os AAs, também citados na literatura como ácido 6-pentadecilsalicílico ou ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico, são compostos fenólicos apolares derivados do ácido salicílico. Eles apresentam um anel fenólico com grupo metila e longa cadeia lateral constituída por 2 a 17 carbonos. Os AAs contendo 15 carbonos na cadeia lateral são os principais encontrados no LCCC e podem ser saturados ou insaturados com até 3 insaturações (Figura 5). Essas variações na estrutura química do AA influenciam diretamente na atividade biológica (Morais et al. 2017).

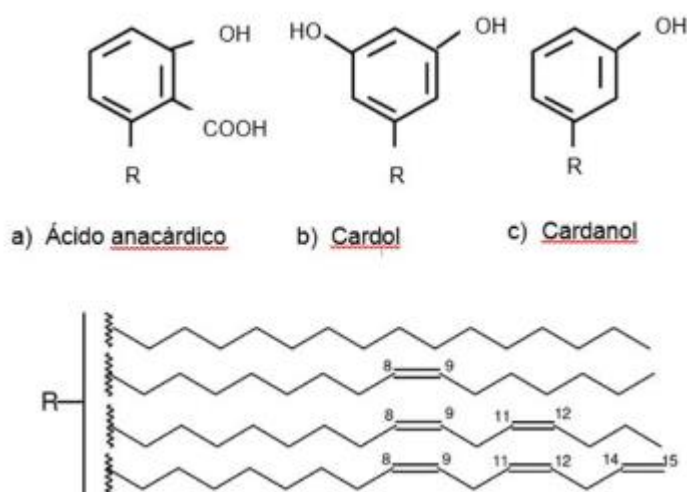


Figura 5. Principais componentes do líquido da casca da castanha de caju. (Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2011).

O AA apresenta várias atividades biológicas tais como fungicida, inseticida, antibacteriano, antioxidante (Hamad&Mubofu, 2015) e ansiolítico (Gomes Junior et Al., 2020). Além disso, o AA também apresenta potencial efeito antitumoral em vários tipos de câncer como de pâncreas (Park, et al., 2018), próstata (Tan et al. 2017), pulmão (Seong et al., 2014) e mama (Zhao et al. 2018). O mecanismo de ação do AA em células tumorais ainda está sob investigação. Porém, o AA já demonstrou induzir apoptose em células de câncer de próstata através estresse do retículo endoplasmático e via de sinalização DAPK3/Akt (Tan et al. 2017). Em células de câncer de pâncreas, o AA levou à morte celular via ativação de Chmp1A, ATM e p53. Adicionalmente, a ação citotóxica dos agentes 5-fluorouracil e gemcitabina foi melhorada com a associação do AA, *in vitro* (Park, et al., 2018). Zhao e colaboradores (2018) reportaram que o AA inibiu proliferação celular, induziu bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, impediu migração e invasão celular e levou à morte celular por apoptose em células de câncer de mama MDA-MB-231, *in vitro* (Zhao et al. 2018).

2.2.3 Docetaxel

O quimioterápico docetaxel (DTX) é um agente citotóxico semissintético desenvolvido em 1990 a partir do Paclitaxel (PTX), outro quimioterápico identificado e isolado da planta *Taxus brevifolia* em 1971 (Barreira&Fraga, 2015) (Figura 6). Mais recente, foi descoberto que outra espécie da família Taxaceae, *Taxus baccata*, contém em grande quantidade a molécula 10-desacetilbaccatina III que pode ser convertida em PTX e DTX (Brandão et al., 2010). O DTX faz parte dos taxanos de segunda geração e já demonstrou efeito antitumoral duas vezes maior que o PTX contra vários tipos de cânceres tais como mama, ovário, pulmão, gástrico e próstata (Kang et al., 2015). Além disso, o DTX apresenta farmacocinética linear e é retido no organismo por mais tempo (Herbst and Khuri 2003). Em 2010, a sua comercialização atingiu 3,1 bilhões de dólares em venda no mundo (Barreiro & Fraga, 2015).

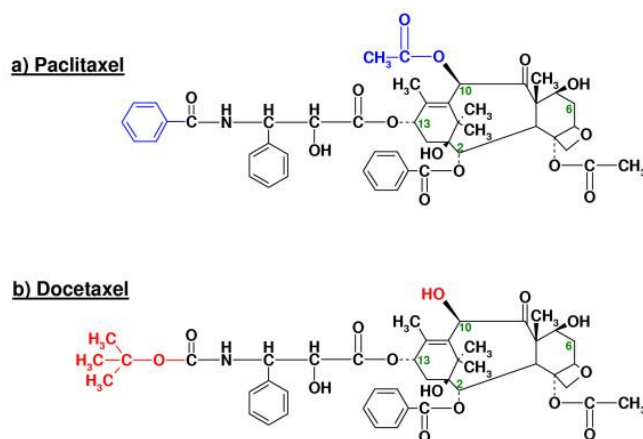


Figura 6. Estrutura química do paclitaxel e do docetaxel.

O DTX possui diversos alvos. Ele é principalmente considerado como agente antimicrotúbulo. Ele promove a montagem da microtubulina e associa-se a tubulina impedindo a despolarização e inibindo a dinâmica dos microtúbulos. Assim, ocorre bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e, conseqüentemente, diminuição da proliferação celular (Herbst and Khuri 2003). O DTX interfere também no efeito da proteína BCL-2 que pertence à família dos oncogenes Bcl-2, pró- e anti-apoptóticos. Redução da expressão da BCL-2 induz apoptose, enquanto aumento da sua expressão previne ou atrasa o processo de morte celular. O DTX age na fosforilação da BCL-2, inibindo seu efeito anti-apoptótico (Herbst and Khuri 2003).

O DTX comercial é composto pelo surfactante não-iônico Tween 80 e por etanol. Portanto, o seu uso clínico é limitado devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas, a sua rápida eliminação no organismo e a sua baixa seletividade e distribuição [15]. Além disso, vários efeitos adversos das suas formulações comerciais (Taxotere® e Duopafei®) foram relatados como neutropenia, toxicidade músculo esquelético, neuropatia periférica e reação de hipersensibilidade. Adicionalmente, a resposta do DTX em paciente em estágios avançados de câncer de mama é de apenas 48% (Li et al., 2015).

Portanto, apesar de apresentar efeito antitumoral como monoterapia, a associação do DTX com outras moléculas pode permitir maior eficácia e diminuir efeitos adversos. O *National Comprehensive Cancer Network guideline* (Diretriz da rede nacional abrangente do câncer) recomenda a combinação do DTX com outros fármacos como a capecitabina

em paciente em estágios avançados de câncer de mama (Li et al., 2015). Tratamentos baseados na associação do DTX com cisplatina também demonstraram resultados promissores em paciente com câncer de mama triplo negativo (Fan et al., 2013). Adicionalmente, Hejazi e colaboradores (2015) reportaram o efeito sinérgico do DTX junto ao extrato de isoflavona de soja em linhagem de câncer de mama murino 4T1 (Hejazi et al., 2015).

Entretanto, devido ao caráter hidrofóbico do óleo de pequi, AA e DTX, a administração dessas moléculas no organismo é limitada. Assim, o uso da nanotecnologia apresenta-se como boa opção para a aplicação por diferentes vias de administração (intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, oral entre outros).

2.3 Nanociência, Nanotecnologia e Nanomedicina

A nanociência surgiu na metade do século XX e se torna cada vez mais uma área importante para a progressão da ciência no mundo. Nos Estados Unidos, a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (*Nacional Nanotechnology Initiative* -NNI) recebeu investimento de US\$ 1,86 bilhões em 2019. A estimativa para 2021 é financiamento de mais de US\$ 1,7 bilhões (National nanotechnology initiative 2021 budget, 2020). No Brasil, o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) implementa oficialmente a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN) através da portaria nº 3.549 publicada em julho de 2019 como principal programa estratégico para incentivo da nanotecnologia no país. O Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO), parte integrante do IBN como ação estratégica, recebeu R\$ 88 milhões entre 2013 e 2018. Em 2019, a chamada CNPq/MCTIC nº18/2019 oferece R\$ 6 milhões para cada proposta selecionada (CNPq, 2019).

O prefixo “nano” vem do grego “*nanos*” e significa “anão”. A nanociência se define como ciência multidisciplinar que estuda estrutura e matéria em escala nanométrica (10^{-9} metros). Ainda não há consenso sobre os limites da escala nanométrica. De fato, algumas definições incluem estruturas de 1 a 100 nm, enquanto outras ampliam para 1000 nm. O termo nanotecnologia representa a aplicação da nanociência com o desenvolvimento de sistemas nanométricos em diversas áreas como engenharia, informática, farmacêutica, cosmética entre outras (Bayda et al. 2020).

Alguns relatos antigos reportam a aplicação da nanotecnologia. Pode-se citar a taça de Lycurgus do século IV do império romano e os vitrais de igrejas. Ambos materiais possuem a capacidade de mudar de coloração de acordo com exposição da luz. Essa característica está associada à composição da taça e dos vitrais por nanopartículas metálicas (ouro, prata, cobre). Adicionalmente, em 1857, o físico e químico Michael Faraday observou a mudança de coloração em solução de ouro que foi associada à variação de tamanho de nanopartículas (Faraday, 1857; Bayda et al., 2020).

A história contemporânea da nanotecnologia inicia na metade do século XX. Em 1959, o físico americano Richard Feynman apresentou uma palestra intitulada “There’s Plenty of Room at the Bottom” (“Há muito espaço em baixo”) e enfatizou a ideia da possibilidade de manusear matéria a nível molecular. Em 1974, o japonês Niro Taniguchi foi o primeiro a definir o termo de nanotecnologia. Em paralelo, o surgimento e a aperfeiçoamento de novas ferramentas de estudo permitiu investigar e entender cada vez melhor os nanomateriais tais como microscopias eletrônicas, microscopia de força atômica ou de tunelamento. Alguns anos depois, o engenheiro e nanotecnólogo Eric Drexler popularizou o termo e o conceito de nanotecnologia com a sua ideia visionária e ficcional de reproduzir mecanicamente a biologia celular (Drexler 1981). Ele também participou da publicação de um livro em 1991 intitulado “*Unbounding the future: the Nanotechnology Revolution*” (Desimpedindo o futuro: a revolução da nanotechnology) que popularizou o termo “nanomedicina” (Bayda et al. 2020).

A nanomedicina é a aplicação da nanotecnologia na área da medicina para melhorar diagnóstico e tratamento de diversas doenças. As prioridades da nanomedicina no caso de câncer são de aumentar a eficácia dos tratamentos minimizando os efeitos adversos tóxicos (Ullah et al. 2020). Assim, o desenvolvimento de sistema de liberação de fármaco com alta estabilidade, poder protetor para o fármaco e aumento da especificidade do tratamento cresce cada vez mais. Em 1995, o primeiro medicamento baseado em nanomedicine, o Doxil® (doxorubicina lipossomal), foi aprovado para uso clínico. Alguns anos depois, em 2005, o Abraxane® (nanopartículas com paclitaxel ligadas a albumina) também foi liberado pela FDA para o tratamento de câncer de mama e pâncreas (Ullah et al. 2020).

A acumulação e retenção de NPs na região tumoral foi por muito tempo atribuído ao efeito EPR e difusão passiva pelas fenestras dos vasos sanguíneos (Wilhelm et al.,

2016). Contudo, esse conceito se tornou cada vez mais controverso e estudos explorados em meta-análise demonstraram que a entrada passiva de NPs no microambiente tumoral representa menos de 1% (Wilhelm et al., 2016). Portanto, a via de entrada mais aceita atualmente é a via trans-endotelial baseada na entrega ativa e com 97% de NPs acumuladas no tecido neoplásico (Sindhvani et al. 2020; Moghimi & Simberg, 2018). Contudo, os mecanismos de ação para entrada de NPs ainda estão sendo investigados. Sabe-se que células endoteliais apresentam mecanismo de transporte de pequenas moléculas por transcitose (combinação de endocitose e exocitose) via formação de vesículas intracelulares. Foi observado que a produção de vesículas ocorre com maior frequência nas células endoteliais quando comparado com a frequências de fenestras inter-endoteliais. Sindwani e colaboradores (2020) demonstraram que essas vesículas são usadas para entrada de NPs na região tumoral, incluindo em modelo *in vivo* de câncer de mama 4T1 (Sindhvani et al. 2020).

Assim, as NPs podem liberar seu conteúdo no microambiente tumoral ou agir por dentro das células neoplásicas ao serem internalizadas por meio da endocitose (fagocitose e pinocitose). Basicamente, a fagocitose consiste na internalização de partículas por fagossoma, compartimento intracelular formado a partir da membrana plasmática. NPs podem também ser internalizadas a partir da opsonização, caracterizada pela associação de proteínas na superfície dos nanomateriais. Essas proteínas podem interagir com os receptores das células neoplásicas e induzir fagocitose. Outro mecanismo envolvido na internalização de NPs é denominada pinocitose e se divide em 4 categorias de acordo com complexo molecular envolvido: endocitose mediada por receptores de clatrina ou caveolina, endocitose independente de clatrina e caveolina, e macropinocitose (Kou et al., 2013).

Vale ressaltar que as propriedades e características das NPs tais como tamanho, formato, composição da superfície podem interferir nos mecanismos de entrega e internalização. Existem vários tipos de nanopartículas (NPs) que podem ser utilizadas no diagnóstico e no tratamento do câncer de mama (Figura 7). Cada tipo apresenta propriedades diferenciadas e as NPs podem ser classificadas como orgânicas, baseadas em lipídeos ou polímeros, e inorgânicas, baseadas em metal ou carbono. A biocompatibilidade das NPs orgânicas representa vantagem para serem empregadas no tratamento do câncer de mama como plataforma para transporte e liberação de fármaco.

Além disso, novas classes de NPs foram desenvolvidas ao longo dos anos e consistem em funcionalizar a superfície das partículas com moléculas tais como aptâmero, anticorpo, polímero, proteína/peptídeo entre outros com objetivo de melhorar especificidade, internalização, biocompatibilidade, proteção contra degradação precoce no organismo e, assim melhorar eficácia no tratamento (Jain et al. 2020).

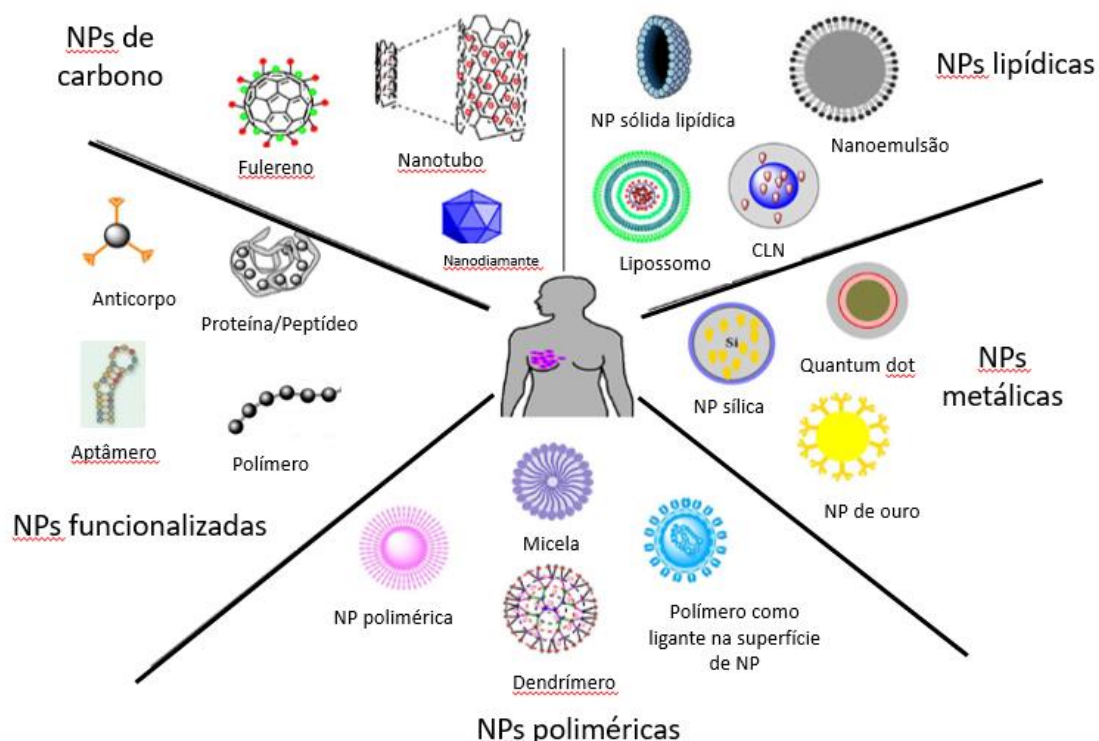


Figura 7. Tipos de nanopartículas utilizadas no diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Adaptado de Jain et al., 2020.

Neste estudo, nanoemulsão foi o nanocarreador escolhido como sistema de liberação de fármaco por apresentar diversas vantagens tais como biocompatibilidade e facilidade de produção em larga escala para aplicações oncológicas (Kumar et al. 2019) (Kumar & Divya, 2015; Harwansh et al., 2019; Tared & Sainsbury, 2018).

2.3.1 Nanoemulsão

Nanoemulsão refere-se a um sistema coloidal constituído por uma fase oleosa e uma fase aquosa estabilizadas por um emulsificante. A nanoemulsão pode ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) nas quais a fase dispersa forma gotículas na escala nanométrica dentro da fase dispersante (Figura 8). Outros tipos menos comuns de nanoemulsão também podem ser encontrados. São as nanoemulsões múltiplas como óleo

em água em óleo (O/A/O) ou água em óleo em água (A/O/A) (McClements and Jafari 2018).

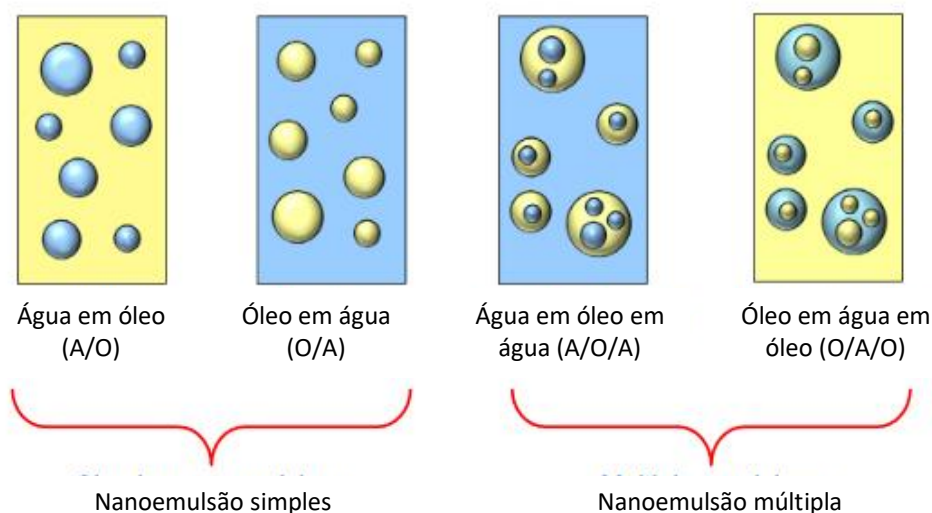


Figura 8. Tipos de nanoemulsões. Fonte: Adaptado de McClement&Jafari, 2018, (doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1)

Uma nanoemulsão pode ser obtida a partir de várias técnicas de alta ou baixa energia. Os métodos de alta energia englobam ultrasonicação, homogeneização de alta pressão e microfluidização. Uma das vantagens de usar essas metodologias são o melhor controle do tamanho das gotículas e a diminuição da quantidade de emulsificante (Kumar et al. 2019). Dentre as técnicas de baixa energia, podem ser citadas a emulsificação por transição de fase (por temperatura, composição ou ponto de inversão) e auto-nanoemulsificação (Kumar et al. 2019).

A ultrasonicação é considerada como técnica de alta energia mais simples em termo operatório. O método consiste em aplicar ondas ultrassônicas na solução para formar nanogotículas. Tempo de aplicação, intensidade de ultrassom e natureza dos componentes da nanoemulsão influenciam nas características físico-químicas das nanogotículas (Kumar et al. 2019). Geralmente, o tamanho da nanoemulsão se mantém inferior a 500 nm. Porém, alguns estudos restringem mais ainda o diâmetro da nanoemulsão entre 20 e 200 nm.

A nanoemulsão apresenta-se instável termodinamicamente, mas estável cineticamente (Gupta et al., 2016). Essa estabilidade ao longo do tempo, em condições de armazenamento adequadas, torna a nanoemulsão boa candidata para o tratamento do

câncer de mama como sistema de liberação de fármaco (Kumar et al. 2019; Sánchez-López et al. 2019). Entretanto, instabilidade pode acontecer com fenômenos do tipo floculação, sedimentação, cremagem, coalescência e efeito *Ostwald ripening* (Kumar et al. 2019; McClements and Jafari 2018). A adição de ligantes na superfície das nanogotículas pode contribuir com maior estabilidade. Além disso, a associação de moléculas nas partículas da nanoemulsão pode aprimorar as interações com células neoplásicas e assim, melhor a eficácia do tratamento. Faria (2020) reportou a sucedida associação de ácido fólico com nanoemulsão à base de óleo de pequi. A ligação do polímero PEG e da vitamina folato em nanoemulsão demonstrou maior eficácia na redução tumoral em modelo de câncer de mama, *in vivo*, devido ao melhor direcionamento das partículas para a região tumoral (2 a 5 vezes maior) quando comparado com controles (Afzal, Shareef, and Kishan 2016).

O emulsificante (surfactante ou tensioativo) é uma molécula anfifílica que apresenta parte hidrofílica e parte hidrofóbica. Essa característica permite a associação com fase oleosa e fase aquosa para estabilizar a nanoemulsão. Diversos tipos de emulsificante podem ser utilizados como os não iônicos, catiônicos, aniônicos e anfótero (também conhecido como zwitterion) (Gurpreet & Singh, 2018). A natureza do emulsificante influencia as propriedades da nanoemulsão tais como carga de superfície, diâmetro, espessura entre outras. Além disso, o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) do emulsificante deve ser considerado para a escolha adequada de acordo com o tipo de nanoemulsão desejado, sua aplicação e o tipo de óleo usado na formulação. O EHL consiste na razão entre peso percentual dos grupos hidrofílicos sobre o peso percentual dos grupos lipofílicos do emulsificante e o valor varia geralmente entre 1 e 20. Valor baixo de EHL promove formação de nanoemulsão do tipo A/O, enquanto valor maior permite a obtenção de nanoemulsão do tipo O/A (Gurpreet & Singh, 2018).

A lecitina é um surfactante frequentemente utilizado na formação de nanoemulsão (Klang & Valenta, 2011). A sua composição em fosfolipídios, principalmente fosfatidilcolina, confere à lecitina sua biocompatibilidade permitindo ampla aplicação como constituinte de sistema de liberação de fármaco.

A fase oleosa é frequentemente utilizada como simples componente estrutural do nanocarreador. Contudo, diversos óleos da biodiversidade brasileira, tais como pequi, açaí, buriti e copaíba, podem assumir o papel terapêutico além do papel estrutural por

serem fontes ricas em compostos bioativos (Mello et al., 2018; Monge-Fuentes et al., 2017; Pires et al., 2020; Zanatta et al., 2010).

2.3.2 Aplicação de nanoemulsão no tratamento do câncer

Poucos estudos reportam o uso da nanopartículas como carreador do óleo de pequi para tratamento do câncer. Ombredane&Araujo e colaboradores (2020) demonstraram o desenvolvimento sucedido de nanoemulsão à base de óleo de pequi com efeito antitumoral em células de câncer de mama 4T1, *in vitro*. Nanoemulsão à base de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Martius) apresentou potencial anticâncer em terapia fotodinâmica em modelo de câncer de pele melanoma, *in vivo*, com redução significativa (82%) do volume tumoral comparado com grupo controle (Monge-Fuentes et al. 2017). O uso de nanoemulsão como sistema de liberação do DTX é mais investigado. Verma e colaboradores (2014) reportam o uso de nanoemulsão para administração oral de DTX. Os autores demonstraram potencial anticâncer dessa formulação em células de câncer de mama MCF-7, *in vitro*, e sem sinais de toxicidade *in vivo* (Verma et al. 2016). Patel e colaboradores (2018) relatam que o uso de nanoemulsão associada com folato para transporte do DTX apresentou redução tumoral em câncer de ovário, *in vivo*. Adicionalmente, a combinação do DTX com timoquinona em nanoemulsão à base de óleo de borragem demonstrou sinergismo e induziu morte celular por apoptose em células MCF-7 e MDA-MB-231 (Alkhatig et al., 2020). A utilização de nanoemulsão como sistema de liberação do AA para o tratamento do câncer ainda é pouco investigado. Contudo, nanoemulsão contendo líquido da casca da castanha de caju (constituído a 65% por AA) foi reportado como potente inibidor da proliferação de células de câncer de mama MCF-7, *in vitro* (Al-Hazzani et al. 2012). Não foi encontrado até o presente momento, estudo sobre associação do DTX e AA em nanoemulsão. No entanto, o encapsulamento do DTX em lipossomo e nanopartícula de albumina funcionalizadas por AA foram avaliadas em células de câncer de mama, *in vitro* (Kushwah, Jain, et al. 2018; Kushwah, Katiyar, et al. 2018).

A associação do DTX e AA em nanoemulsão à base de óleo de pequi representa inovação para o campo da oncologia e, mais especificamente, para o tratamento do câncer de mama.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Formular e caracterizar nanoemulsões à base de óleo de pequi, contendo ou não ácido anacárdico e docetaxel, e investigar seus efeitos antitumorais em modelos de câncer de mama triplo negativo, *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo I

- Formular nanoemulsão à base de óleo de pequi;
- Caracterizar a formulação por DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico) e FTIR (Infravermelho com Transformada de Fourier);
- Avaliar a estabilidade da formulação ao longo do tempo e sob várias condições de diluição seriada e pH;
- Investigar atividade anticâncer, *in vitro*, em células de câncer de mama metastático 4T1 e em fibroblastos saudáveis NIH-3T3.

Capítulo II

- Avaliar os efeitos das nanoestruturas na morfologia celular por microscopia óptica e citometria de fluxo em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*;
- Analisar os efeitos das nanoestruturas na proliferação celular através número total de células por azul de tripan, ciclo celular por citometria de fluxo e crescimento celular por RTCA em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*;
- Investigar os efeitos das nanoestruturas em diferentes organelas celulares como lisossomo, mitocôndria, núcleo (fragmentação de DNA) por citometria de fluxo e os efeitos na membrana plasmática por azul de tripan em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*;
- Determinar os efeitos das nanoestruturas na produção de espécie reativas de oxigênios (ERO) e no nível intracelular de cálcio por citometria de fluxo em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*;
- Investigar o efeito das nanoestruturas no processo de morte celular (apoptose vs necrose) por citometria de fluxo em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*.

Capítulo III

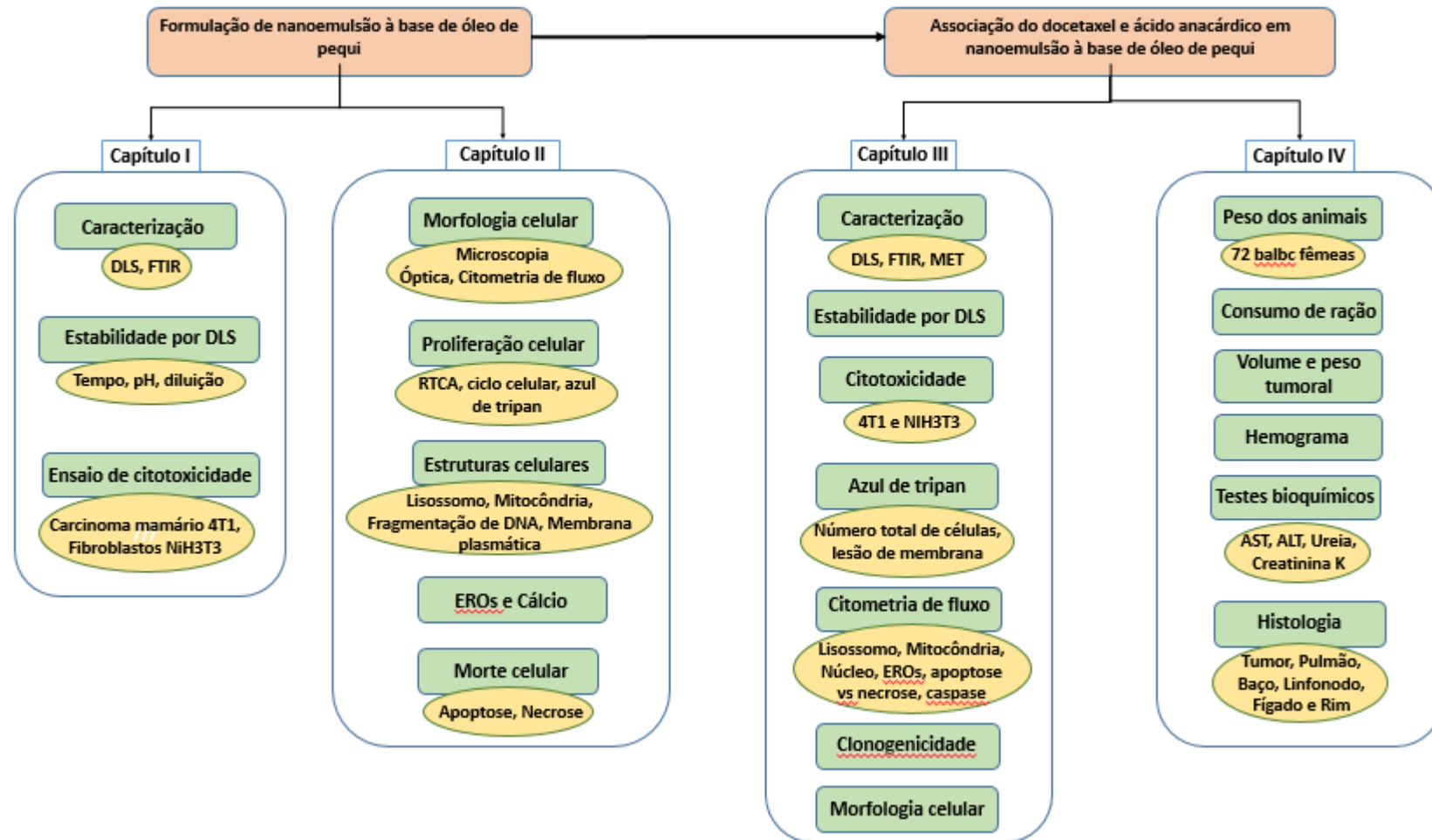
- Associar à nanoemulsão à base de óleo de pequi o quimioterápico docetaxel e a biomolécula ácido anacárdico

- Caracterizar as formulações por DLS, FTIR e MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão)
- Investigar atividade anticâncer, *in vitro*, em células de câncer de mama metastático 4T1
- Investigar os efeitos das formulações em diferentes organelas celulares como lisossomo, mitocôndria, núcleo (fragmentação de DNA e ciclo celular) por citometria de fluxo e os efeitos na membrana plasmática por azul de tripan em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*;
- Determinar os efeitos das formulações na produção de ERO por citometria de fluxo em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*;
- Investigar o efeito das formulações no processo de morte celular (apoptose vs necrose) e ativação de caspase por citometria de fluxo em células de carcinoma mamário 4T1, *in vitro*.

Capítulo IV

- Síntese de nanoemulsão à base de óleo de pequi com e sem docetaxel e ácido anacárdico
- Avaliar a eficácia das nanoemulsões e seus componentes livres na redução do volume tumoral e controle de metástase
- Investigar efeito tóxico com avaliação clínica dos animais (peso dos animais e consumo de ração), análise hematológica (leucograma e hemograma), análise bioquímica (AST, ALT, creatinina K e ureia) e análises histopatológicas

4- DESENHO EXPERIMENTAL



CAPÍTULO I

NANOEMULSION-BASED SYSTEMS AS A PROMISING APPROACH FOR ENHANCING THE ANTITUMORAL ACTIVITY OF PEQUI OIL (*Caryocar brasiliense* CAMBESS.) IN BREAST CANCER CELLS.

Este capítulo foi integralmente publicado na revista *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Alicia S. Ombredane, Victor H.S. Araujob, Clarissa O. Borgesa, Patrícia L. Costa, Marcela G. Landim, Andréia C. Pinheiro, Ísis O. Szlachetka, Luiz E.C. Benedito, Laila S. Espindola, Diego J.S. Dias, Daniela M. Oliveira, Juliano A. Chaker, Sebastião W. da Silva, Ricardo B. de Azevedo, Graziella A. Joanitti. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 58 (2020) 101819.

Abstract

Previous studies have reported the effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in cancer prevention and treatment. However, its biomedical applications are limited due to the hydrophobic nature of the oil. In this study, we used nanotechnology strategies to design and characterize a pequi oil-based nanoemulsion and evaluate its anticancer effects. Our data show that monodisperse (PDI 0.23) pequi oil nanoemulsion (123 nm –hydrodynamic diameter; –15 mV – zeta potential) were prepared successfully using lecithin as surfactant and had physicochemical stability when exposed to stress conditions (pH and serial dilution) or long-term (200 days) storage at different temperatures. Significant dose- and time-dependent antitumoral effects against breast cancer cells (4T1) were also observed (IC₅₀ of 299.8 and 173.7 µg/mL after 24 and 48 h respectively, $p < .001$), along with lower cytotoxicity against non-tumoral cells (NIH/3T3) (IC₅₀ of 442.7 and 380.3 µg/mL after 24 and 48 h respectively). In addition, we show that in our formulation, pequi oil has a dual role, behaving both as a structural component of the nanoemulsion and as a cytotoxic agent against breast cancer cells. Taken together, our results reveal pequi oil-based nanoemulsion as a promising nanosized platform to be used as an adjuvant tool for breast cancer treatments.

Key words: Nanoemulsion, Pequi oil, Breast cancer, Stability, Cytotoxicity

1- Introduction

Breast cancer is by far the most common and frequent type of cancer among women worldwide. In 2018, the World Health Organization (WHO) reported that breast cancer was the fifth cause of death by cancer, with a 15% mortality rate [1,2]. Due to the heterogeneity and high incidence of breast cancer, the investigation of novel therapeutic approaches is fundamental to complement conventional clinical procedures (surgery, chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy) and to improve therapeutic treatment [3–5]. Several studies have explored different natural sources of new molecules with potential effects against this type of cancer, in which plant-derived bioactive compounds and their derivatives have emerged among the main candidates for new anticancer agents [6–9].

Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) is a native tree found in the Brazilian Cerrado whose fruit-extracted oil is mostly composed by fatty acids (e.g. oleic acid) with the presence of other antioxidant molecules (approximately 0.5–1% w/w) such as carotenoids, vitamin C, and phenolic compounds [10–17]. Despite its use in food preparations, pequi oil is also largely employed in folk medicine to treat various health disorders such as respiratory diseases, edema, ophthalmic problems related to low vitamin A intake, burns, wound healing, bruises, swelling, and menstrual disorders [10,14,18–20].

Previous studies have reported the effects of pequi oil on cancer prevention and treatment. Colombo and collaborators (2015) showed that oral supplementation with pequi oil decreased DNA damage and lipid peroxidation in a chemically induced lung carcinogenesis model in vivo [12]. In breast cancer animal models, oral supplementation of pequi oil inhibited tumor growth [21], reduced the side effects induced by chemotherapy [22], and potentiated anticancer effects of magnetic hyperthermia therapy [23].

Nanoemulsions are usually used as drug delivery systems to carry mainly hydrophobic compounds in pharmaceutical, food, and cosmetic industries [24–29]. They are nanosystems (< 500 nm) composed of an oil phase and an aqueous phase stabilized by surfactants. Interestingly, the hydrophobic compound can be protected from degradation while encapsulated in this nanosized platform [24,25,28]. It is also possible

to tailor the surface of this nanosystem with specific cancer-targeted molecules able to direct the nanoparticles to the desired tissue [28,29].

In cancer therapy, parenteral administration of nanoemulsions is mainly used to deliver chemotherapy to the tumor microenvironment. The enhanced permeability and retention effect along with tumor defective vascularization and low lymphatic drainage improves the accumulation of nanoemulsions into targeted tumors and reduces side effects [25,27]. However, the use of administration routes that allow improved absorption and biodistribution of the pequi oil, such as parenteral routes (e.g. intravascular, intramuscular, subcutaneous), is not suitable due to the hydrophobic nature of the oil; therefore, restricting the options for delivery. In this context, nanotechnology has emerged as a promising approach for circumventing the challenge of delivering poorly soluble compounds [24–26,28].

In this study, we used nanotechnology strategies to design and characterize a pequi oil-based nanoemulsion (PeNE) and evaluate its anticancer effects. Our data reveal that pequi oil has a dual role in this formulation, behaving both as a structural component of the nanoemulsion and as a cytotoxic agent against breast cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pequi oil was donated by Farmacotécnica (a pharmacotechnical development company, Brasilia, Brazil). Egg lecithin was purchased from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Hexane (P.A.) was purchased from Dinâmica Química Contemporânea LTDA (SP, Brazil). MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), boron trifluoride (BF₃), methanol, fatty acid reference material (F.A.M.E Mix C8–C24), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Murine fibroblast (NIH-3T3) cells were acquired from Cell Bank of Rio de Janeiro (Brazil) and murine breast adenocarcinoma cells (4T1) were donated by Dr Suzanne Ostrand-Rosenberg (University of Maryland, Baltimore County, USA) and modified to express Firefly Luciferase (4T1-luciferase) as previously described [30]. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, and trypsin were all purchased from Thermo (Gibco, USA).

2.2. Fatty acid profile of pequi oil

Lipidic profile determination was done in triplicate for pequi oil, based on the protocol described [31]. Approximately 15 mg (± 0.1 mg) of oil was weighed in glass tubes with caps and 1.5 mL of a 0.5 M KOH solution in methanol was added. Samples were submitted to vortex agitation (~1 min) and a 70 °C water bath for 5 min. After cooling, 2 mL of 14% BF₃ in methanol was added and samples were submitted again to vortex agitation and 70 °C water bath to promote full esterification of fatty acids in samples. Extraction of fatty acid methyl esters was performed by adding a 2.5 mL of saturated NaCl solution and 1 mL of hexane, followed by vortex agitation for 1 min and centrifugation at 241g for 5 min 100 μ L of hexanic phase was transferred to 1.5 mL vials and 900 μ L of hexane was added. Samples were then analyzed by gas chromatography (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus with an AOC-5000 injection system and a J&W Scientific DB-23 column (60 m \times 0.25 mm ID \times 0.25 μ m). Injector and detector temperatures were 250 °C and the volume of injection was 1 μ L with a split ratio of 60. Helium was used as carrier gas for all samples and method consisted of a starting temperature of 140 °C for 5 min followed by a 2 °C/min ramp to 235 °C, providing a total run time of approximately 53 min. Quantification was achieved with a calibration curve of certified reference material (F.A.M.E Mix C8–C24).

2.3. Development of pequi oil-based nanoemulsion (PeNE)

The development of the nanoemulsions was an adaptation of a method previously described [32]. The method consisted of two steps: first, a concentrated solution was prepared by adding egg lecithin and pequi oil in PBS. Different proportions of egg lecithin and pequi oil were evaluated to determine the best proportion for nanodroplets formation: 1:2 w/w, 1:1 w/w, and 2:1 w/w. Then, the concentrated solution was diluted in a larger volume of PBS (1:7.5 (v/v)). Sonication at 20 kHz under an ice bath for 6 min was used in both steps. The developed formulations were stored at 4 °C and under dark conditions until further analysis. A blank formulation (without the oil) was prepared similarly as described above.

2.4. Physicochemical parameters of PeNE

2.4.1. Dynamic light scattering (DLS)

The nanodroplet size, polydispersity index (PdI), and zeta potential were measured using ZetaSizer® Nano ZS90 (Malvern, UK) at room temperature and with

detection of light scattering in an angle of 90°. Three readings of each sample were obtained to calculate the Zaverage. The pH of the samples was measured with a pH indicator stripe previous to each zeta potential analysis.

2.4.2. Stability of nanoemulsions under stress conditions

Exposure of nanoemulsions to stress conditions (serial dilution and pH variation) was performed in order to determine their stability. The samples were diluted in PBS 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, and 128- fold. In parallel, the pH change was performed with the addition of 2 M NaOH and 2.5 M HCl to achieve pH 3, 5, 7, 9, and 11. The physicochemical parameters of each sample were analyzed as described in section 2.4.1.

2.4.3. Stability of nanoemulsions under different storage conditions

Nanoemulsion formulations were stored at 4°C, 37°C, and room temperature (RT) protected from light. Their physicochemical parameters were analyzed after 1, 7, 15, and 200 days as described in section 2.4.1. This approach is in accordance with Singh and collaborators (2017) and Sánchez-López and collaborators (2019) [25,33].

2.4.4. Analysis of infrared spectrophotometry – FTIR

For the FTIR measurements, the nanoemulsions were previously lyophilized (Thermo Savant SPD121P – Thermo Scientific) and stored under nitrogen atmosphere until analysis. The FTIR experiments were performed using a Bruker spectrometer (model Vertex 70). The analysis was performed using the module attenuated total reflectance (ATR). The measurements were averaged over 96 scans, which were taken at a resolution of 4 cm⁻¹ from 400 to 4000 cm⁻¹. The background signal was averaged over 96 scans before each measurement. Finally, the spectra were fitted using Gaussian functions. Data were treated with IR Solution software 1.50® and transferred to the graphics program GraphPad Prism 5.0® construction.

2.5. Cell culture

The cell lines murine breast carcinoma 4T1-luciferase and murine fibroblast (NIH-3T3) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal bovine serum (v/v) and 1% of antibiotic solution (100 IU/mL Penicillin – 100 µg/mL Streptomycin – v/v) at 37 °C and 5% CO₂.

2.6. Cell treatment

For viability assay, cells were seeded into 96-well culture plate at a density of $2 \cdot 10^3$ cells per well (4T1-luciferase) and $3 \cdot 10^3$ cells per well (NIH-3T3) in DMEM culture medium overnight at 37 °C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. Then, the medium was changed and various concentrations of PeNE and blank formulations, and free pequi oil were added (90, 180, 360, and 540 µg/mL, considering pequi oil concentration). The free pequi oil was diluted in ethanol previous to the treatment. The final ethanol concentration was lower than 1% per well. The plates were incubated for 24 and 48 h at 37 °C, 5% CO₂ in a humid atmosphere.

2.7. Cell viability assay

Cell viability assay was performed using MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The MTT assay is based on the reduction of tetrazolium derivatives in living cells by mitochondrial dehydrogenases, allowing the estimation of the metabolic activity of cells. This assay enables the assessment of cell viability and proliferation as parameters of cell survival and growth [34]. After 24 and 48 h of incubation, the treatments were removed and 150 µL of the MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) was added in each well. The plates were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂ in humid atmosphere. The culture medium was discarded and 150 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in each well. The absorbance was monitored using a spectrophotometer with a microplate reader at 595 nm (Molecular Devices, USA). The control group was considered as 100% cell viability.

2.8. Statistical analysis

Statistical differences between experimental groups were evaluated by the analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test at a significance level of 0.05 using Graph Pad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by linear regression (probit analysis) using the software Graph Pad Prism with confidence limits of 95%. All values were expressed as means ± standard error of the mean (SEM) and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All assays were performed in triplicates in three independent experiments.

3. Results and discussion

The present study shows that pequi oil nanoemulsions were prepared successfully and had physicochemical stability when exposed to stress conditions (pH and serial dilution) or long-term storage at different temperatures. Significant antitumoral effects against breast cancer cells were also observed, along with lower cytotoxicity against non-tumoral cells. Detailed data and discussion can be found in the next sections.

3.1. Preparation and optimization of pequi oil-based nanoemulsions (PeNE)

First, to confirm the composition of the pequi oil used in the present study, its fatty acid profile was analyzed and the obtained data were compared with previous descriptions [13,14,35]. We observed the presence of saturated and unsaturated fatty acids, mainly oleic acid ($50.75\% \pm 0.38$) and palmitic acid ($40.65\% \pm 0.05$). Lower contents of steric acid ($4.57\% \pm 0.60$), linoleic ($3.22\% \pm 0.40$), and palmitoleic ($2.80\% \pm 0.40$) were also found. Although the lipid profile of pequi oil can vary according to environmental factors (e.g. region, climate, soil, temperature) [13,14,35], the fatty acid profile found in the present study was similar to the profiles reported in the literature [13,14,35]. Then, we next established the parameters used to prepare different formulations of PeNE (Table 1).

Surfactants play a key role in nanoemulsion systems by enabling the dispersion of immiscible liquids, such as oil in aqueous buffer, due to their amphiphilic structure [24]. Egg lecithin has been currently used in pharmaceutical, cosmetic, and dietetic formulations as an emulsifier. It is a mixture of phospholipids found in all living cells, and is mainly constituted of phosphatidylcholine (~80%) [36]. Moreover, it can be fully metabolized and has been considered as Generally Recognized as Safe (GRAS) excipients approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) [37,38].

Due to its emulsifier properties and biocompatibility, egg lecithin was the surfactant selected for the preparation of PeNE. Since surfactant concentration significantly affects nanoemulsion colloidal parameters [39], the influence of three oil-to-surfactant ratios (OSR) on the physicochemical characteristics of PeNE was evaluated (Table 1).

All PeNE formulations (Table 1) showed hydrodynamic diameters (HD) in the range expected for nanoemulsions produced with phosphatidylcholines – described to be approximately 150–300 nm [40]. Increasing amounts of lecithin resulted in nanodroplets with smaller hydrodynamic diameter and PdI, indicating that oil-to-surfactant ratios have

a significant impact on the colloidal properties of PeNE (Table 1). Such behavior has been widely reported in the literature and can be explained by different factors: if the interfacial region created is much larger than the amount of surfactants, this region will not be properly covered, which can trigger a coalescing process and consequently increase HD during the nanoemulsification process. On the other hand, having adequate amounts of surfactant leads to lower interfacial tensions during the homogenization process, facilitating the formation of smaller and more homogeneous nanodroplets [24,25,40,41].

Table 1. Physicochemical characteristics of the PeNE formulations.

Oil : Lecithin (w/w)	Hydrodynamic diameter ^a (nm)	PdI ^b	Zeta potential (mV)
2:1	306.56 ± 12.12	0.478 ± 0.06	-68.3 ± 7.09
1:1	291.10 ± 03.57	0.262 ± 0.07	-26.3 ± 1.32
1:2	120.36 ± 02.05	0.238 ± 0.01	-15.03 ± 1.62

The results are reported as the average of three independent measurements (n = 3 ± SD). ^a Z-average. ^b Polydispersity index. ^c pH = 7.

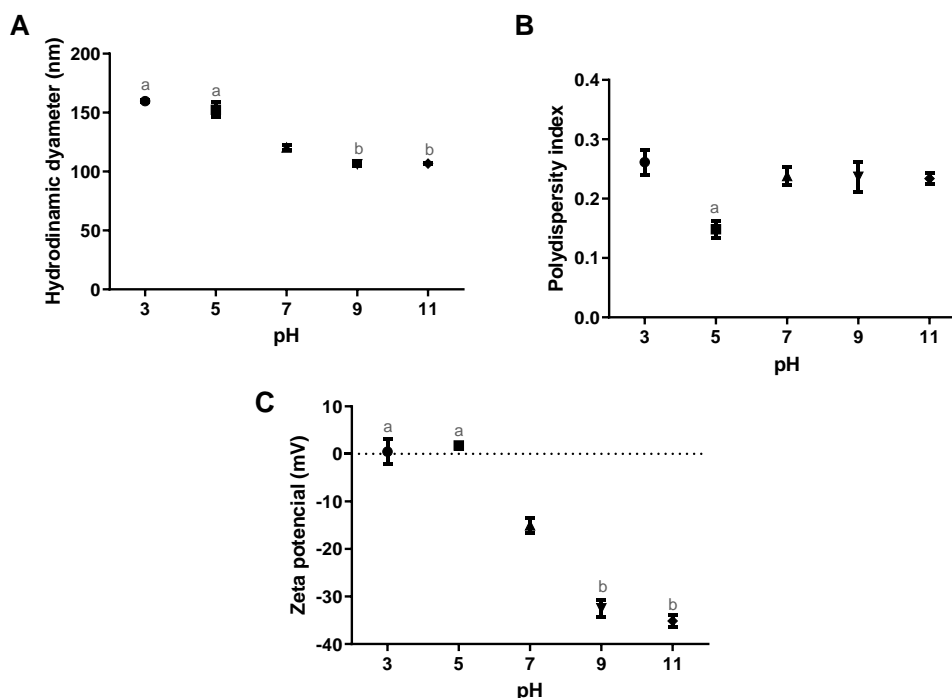


Fig. 1. Evaluation of stability of pequi oil based nanoemulsion at different pH values. Hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C). The values are expressed as mean ± SD. One-way ANOVA: significant difference pH 7 versus other groups p < 0.05 (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

Among the formulations here evaluated (Table 1), we decided to work with OSR 1:2 formulation due to its reduced HD and PDI.

3.2. Stability evaluation of PeNE under pH and dilution stresses

Nanoemulsions designed for biomedical applications are subjected to stress conditions that may impact their structural integrity after administration [24–26]. Therefore, the colloidal parameters of PeNE exposed to stress conditions related to pH and dilution factors were monitored in order to investigate alterations in their physicochemical characteristics (Figs. 1 and 2).

Variations in pH values lead to changes in PeNE physicochemical characteristics related to HD and zeta potential parameters (Fig. 1). When compared to original nanoemulsion obtained at pH 7 (120 nm HD), we observed slight variations of approximately 40 nm in the HD ($p < 0.0001$) at acidic pH and of 14 nm ($p < 0.01$) at basic pH (Fig. 1A). PDI values remained stable in almost all pH ranges here evaluated, showing a drop from 0.238 to 0.150 at pH 5 (Fig. 1B). As for zeta potential, values increased 15 mV at acidic pH and decreased approximately 15 mV at basic pH ($p < 0.0001$) (Fig. 1C). According to Bhattacharjee (2016), zeta potential values become more positive and more negative at acidic and basic pH, respectively. This observation agrees with the results of the present study and can be explained by the cationic or anionic charge adsorption from the acid or basis, present in the medium, on the interface between the nanodroplets and the aqueous medium [42]. One of the main characteristics of nanoemulsions is their kinetic stability, which confers resistance for nanodroplets submitted to stress conditions such as dilution [24,27]. Therefore, nanoemulsions are good candidates to be administered in parenteral routes [26,27,43]. Under dilution stress, PeNE nanodroplets did not suffer significant variations in their size and polydispersity index (Fig. 2A and B), supporting the idea that PeNE behaves like nanoemulsions and can be classified as such. In addition, higher dilution rates (4- to 64-fold) lead to a significant decrease of zeta potential values (Fig. 2C). This result corroborates with the knowledge that particle concentration influences ZP. Although a general guideline correlating particle concentration and ZP has not been established, it has been stated that overall in diluted samples the zeta potential tends to decrease [42].

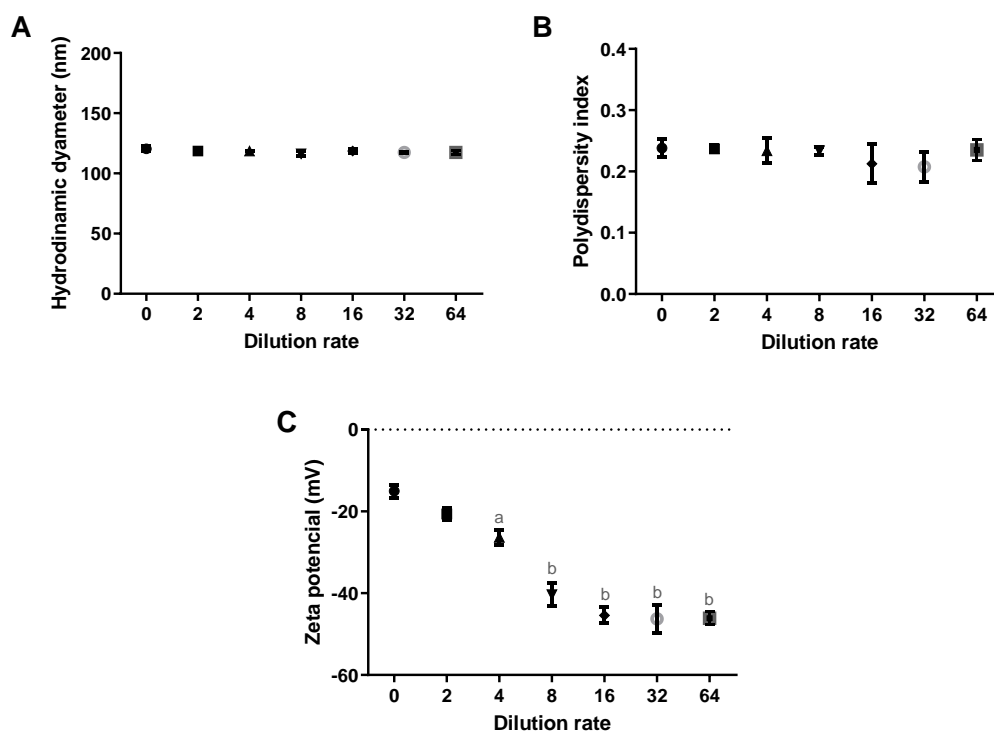


Fig. 2. Evaluation of stability of pequi oil based nanoemulsion at different dilution rates. Hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C). The values are expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA: significant difference between “0 dilution rate” versus other groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.3. Stability evaluation of PeNE over time

To investigate the storage conditions of PeNE, its stability was evaluated by measuring its physicochemical parameters and evaluating its macroscopic aspects after short-term (1–15 days) and long-term (200 days) storage times at 4 °C, 37 °C, and room temperature (RT) (Fig. 3). For this evaluation, all samples were protected from light exposure. The macroscopic aspect of a nanoemulsion is an important parameter to be analyzed since it indicates the occurrence of instability mechanisms [24,25,28,43,44]. In the present study, PeNE presented a homogeneous dispersion with no signs of flocculation, creaming, sedimentation, or phase separation during all temperatures and storage periods evaluated (data not shown). Considering that oils are not miscible to aqueous buffers, the observation of homogeneous dispersion indicates the entrapment of

the pequi oil in the nanodroplets. In addition, size measurements of PeNE indicated no remarkable changes in hydrodynamic diameter, PdI, and zeta potential of PeNE in all temperatures and times analyzed (Fig. 3). Similarly, the pH of PeNE remained stable at 7 in all temperatures and times analyzed (data not shown).

Stability evaluation is of prime importance for nanoparticulate systems intended for biomedical applications since it affects storage, transport, and usage conditions. The present data emphasize the longterm size stability profile of PeNE, suggesting that its transportation and storage may be done under a variety of temperatures.

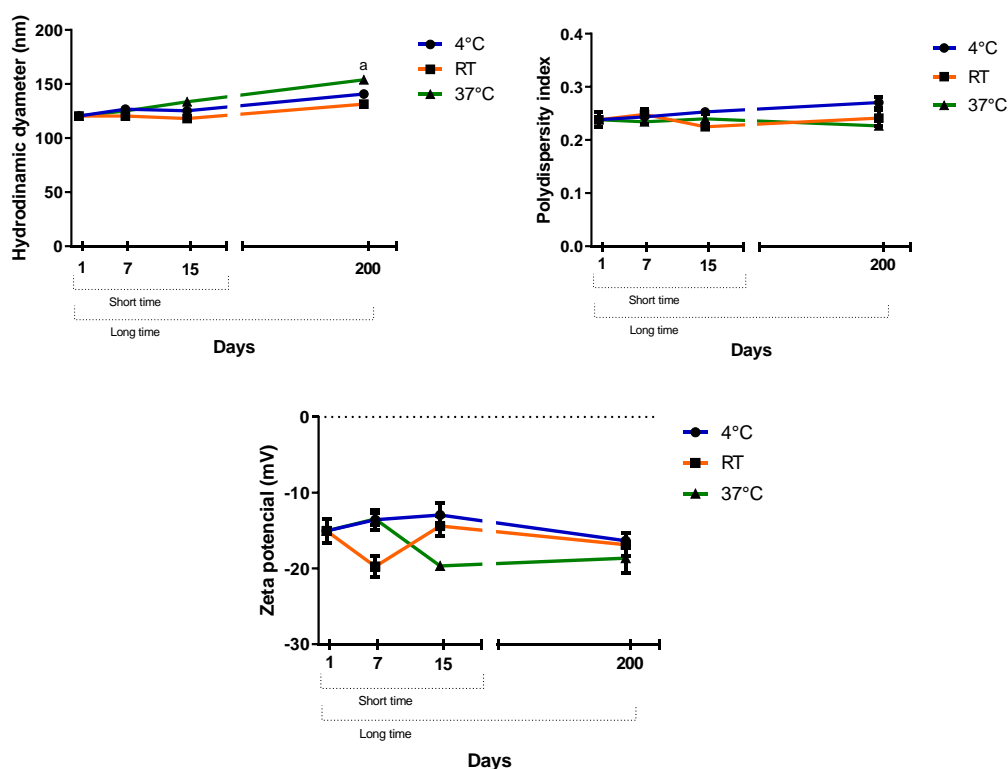


Fig. 3. Evaluation of stability of pequi oil based nanoemulsion over time storage at 4 °C, room temperature (RT), and 37 °C according to hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B), and zeta potential (C). One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.4. Infrared spectra of PeNE

The FTIR technique is particularly sensitive to changes in the vibrational properties of interacting molecules. The molecular information acquired from FTIR spectroscopy allows correlating the conformational and structural changes undergone by the molecule as a function of its interaction process. Therefore, to investigate the interactions between pequi oil and the surfactant egg lecithin, measurements of FTIR

were carried out in PeNE. For comparison, the blank formulation (only egg lecithin) and free pequi oil were also measured (Fig. 4). As stated previously, pequi oil used in the formulation of nanoemulsions contains mainly oleic (~51%) and palmitic (~40%) acids, among other fatty acids (< 9%). The other constituents of pequi oil make up less than 0.5% of the total volume. As a result, the FTIR spectrum of pequi oil is dominated by the fatty acid absorption signals [45,46] (Fig. 4 (iii)). However, in natural fats, these components are mostly in the form of triacylglycerols (TAGs), whose basic structure is a glycerol backbone with three acyl chains attached to it [47], whereas phosphatidylcholine (a major component of egg lecithin) has the oleic acid and palmitic acid chains pointed in the same direction and the polar head group pointed in the opposite direction [47] (Fig. 4).

Note from Fig. 4 that the FTIR spectrum of PeNE is dominated by the spectral features of the blank formulation. The most prominent features in common in all spectra are bands corresponding to CH_2 , CH_3 , $C = C$, and $C = O$ groups, due to the hydrophobic chain region, and the $-PO_2$ and $N+(CH)_3$ moieties from the polar head group [48,49]. Small spectral changes due to the pequi oil presence in PeNE can be observed in the spectral region corresponding to the *vas* ($C-O-P-O-C$) ($\sim 1170\text{ cm}^{-1}$) and mainly at the stretching vibrations of the ester carbonyl ($\nu(C = O)$) and methylene groups (Fig. 4b). The $\nu(C = O)$ band, in all FTIR spectra, can be deconvoluted in two components using Gaussian functions. These bands are usually assigned to populations of 'free' ($\sim 1743\text{ cm}^{-1}$) and H-bonded ($\sim 1726\text{ cm}^{-1}$) ester carbonyl groups, whose relative integrated intensities and vibrational energies usually change from gel ($L\beta$) to liquid crystalline ($L\alpha$) phase transition temperature-induced [50]. At room temperature, a fully hydrated lecithin membrane is known to have liquid disordered (L_d) and ordered (L_o) phases coexisting, in the range of 15–40 mol% cholesterol [51,52]. Thus, based on the results shown in Fig. 4 (b) and the discussion above, it is reasonable to assume that, just like cholesterol, incorporation of pequi oil promotes an ordering of the L_d phase, causing L_d and L_o phases to coexist in PeNE. This hypothesis is reinforced by the behavior of the stretching modes of methylene. It was found that the wavenumber of the *vs* (CH_2) and *vas* (CH_2) bands of the PeNE sample are both downward shift by 1 cm^{-1} , when compared to the blank formulation.

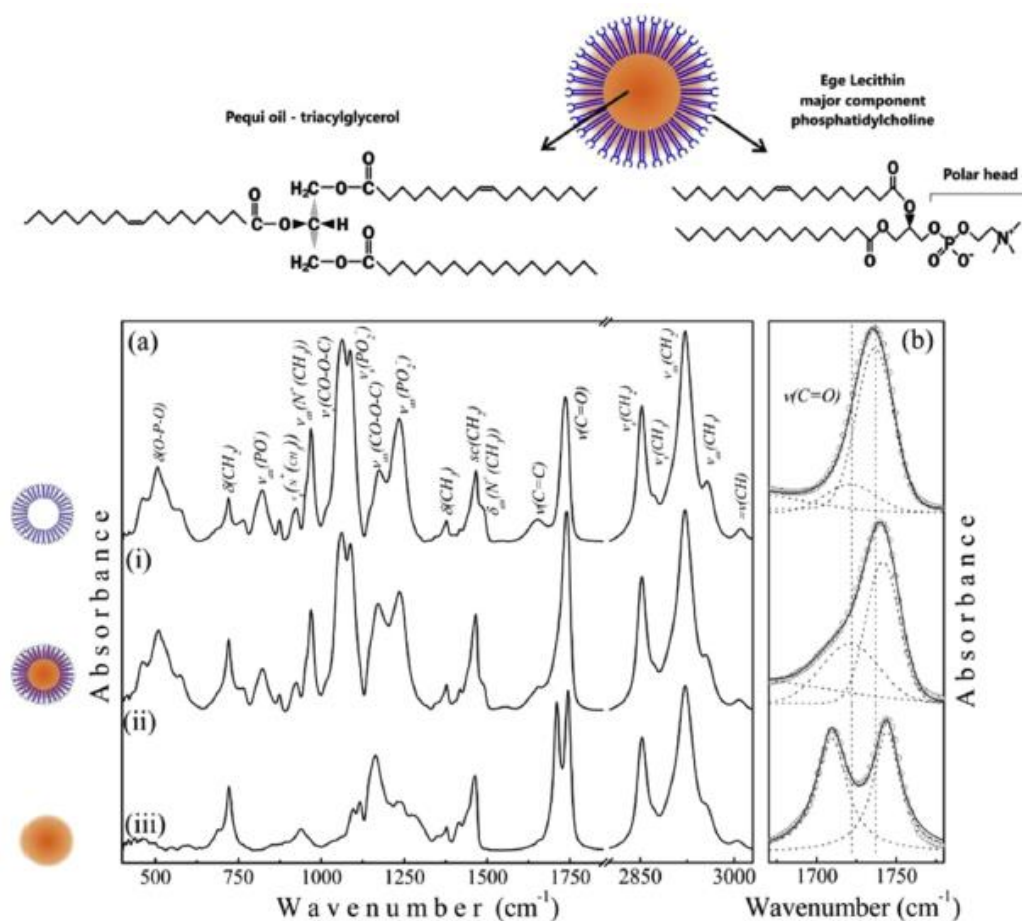


Fig. 4. FTIR spectra of pequi oil-based nanoemulsion (a) oil:lecithin ratio (w/w) 0:1 (i), 1:2 (ii), and free pequi oil (iii). (b) Zoom of the FTIR spectra in the range 1670–1780 cm⁻¹. The dashed lines show the Gaussian fit of the data.

3.5. Antitumoral activity of PeNE

Murine breast carcinoma (4T1) cell line was used to perform cytotoxic assay, *in vitro* (Fig. 5). This is a triple-negative breast cancer cell line whose proliferation pattern and metastasis closely resemble that of advanced human breast cancer [53]. Both free and nanostructured pequi oil induced similar dose-dependent effects on 4T1 cell viability after 24h ($p < 0.001$) (Fig. 5A). Nevertheless, after 48h, PeNE treatment showed a higher cytotoxic effect and a significant dose-dependent cell viability reduction, while free oil treatment showed a cytotoxic pattern similar to that observed at 24h. Particularly, at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$, PeNE reduced cell viability by 55% and 90%, respectively ($p < 0.001$). In comparison, free pequi oil did not induce toxicity at 180 $\mu\text{g/mL}$ and reduced only 30% of cell viability at 360 $\mu\text{g/mL}$ after 48h (Fig. 5B). According to IC₅₀ values, PeNE was

1.4- and 2.5-fold more cytotoxic than free pequi oil after 24 and 48h, respectively. This data shows that the encapsulation of pequi oil improved its bioavailability and its cytotoxicity. In addition, PeNE and free pequi oil showed to be more cytotoxic against cancer cells. Indeed, both samples were 20% less cytotoxic against non-tumoral fibroblasts (NIH/3T3) at the same conditions tested in 4T1 after 24h (Fig. 5C). After 48h, either sample resulted in 40% less cytotoxicity at 180, 360, or 540 $\mu\text{g/mL}$ than what we observed in 4T1 cells (Fig. 5D). Moreover, no time-dependent activity was noted in fibroblasts. IC50 values showed that PeNE was 1.5- and 2.2-fold more aggressive against breast cancer cells (4T1) than fibroblasts (NIH/3T3) after 24 and 48h exposure, respectively (Fig. 5).

In this study, the blank formulation (egg lecithin without oil) did not show cytotoxic activity in the tested conditions (Fig. 5), indicating that the cytotoxicity of PeNE is due to the presence of the encapsulated pequi oil. In addition, our data show that egg lecithin is a biocompatible surfactant for nanoemulsions. This data is supported by other studies showing that lecithin-based nanoemulsions are suitable nanocarriers frequently used in delivery systems that can be applied in parenteral administration for cancer treatments [26,27,40,43]. Previous studies have reported the development of pequi oil (*C. brasiliense* Cambess.) microemulsions showing stability aspects and an antioxidant profile [54]. Nevertheless, microemulsions and nanoemulsions are different nanometric platforms. Despite having similar nanodroplet size range, both systems show remarkable differences regarding their stability. While microemulsions have thermodynamic stability, which makes them sensitive to changes in composition and temperature, nanoemulsions are kinetically stable. In other words, nanoemulsions are more resistant to stress conditions (e.g. dilution factors, pH), resulting in better stability over long time periods, if compared to microemulsions [24,55].

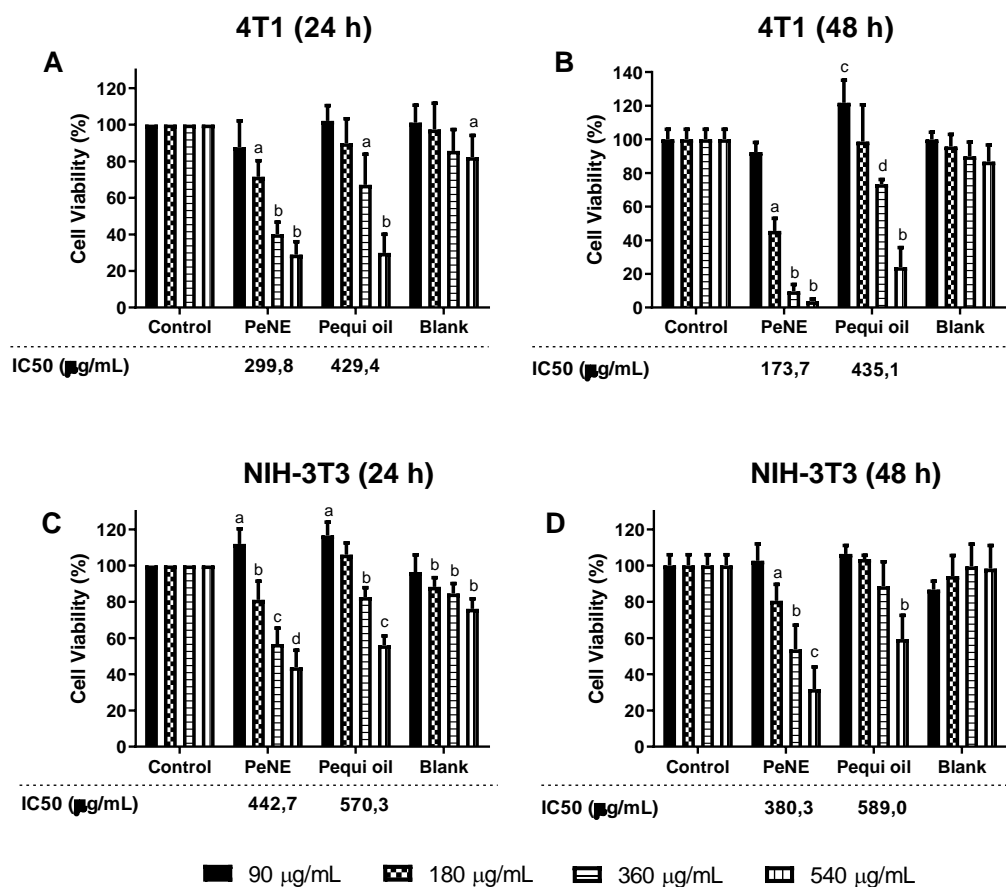


Fig. 5. Cytotoxicity of pequi oil-based nanoemulsion (PeNE), free pequi oil, and blank formulation (egg lecithin without oil) on the viability of breast cancer cells (4T1) (A–B) and fibroblast (NIH/3T3) (C–D) after exposure for 24 and 48 h. The assay was carried out using the MTT method. The values are expressed as mean \pm SEM. Significant difference $p < 0.05$ versus control group (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups. IC50 values are represented below each treatment.

To the best of our knowledge, this is the first study to report the physicochemical stability and the anticancer activity of pequi oil-based nanoemulsion in breast cancer cells. Although nanoemulsions have been employed in cancer treatments, their oil phase is usually used only as a platform for carrying hydrophobic drugs but not as the bioactive compound itself. In our study, we show that pequi oil has a dual role in this formulation, behaving both as a structural component of the nanoemulsion and as a cytotoxic agent against breast cancer cells.

Taken together, the present study reveals PeNE as a promising nanosized platform to be used as an adjuvant tool for breast cancer treatments. Oleic acid, one of the most abundant bioactive compounds in pequi oil (~51%), has been described to act as an anticancer agent against several types of cancer [56–59]. Associations of synergism

between this fatty acid and other pequi oil bioactive compounds may favor combined effects [60,61] resulting in the cytotoxicity against breast cancer cells observed herein. Moreover, the PeNE developed represents a versatile nanometric platform suitable to have its surface further tailored with different moieties involved with improved cell internalization and active targeting delivery of conventional chemotherapeutic agents, enabling potential synergistic interactions between drug and plant derivatives [62] to achieve favorable outcomes in therapeutic procedures for cancer. Such PeNE modifications along with detailed investigations aiming to unravel its mechanism of action against breast cancer cells are underway.

The present study is one more evidence of the power of nanotechnology as a tool to potentiate the effects of promising bioactive compounds found in natural resources. This modern approach aggregates value of biological resources, expands their market utility, and reinforces the need for a sustainable economy to protect biodiversity.

4. Conclusion

Several studies have explored different natural sources of new molecules with potential effects against breast cancer, in which plant-derived bioactive compounds and their derivatives have emerged among the main candidates for new anticancer agents. Herein, we employed nanotechnology strategies to design and characterize a pequi oil-based nanoemulsion (PeNE) and evaluate its anticancer effects. Taken together, the results of the present study reveal the use of PeNE as a promising nanosized platform to be used as an adjuvant tool for breast cancer treatments. To the best of our knowledge, this is the first study to report the physicochemical stability and the anticancer activity of pequi oil nanoemulsion in breast cancer cells.

CRedit authorship contribution statement

Alicia S. Ombredane: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Visualization. Victor H.S. Araujo: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Clarissa O. Borges: Methodology, Investigation, Writing – original draft. Patrícia L. Costa: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Marcela G. Landim: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing original draft. Andréia C. Pinheiro: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Ísis O. Szlachetka: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Luiz E.C. Bedito: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Laila S. Espindola: Methodology, Writing - review & editing, Resources. Diego

J.S. Dias: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft. Daniela M. Oliveira: Writing - review & editing, Resources. Juliano A. Chaker: Visualization, Writing – review & editing. Sebastião W. da Silva: Methodology, Visualization, Writing - review & editing, Resources. Ricardo B. de Azevedo: Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition. Graziella A. Joanitti: Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Visualization, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

G. A. Joanitti, V. H. S. Araujo, and R. B. Azevedo are named inventors of the following patent application (Provisional Patent: BR 10 2017 025294 9, November 24, 2017, Brazilian Patent Office [Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI]) regarding the development and use of pequi oil-based nanoemulsions. This patent does not represent a direct conflict of interest to the reported data in this manuscript. All other authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Publicase® for the careful and excellent revision of our manuscript. We would like to thank particularly Marcia Triunfol at Publicase® for editing this manuscript. We also would like to thank Farmacotécnica for donating the pequi oil and Dr Suzanne Ostrand-Rosenberg for donating the 4T1 cells. This study is in accordance to the Brazilian New Law on Biodiversity (Law 13,123 of May, 2015) and registered in the National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen) platform under the number AC22EF9. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiotecnologia (INCT-Nanobiotecnologia), Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), and ArboControl Brasil Project –Process TED74/2016 and TED42/2017 (FNS/UnB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Canc. J. Clin.* 68 (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] O.W.H.I.A. for C. Research, Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, Press RELEASE N° 263, <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>, (2018) accessed November 7, 2019, 1-3.
- [3] M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, A.U. Khan, Awareness and current knowledge of breast cancer, *Biol. Res.* (2017) 1–23, <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.

- [4] E.S. McDonald, A.S. Clark, J. Tchou, P. Zhang, G.M. Freedman, Clinical diagnosis and management of breast cancer, *J. Nucl. Med* (2016) 9–17, <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>.
- [5] G. Jeswani, S. Das Paul, A.K. Jha, Advances in the delivery of cancer therapeutics: a comprehensive review, *Curr. Drug Deliv.* 15 (2018) 21–36, <https://doi.org/10.2174/1567201814666170726105219>.
- [6] R. Ali, Z. Mirza, G.M.D. Ashraf, M.A. Kamal, S.A. Ansari, G.A. Damanhour, A.M. Abuzenadah, A.G. Chaudhary, I.A. Sheikh, New anticancer agents: recent developments in tumor therapy, *Anticancer Res.* 32 (2012) 2999–3005.
- [7] L. Pan, H.B. Chai, A.D. Kinghorn, Discovery of new anticancer agents from higher plants, *Front. Biosci. - Sch.* 4 (2012) 142–156, <https://doi.org/10.2741/s257> S.
- [8] S. Mitra, R. Dash, Natural products for the management and prevention of breast cancer, evidence-based complement, *Alternative Med.* (2018) 8324696, <https://doi.org/10.1155/2018/8324696>.
- [9] R.G. Amaral, S.A. dos Santos, L.N. Andrade, P. Severino, A.A. Carvalho, Natural products as treatment against cancer: a historical and current vision, *Clin. Oncol.* 4 (2019) p1562.
- [10] A.L. Miranda-Vilela, L.C.S. Pereira, C.A. Gonçalves, C.K. Grisolia, Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners, *Nutr. Res.* 29 (2009) 850–858, <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.022>.
- [11] S.M. Palmeira, P.R.P. Silva, J.S.P. Ferrão, A.A.B.L. Ladd, M.L.Z. Dagli, C.K. Grisolia, F.J. Hernandez-Blazquez, Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis, *Eur. J. Canc. Prev.* 25 (2016) 299–305, <https://doi.org/10.1097/CEJ.000000000000187>.
- [12] N.B.R. Colombo, M.P. Rangel, V. Martins, M. Hage, D.P. Gelain, D.F. Barbeiro, C.K. Grisolia, E.R. Parra, V.L. Capelozzi, *Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 48 (2015) 852–862, <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154467>.
- [13] A.M.M. Guedes, R. Antoniassi, A.F. De Faria-Machado, Pequi: A Brazilian fruit with potential uses for the fat industry, *OCL - oilseeds Fats, Crop. Lipids.* 24 (2017), <https://doi.org/10.1051/ocl/2017040>.
- [14] L.R.O. Torres, F.C. Santana, F.B. Shinagawa, J. Mancini-Filho, Bioactive compounds and functional potential of pequi (*Caryocar* spp.), a native brazilian fruit: a review, *Grasas Aceites* 69 (2018), <https://doi.org/10.3989/gya.1222172>.
- [15] A.M.M. Guedes, R. Antoniassi, M.C. Galdeano, R. Grimaldi, M.G. de Carvalho, A.E. Wilhelm, A.G. Marangoni, Length-scale specific crystalline structural changes

induced by molecular randomization of pequi oil, *J. Oleo Sci.* 66 (2017) 469–478, <https://doi.org/10.5650/jos.ess16192>.

[16] M.C. Ribeiro, E.V. de B. Vilas Boas, T.R. Riul, L. Pantoja, H.A. Marinho, A.S. dos Santos, Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil, *Food Sci. Technol.* 32 (2012) 386–392, <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000053>.

[17] L.R.O. Torres, F.B. Shinagawa, F.C. Santana, E.S. Araújo, M.V.C. Oropeza, L.F.L. Macedo, L.B. Almeida-Muradian, H.C. Lima, J. Mancini-Filho, Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes, *Int. Food Res. J.* 23 (2016) 1541–1551.

[18] M.M. Roll, A.L. Miranda-Vilela, J.P.F. Longo, T. da S. Agostini-Costa, C.K. Grisolia, The pequi pulp oil (*Caryocar Brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females, *Genet. Mol. Biol.* 41 (2018) 858–869, <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>.

[19] C.L.B. Ambrósio, F.A.C.S. Campos, Z.P. De Faro, Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A, *Rev. Nutr.* 19 (2006) 233–243, <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000200010>.

[20] F.D. De Araujo, A review of caryocar brasiliense (*caryocaraceae*)-an economically valuable species of the central brazilian cerrados, *Econ. Bot.* 49 (1995) 40–48, <https://doi.org/10.1007/BF02862276>.

[21] A.L. Miranda-Vilela, F.A. Portilho, V.G.B. De Araujo, L.L.C. Estevanato, B.P. Mezzomo, M. de F.M. De Almeida Santos, Z.G.M. Lacava. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 1091–1098, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.09.009>.

[22] A.L. Miranda-Vilela, C.K. Grisolia, J.P.F. Longo, R.C.A. Peixoto, M.C. de Almeida, L.C.P. Barbosa, M.M. Roll, F.A. Portilho, L.L.C. Estevanato, A.L. Bocca, SôN. Bão, Z.G.M. Lacava, Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations, *J. Nutr. Biochem.* 25 (2014) 1161–1176, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005>.

[23] A.L. Miranda-Vilela, R.C.A. Peixoto, J.P.F. Longo, D.D.O.S.E. Cintra, F.A. Portilho, K.L.C. Miranda, P.P.C. Sartoratto, S.N. Bão, R.B. De Azevedo, Z.G.M. Lacava, Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: potential use against cancer, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 (2013) 1261–1271, <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1616>.

[24] A. Gupta, H.B. Eral, T.A. Hatton, P.S. Doyle, Nanoemulsions: formation, properties and applications, *Soft Matter* 12 (2016) 2826–2841, <https://doi.org/10.1039/c5sm02958a>.

- [25] Y. Singh, J.G. Meher, K. Raval, F.A. Khan, M. Chaurasia, N.K. Jain, M.K. Chourasia, Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery, *J. Contr. Release* 252 (2017) 28–49, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>.
- [26] S. Ganta, M. Talekar, A. Singh, T.P. Coleman, M.M. Amiji, Nanoemulsions in translational research - opportunities and challenges in targeted cancer therapy, *AAPS PharmSciTech* 15 (2014) 694–708, <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0088-9>.
- [27] K. Pathak, S. Pattnaik, K. Swain, Application of nanoemulsions in drug delivery, *Nanoemulsions*, Elsevier, 2018, pp. 415–433, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00013-8>.
- [28] H.H. Tayeb, F. Sainsbury, Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application, *Nanomedicine* 13 (2018) 2507–2525, <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0088>.
- [29] P. Rajpoot, K. Pathak, V. Bali, Therapeutic applications of nanoemulsion based drug delivery systems: a review of patents in last two decades, *Recent Pat. Drug Deliv. Formulation* 5 (2011) 163–172, <https://doi.org/10.2174/187221111795471427>.
- [30] A.L. Dos Santos Câmara, G. Nagel, H.R. Tschiche, C.M. Cardador, L.A. Muehlmann, D.M. De Oliveira, P.Q. Alvim, R.B. Azevedo, M. Calderón, J.P.F. Longo, Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model, *Nanomedicine* 12 (2017) 1751–1765, <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0091>.
- [31] W.W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids: a Practical Guide*, Oily, Great Britain, 1989.
- [32] L. Wang, X. Li, G. Zhang, J. Dong, J. Eastoe, Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations, *J. Colloid Interface Sci.* 314 (2007) 230–235, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.079>.
- [33] E. Sánchez-López, M. Guerra, J. Dias-Ferreira, A. Lopez-Machado, M. Ettcheto, A. Cano, M. Espina, A. Camins, M.L. Garcia, E.B. Souto, Current applications of nanoemulsions in cancer therapeutics, *Nanomaterials* (2019), <https://doi.org/10.3390/nano9060821>.
- [34] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [35] E.C. Aguilar, T.L. Jascolka, L.G. Teixeira, P.C. Lages, A.C.C. Ribeiro, E.L.M. Vieira, M.C.G. Peluzio, J.I. Alvarez-Leite, Paradoxical effect of a pequi oil-rich diet on the development of atherosclerosis: balance between antioxidant and hyperlipidemic properties, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45 (2012) 601–609, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500074>.

- [36] L.E. Palacios, T. Wang, Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization, *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 571–578, <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1111-4>.
- [37] L. Budai, N. Kaszás, P. Gróf, K. Lenti, K. Maghami, I. Antal, I. Klebovich, I. Petrikovics, M. Budai, Liposomes for topical use: a physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin, *Sci. Pharm.* 81 (2013) 1151–1166, <https://doi.org/10.3797/scipharm.1305-11>.
- [38] Food and Drug Administration, Title 21-FOOD and drugs. Chapter I-food and drug administration department OF health and human services. Subchapter B-food for human consumption. Section 184.1400 lecithin, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1400>, (2018).
- [39] J. Rao, D.J. McClements, Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5026–5035, <https://doi.org/10.1021/jf200094m>.
- [40] V. Klang, C. Valenta, Lecithin-based nanoemulsions, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 21 (2011) 55–76, [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1).
- [41] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, D.J. McClements, Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin e delivery systems using natural surfactants: quillaja saponin and lecithin, *J. Food Eng.* 142 (2014) 57–63, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.015>.
- [42] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential - what they are and what they are not? *J. Contr. Release* 235 (2016) 337–351, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- [43] S.A. Chime, F.C. Kenechukwu, A.A. Attama, Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery, Application of Nanotechnology in Drug Delivery, Ali Demir Sezer, IntechOpen, July 25th 2014, <https://doi.org/10.5772/58673>.
- [44] C. Chircov, A.M. Grumezescu, Nanoemulsion preparation, characterization, and application in the field of biomedicine, *Nanoarchitectonics Biomed.* (2019), <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816200-2.00019-0>.
- [45] D.M. Sena, F.F.G. Rodrigues, P.T.C. Freire, S.G. De Lima, H.D.M. Coutinho, J.C.L. Carvajal, J.G.M. Da Costa, Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) pulp oil, *Grasas Aceites* 61 (2010) 191–196, <https://doi.org/10.3989/gya.105909>.
- [46] G.L. Teixeira, S. Ávila, J.L.M. Silveira, M. Ribani, R.H. Ribani, Chemical, thermal and rheological properties and stability of sapucaia (*Lecythis pisonis*) nut oils, *J. Therm. Anal. Calorim.* 131 (2018) 2105–2121, <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6742-1>.
- [47] M. Motoyama, Structure and phase characterization of triacylglycerols by Raman spectroscopy, *Bull. NARO Inst. Livest Grassl. Sci.* 12 (2012) 19–68.

- [48] B. Pawlikowska-Pawłęga, L.E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron, W.I. Gruszecki, FTIR, ¹H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828 (2013) 518–527, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.013>.
- [49] R. Tantipolphan, T. Rades, A.J. McQuillan, N.J. Medlicott, Adsorption of bovine serum albumin (BSA) onto lecithin studied by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 40–47, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.021>.
- [50] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828 (2013) 2347–2358, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.018>.
- [51] R.F.M. De Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts, *Biophys. J.* 85 (2003) 2406–2416, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74664-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74664-5).
- [52] D. Marsh, Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1798 (2010) 688–699, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.027>.
- [53] B.A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg, Mouse 4T1 breast tumor model, *Curr. Protoc. Im.* 39 (2000) 20.2.1–20.2.16, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.
- [54] M.D.P.R. Torres, A.L. Raiser, M.R. Marcílio, E.B. Ribeiro, C.R. Andrighetti, D.M.S. Valladão, Development, stability and antioxidant activity of microemulsion containing pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), *Oil, Rev. Virtual Quim.* 10 (2018) 346–361, <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180027>.
- [55] D.J. McClements, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft Matter* 8 (2012) 1719–1729, <https://doi.org/10.1039/c2sm06903b>.
- [56] C. Carrillo, M. del M. Cavia, S.R. Alonso-Torre, Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review, *Nutr. Hosp.* 27 (2012) 1860–1865, <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6010>.
- [57] G.A. Joanitti, *Oleic Acid and Cancer: from Therapeutic to Co-adjutant Agents in Anticancer Approaches. from: Oleic Acid: Dietary Sources, Functions and Health Benefits*, 2013 ISBN 9781626183322.
- [58] S. Jung, S. Lee, H. Lee, J. Yoon, E.K. Lee, Oleic acid-embedded nanoliposome as a selective tumoricidal agent, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 146 (2016) 585–589, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.058>.
- [59] L. Jiang, W. Wang, Q. He, Y. Wu, Z. Lu, J. Sun, Z. Liu, Y. Shao, A. Wang, Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11277, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11842-5>.

[60] J. Boik, A. Kirakosyan, P.B. Kaufman, E.M. Seymour, K. Spelman, Interactions of bioactive plant metabolites: synergism, antagonism, and additivity, *Recent Adv. Plant Biotechnol.* 2009, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0194-1_10.

[61] L.K. Caesar, N.B. Cech, Synergy and antagonism in natural product extracts: when $1 + 1$ does not equal 2, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 869–888, <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>.

[62] R. Pezzani, B. Salehi, S. Vitalini, M. Iriti, F.A. Zuñiga, J. Sharifi-Rad, M. Martorell, N. Martins, Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: an update on the cancer perspective, *Med* 55 (2019) 110, <https://doi.org/10.3390/medicina55040110>.

CAPÍTULO II

PEQUI OIL BASED-NANOEMULSION ALTER CELL PROLIFERATION AND DAMAGE KEY ORGANELLES ON ADENOCARCINOMA MAMMARY CELLS, *in vitro*.

Este capítulo ainda não foi publicado. Alicia Simalie Ombredane, Lídia Rosa, Victor Hugo Sousa Araujo, Patrícia Leite Costa, Marina Sampaio, Ricardo Bentes Azevedo, Graziella Anselmo Joanitti.

Abstract

Pequi oil is extracted from a Brazilian native plant (*Caryocar brasiliense* Camb) and present some molecules like vitamins, carotenoids and fat acids, among others, which present anticancer potential. Due to its hydrophobic property, the administration of pequi oil associated to nanoemulsion represents great alternative for cancer treatment. Breast cancer is the most frequent type of cancer between women with 8.8 million of deaths per year and conventional therapies used are frequently associated with several side effects. Thus, the aim of this study was to investigate effect of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE) on carcinoma mammary cells, *in vitro*. PeNE presented dose and time dependent cytotoxic effect with lower IC₅₀ than free pequi oil after 48 hours of exposure (229.9 µg/mL against 295.2 µg/mL, respectively, (p<0.001)). At 180 µg/mL, PeNE demonstrated higher cellular alteration, when compare to free pequi oil, such as morphological alteration on 4T1 cells, reduction of cell proliferation and number total of cell, altered cell cycle, damage of plasmatic membrane, induction of lysosomal membrane permeability and depolarization of mitochondrial membrane, alteration of intracellular ROS production and calcium level, and increase of phosphatidylserine exposition. Taken together, these results suggest that PeNE led to cell death by apoptosis. Our study showed that PeNE had higher anticancer activity than free pequi oil against carcinoma mammary cells, *in vitro*, demonstrating advantage of nanotechnology. Thus, PeNE represent great alternative for breast cancer treatment. Further experiment should be performed *in vivo* to demonstrated its anticancer potential.

Key words

Nanoemulsion, Pequi Oil, Breast cancer, Apoptosis

1. Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide with 2.1 million cases per year. It represents 15 % of cancer deaths in the world (WHO, 2019). According to its clinical and molecular characteristics, breast cancer can be classified in several subtypes. Triple-negative breast cancer (TNBC) represents 15 % of breast cancer subtype characterized by no expression of estrogen and progesterone receptors and by absence of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) amplification (Denkert et al., 2017). TNBC presents an aggressive profile inducing high rates of metastasis. The lack of known molecular targets turns chemotherapy, a conventional treatment approach often used in several cancer types, poorly efficient (Garrido-Castro et al., 2019).

Studies focusing in the use of natural products as sources of therapeutic compounds have been extensively explored due to the presence of potential antitumor bioactive molecules in their composition. *Caryocar brasiliense* Camb. is a Brazilian native plant whose fruit-extracted oil is composed by antioxidant molecules (*e.g.* carotenoids, vitamin C, and phenolic compounds) and mostly by fatty acids (Ana Luisa Miranda-Vilela et al. 2014). Biomedical applications of pequi oil after oral supplementation have been investigated both on cancer prevention and treatment. Reduction on DNA damage and lipid peroxidation was observed in a chemically induced lung carcinogenesis *in vivo* model (Colombo et al. 2015). Effects on breast cancer animal models, including inhibition on tumor growth, potentiated anticancer effects of magnetic hyperthermia therapy, and reduction of doxorubicin side effects have been also reported (Ana Luisa Miranda-Vilela et al. 2011; 2014). The hydrophobic nature of pequi oil precludes its administration by other administration routes that allow improved absorption and biodistribution, such as parenteral routes (*e.g.* intravascular, intramuscular, subcutaneous).

Recently, our group employed nanotechnology strategies to circumvent this challenge, by developing stable pequi oil based nanoemulsions (PeNE) able to allow the dispersion of this oil in aqueous solutions (Ombredane et al. 2020). PeNE contains monodisperse and nanometric droplets (123 nm in diameter) with physicochemical stability when exposed to long-term (200 days) storage at different temperatures and stress conditions such as pH and serial dilution (Ombredane et al. 2020). In addition, it was shown that PeNE induced significant dose- and time-dependent cytotoxicity against

triple negative breast cancer cells (4T1) along with lower cytotoxicity against non-tumoral cells (NIH/3T3) (Ombredane et al. 2020).

In the present work, we aimed to deepen the investigation on the effects induced by PeNE on cell proliferation and key organelles of triple negative mammary carcinoma cells (4T1), *in vitro*. Our results revealed that PeNE altered cells morphology, reduced cell proliferation and altered several organelles (lysosome, mitochondria and nucleus) behavior more than free pequi oil at low concentration, suggesting that nanotechnology strategy is an efficient alternative for anticancer therapy.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The oil used in this study was extracted from the fruit by cold pressing and filtration and was purchased from pharmacopoeia of University of Brasilia. The materials used for cell culture were purchased from the following companies: Ethanol, Penicillin, Streptomycin, Trypan Blue, Sodium Bicarbonate, Bovine Insulin, and Dimethyl sulfoxide were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Trypsin were purchased from Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA). The materials used for flow cytometry were purchased from the following companies: Rhodamine 123 and Propidium iodide were purchased from Thermo Fisher (EUA); Binding buffer and Annexin-V FITC were purchased from Biosciences (BD, EUA). Murine breast adenocarcinoma cells (4T1) were donated by Professor Dra Suzanne Ostrand-Rosenberg (University of Maryland, Baltimore County, EUA) and modified to express luciferase in our facility as previously described (Dos Santos Câmara et al. 2017).

2.2. Development of PeNEs

The development of the nanoemulsions was an adaptation of a method previously described (Wang et al. 2007) and used in our previously study (Ombredane et al. 2020). The method consisted in two steps: first, a concentrated solution was prepared by adding egg lecithin and pequi oil (2:1 w/w) in PBS. Then, the concentrated solution was diluted in a larger volume of PBS (1:7.5 (v/v)). Sonication at 20 kHz under an ice bath for 3 minutes was used in both steps. A blank formulation (without the oil) was prepared similarly as described above. The developed formulations were stored at 4 °C and under

dark conditions until further analysis, in view of their better stability in this condition as evidenced by previous studies (Ombredane et al. 2020).

2.3. Hydrodynamic Diameter, Polydispersity Index and Surface Charge

The droplet hydrodynamic diameter as well as the Polydispersion Index (PDI) were determined by the dynamic light scattering method. The surface charge was determined by the electrophoretic mobility method. All analyzes were performed with the Zetasizer equipment (DLS, Malvern, USA). Samples were analyzed without dilution.

2.4. Cell Culture

The 4T1 mammary adenocarcinoma cell line was cultured in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), supplemented with 10 % (v / v) fetal bovine serum (v/v) and 1 % of antibiotic solution (100 IU/mL Penicillin – 100 µg/mL Streptomycin – v/v) at 37 °C and 5 % CO₂.

2.5. Cytotoxicity assay

Cells were seeded into 96-well culture plate at a density of $2 \cdot 10^3$ cells per well in DMEM culture medium overnight at 37 °C, 5% CO₂ in a humid atmosphere. Then, the medium was changed and various concentrations of PeNE, blank and free pequi oil were added (90, 180, 360, and 540 µg/mL, considering pequi concentration). The free pequi oil was previously diluted in ethanol with final concentration of ethanol lower than 1% per well which is nontoxic for cells. The plates were incubated for 24 and 48 h at 37°C, 5% CO₂ in a humid atmosphere.

Cell viability assay was performed using MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The MTT assay is based on the reduction of tetrazolium derivatives in living cells by mitochondrial dehydrogenases, allowing the estimation of the metabolic activity of cells. This assay enables the assessment of cell viability and proliferation as parameters of cell survival and growth [34]. After 24 and 48 h of incubation, the treatments were removed and 150 µL of the MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) was added in each well. The plates were incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂ in humid atmosphere. The culture medium was discarded and 150 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in each well. The absorbance was monitored using a spectrophotometer with a microplate reader at 595 nm (Molecular Devices, USA). The control group was considered as 100% cell viability.

2.6. Real-time cell analysis (RTCA)

The real-time cell analyzer - RTCA assay was performed to evaluate the proliferation rate of the cells. The cell line was seeded in the plates at a density of 1×10^3 cells/well. After 24 hours, cells were exposed to PeNE, free pequi oil and blank at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$. Phosphate buffer was used as a group control. Impedance of each well was measured at each 30 minutes throughout the experiment for 52 hours, as a parameter of cell growth in a RTCA instrument (xCelligence, Roche, Switzerland).

2.7. Plasma membrane integrity and cell count

Membrane integrity and cell proliferation evaluation by trypan blue assay was performed in a 12-well plate containing 3×10^4 cells / well. After 24 hours of exposure to pequi oil based-nanoemulsion (PeNE) and free pequi oil at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$, cells were trypsinised, centrifuged and the pellet obtained was resuspended in 100 μl of culture medium. The cells were stained with a trypan blue solution (0.4% in PBS - Sigma, USA). The number of total cells was determined in Neubauer's chamber, counting stained or non-stained cells. Cells with intact membrane were considered as non-stained cells; and stained blue as cells with damaged plasma membrane. Phosphate buffer (PBS) was used as a negative control.

2.8. Flow cytometry

2.8.1. Cells Treatment

For flow cytometry experiments, 4T1 cells were plated into 12-well culture plate at a density of 3×10^4 cells. After incubation for 24 hours at 37 °C, 5 % CO_2 in humid atmosphere, the cells were incubated with 1 mL of PeNE and free oil at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$. Cells incubated with phosphate buffer (PBS 1x) and hydrogen peroxide (H_2O_2 , 1 mM) were used as controls. After 24 and 48 hours of treatment, the cells were harvested by trypsinization with 5 minutes of exposure to trypsin (Life, USA) at 37 °C, 5 % CO_2 in humid atmosphere. Then, the trypsin was neutralized with complete culture media, and the cells were centrifuged at 3,083 g for 5 minutes at 4 °C in order to be further prepared for the assays described below.

2.8.2. *Annexin-V FITC/propidium iodide (PI) staining*

The annexin-V FITC/PI staining was applied to distinguish apoptotic cells and necrotic cells. After 24 and 48 hours of incubation with samples, the cells were washed in PBS 1x and resuspended in 100 μ L of binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂]. Then, 5 μ L of annexin-V FITC (BD, EUA) were added and incubated for 15 minutes in the dark at room temperature. Next, 10 μ L of PI (50 μ g/mL) and 200 μ L of binding buffer were added and the sample was analyzed by flow cytometer (BD FACSVerse™, EUA) using FITC and PerCP channels. A total of 10,000 events were collected per sample.

2.8.3. *Mitochondrial membrane potential and cells morphologic aspects*

The mitochondrial membrane potential analysis was performed to evaluate mechanism associated with apoptosis, using Rhodamine 123, a cationic fluorescent probe able to accumulate specifically in the mitochondria due to the negative transmembrane potential in this organelle in living cells (Ronot, Benel, Adolphe & Mounolou, 1986). Cells were washed twice in PBS 1x, and then 300 μ L of Rhodamine 123 (5 μ g/mL in PBS 1x, Thermo Fisher, USA) were added to each sample and incubated for 15 minutes at room temperature, protected from light. Then, the cells were washed twice with PBS 1x and were analyzed using a flow cytometer (BD FACSVerse™, USA) using FITC channel. A total of 10,000 events were collected per sample. Parameters related to the size and granularity of treated cells were obtained by flow cytometry (BD FACSVerse™, USA) using FSC and SSC channels, respectively. A total of 10,000 events were collected per sample.

2.8.4. *DNA fragmentation assay and cell-cycle*

The 4T1 cells were resuspended into 1 mL of cold ethanol (70%) and stored at -20 °C for 24 hours. After the incubation time, the cells were washed twice by PBS 1x and 100 μ L of RNase (50 μ g/mL) were added for 30 minutes at 37 °C, protected from light. Then, 100 μ L of propidium iodide (PI – 20 μ g/mL, Probes, Thermo Fisher, EUA) in PBS 1x were incubated for 30 minutes at room temperature, protected from light. The DNA fragmentation and cell cycle were analyzed using a flow cytometer (BD FACSVerse™, USA) using PI channel. A total of 10,000 events were collected per sample.

2.8.5. *Lysosomal membrane permeabilization / Detection of acidic vesicular organelles (AVOs)*

Acridine orange (AO) is a lysosome-tropic metachromatic fluorochrome. When excited with blue light, AO emits red fluorescence at high concentrations when it is present in lysosomes (Boya and Kroemer, 2008). Cells were exposed to 50 μM of AO for 30 minutes protected from light at room temperature. After time incubation, the lysosomal membrane permeabilization was analyzed by flow cytometer (BD FACSVerserTM, USA) using PI channel. A total of 10,000 events were collected per sample.

2.8.6. *ROS level*

Reactive Oxygen Species (ROS) level was analyzed using H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-29, 79-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, acethyl ester). Unspecific esterase cleaved H₂DCFDA in DCFDA that turns into fluorescent molecule of DCF with the presence of intracellular ROS. The cells were exposed to 100 μL of H₂DCFDA at 10 μM final concentration for 40-60 minutes, protected from light at room temperature. ROS level was then analyzed by flow cytometer (BD FACSVerserTM, USA) using FITC channel. A total of 10,000 events were collected per sample.

2.8.7 Calcium level

Intracellular calcium level was evaluated using fluo-4 AM staining. Acetoxymethyl ester (AM) is cleaved inside cells and release free fluo-4 as a green fluorescent calcium indicator. The cells were exposed to 2 μL of fluo-4 AM for 30 minutes at room temperature protected from light. Intracellular calcium measurement was performed by flow cytometer (BD FACSVerserTM, USA) using FITC channel. A total of 10,000 events were collected per sample.

2.9. *Cell morphology analysis by optical microscopy*

The 4T1 cell morphology was evaluated by optical microscopy images after 24 and 48 hours of treatment with pequi oil based-nanoemulsions (PeNE). Cells were seeded in 12-wells plates ($3 \cdot 10^4$ cells / well) and treated with 180 and 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PeNE and free oil. Phosphate buffer (PBS 1X) was used as a negative control. Each treatment was performed in triplicate. After 24 and 48 hours, wells were analyzed by Leica DMi1 microscope with 5X and 20X objectives. The images were captured by Leica MC170 HD camera.

2.10. Statistical analysis

Statistical differences between control and treated cells were evaluated by the analysis of variance (ANOVA) and Tukey post hoc test at a significance level of 0.05 using Graph Pad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) after verify normality of data with Shapiro-Wilk. All values were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All assays were performed in triplicates in three independent experiments.

3. Results

3.1 Dose- and time-dependent effect of PeNE on adenocarcinoma mammary cells

The PeNE used herein presented an average droplet size of 130.8 ± 1.2 nm, polydispersity index (PdI) of 0.241 ± 0.017 , and negative zeta potential of -21.1 ± 0.9 mV. PeNE and free pequi oil showed a dose- and time-dependent cytotoxic pattern with IC_{50} of 255.0 and 247.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively, at 24h; and of 229.9 and 295.2 $\mu\text{g/mL}$ respectively, at 48h (Fig.1) on adenocarcinoma mammary cells (4T1). The present data are similar to previous go pequi), reinforcing the reproducibility of the physico-chemical characteristics and biological effects of this formulation.

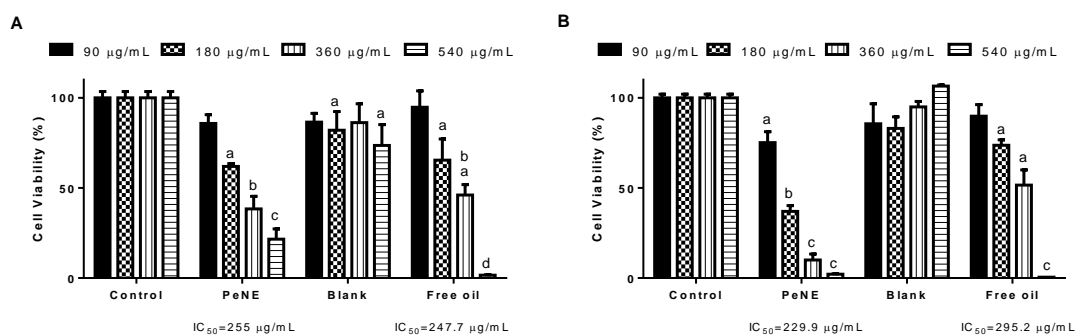


Figure 1. Cytotoxic effect on adenocarcinoma mammary cells (4T1). The cells were exposed to PeNE and free pequi oil at 90 – 180 – 360 and 540 $\mu\text{g/mL}$ for 24 (A) and 48 hours (B). Two-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

For the next assays, we investigated the effects of PeNE and free pequi oil at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$ after 24 and 48 hours of exposure.

3.2 PeNE altered cells morphology

Optical microscopic analysis of cells treated with PeNE or free pequi oil showed morphological abnormalities such as cell shrinkage, vacuole formation, and higher number of round cells when compared to control group (Fig. 2A). The morphologic alterations were more evident as the dose and time of exposure increased. Despite both PeNE and free oil reduced cell size (FSC-H) significantly (Fig. 2B); a more pronounced reduction was observed after PeNE treatment. Increase in granularity (SSC-H) was observed mainly at the dose of 180 $\mu\text{g/mL}$ in both treatments at 24 h exposure. After 48h, cell granularity of PeNE (360 $\mu\text{g/mL}$) group was significantly reduced, whereas no reduction was observed in the free oil group at 180 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2B-D).

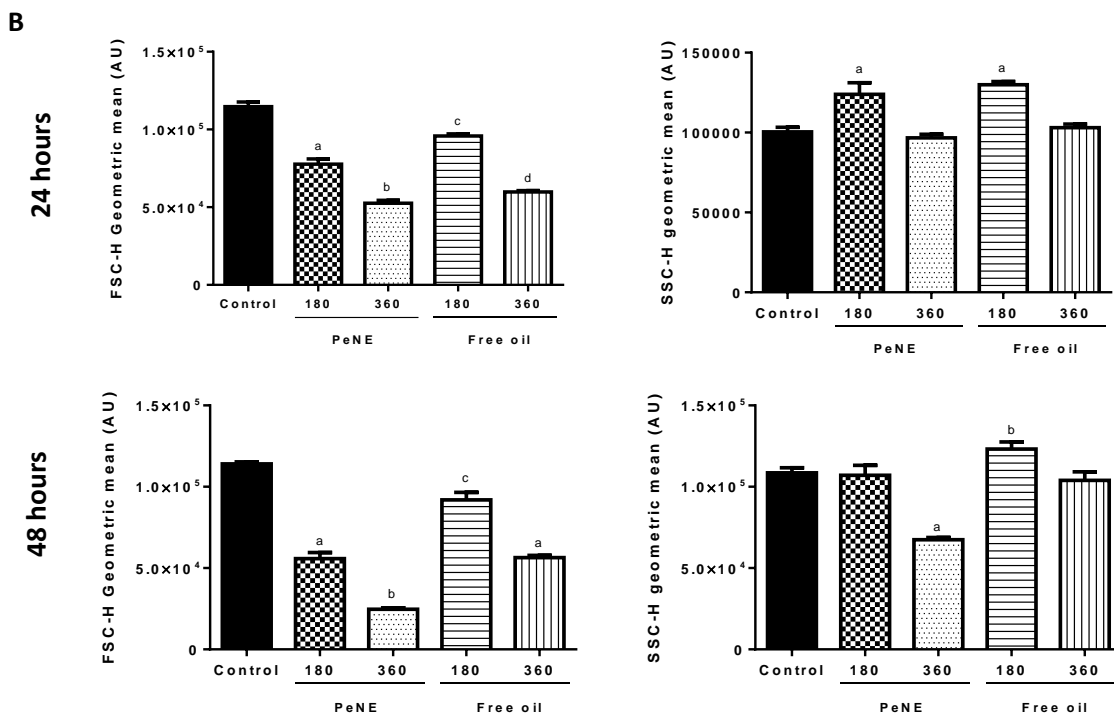
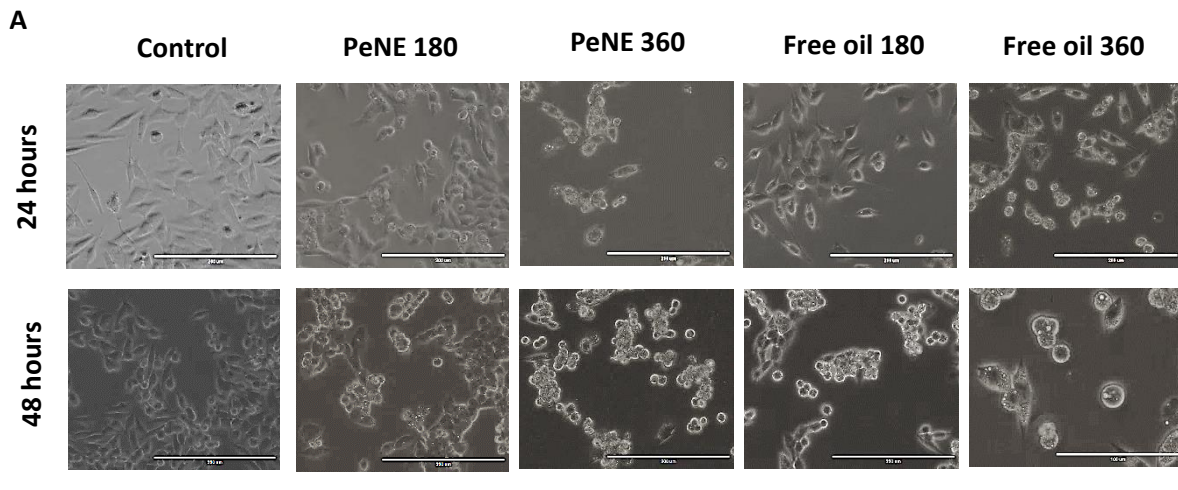


Figure 2. Morphologic analysis of adenocarcinoma mammary cells (4T1) by optic microscopy (**A**) and flow cytometer (**B**) after 24 and 48 hours of exposure with PeNE and free oil at 180 and 360 µg/mL. Control group was treated with PBS 1x. (A) Scale bar = 500 µm. (B) FSC-H = size and SSC-H = granularity. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.3 PeNE impaired cell proliferation and decreased total cell number without affecting cell cycle

Real-time cell adhesion/proliferation pattern of treated 4T1 cells was monitored during 52 hours. At the dose of 180 µg/mL, PeNE showed higher decrease on cell index than free pequi oil (~50% and ~98%, respectively; $p < 0.05$), suggesting that encapsulation of pequi oil improved its cytotoxic effects. At the dose of 360 µg/mL, both treatments showed similar cell indexes (Fig. 3A-C). In parallel, cell counting was performed to analyze the total cell number after exposure with PeNE and free pequi oil at both concentrations. After 24 hours, only cells exposed to PeNE at 360 µg/mL presented significant reduction of 40.3% on the total cell number ($p < 0.05$) (Fig. 3D). After 48 hours, PeNE and free pequi oil at the same concentration (360 µg/mL) significantly decreased the total cell number of 65.6 and 57.5 %, respectively ($p < 0.05$) (Fig. 3E).

The influence of PeNE and free pequi oil on cell cycle was also investigated. However, no expressive alterations on were observed (Fig. 3 D-E).

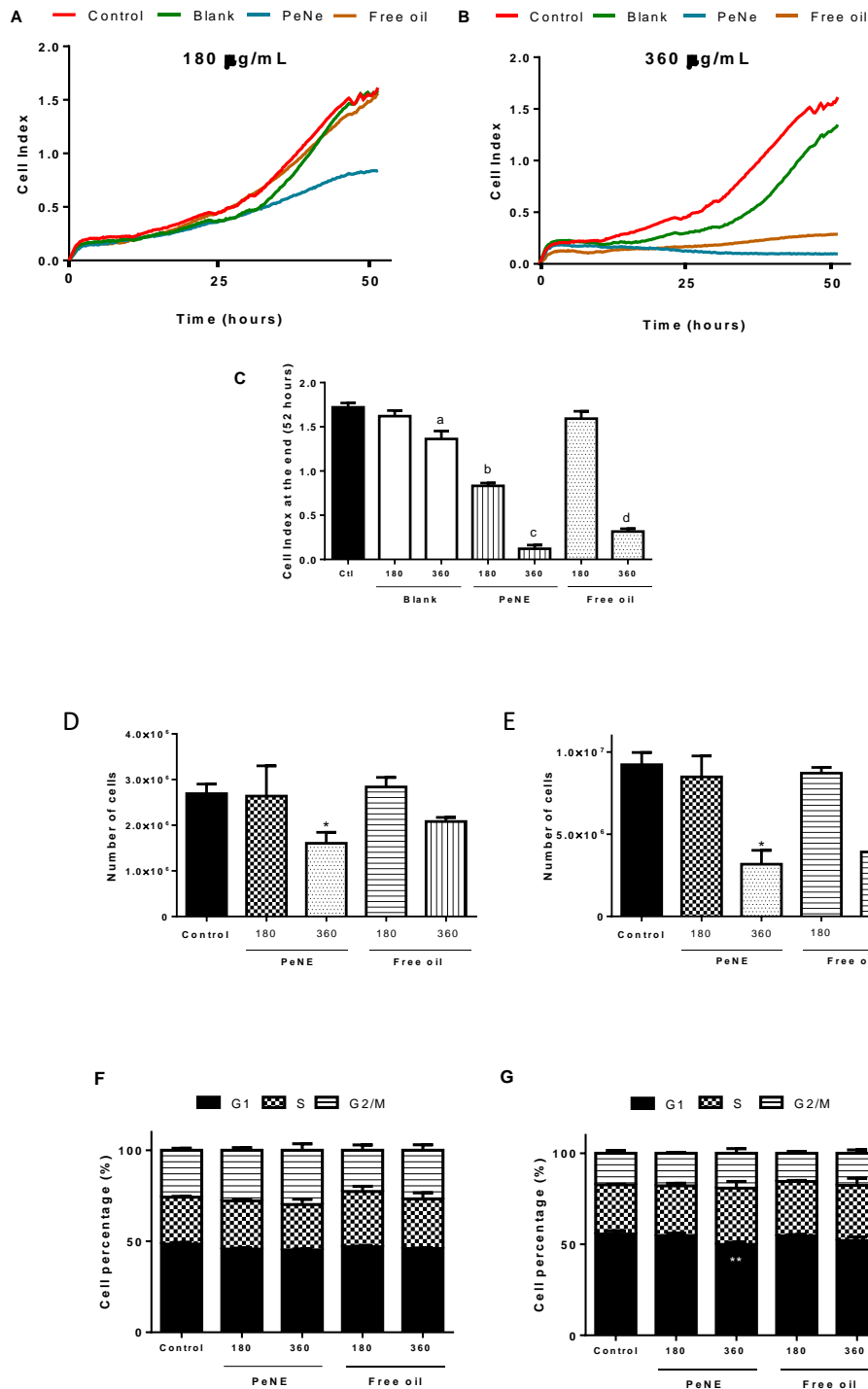


Figure 3. Effect of PeNE and free pequi oil on cells proliferation of carcinoma mammary cells (4T1), *in vitro*. Real-Time Cell Analysis (RTCA) performed after cells exposure with blank, PeNE and free pequi oil at 180 (A) and 360 µg/mL (B) for 52 hours. The cell index at the end (52 hours) is shown as a bar chart (C). Total cell number by trypan blue assay. Cells were exposed to PeNE and free oil at 180 and 360 µg/mL after 24 (D) and 48 hours (E). Cell cycle by flow cytometry. Effect of PeNE and free oil at 180 and 360 µg/mL on 4T1 cell cycle with exposure for 24 (F) e 48 hours (G). The cells were incubated with propidium iodide for 30 minutes at room temperature and cell cycle was analyzed by flow cytometry (10,000 events/sample). The

values are represented as mean \pm SEM. Phosphate buffer was used as control. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test) (C-D-E). Different letters indicate statistically significant differences between groups (C). Student test G1-control vs G1-PeNE at 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 48 hours (**: $p < 0.0093$) (G)

3.4. PeNE induced damage in plasma membrane, DNA fragmentation, and alteration on lysosomes membrane permeability and on mitochondrial membrane potential

After 24 h exposure, a discrete increase on plasma membrane damage was observed on both higher dose treatments; whereas, all groups showed a similar percentage of plasma membrane damage ($\sim 34\%$; $p < 0.01$) after 48 h exposure (Fig. 4A-B). All samples led to a reduction on lysosomal acidity (Fig. 4C-D). Interestingly, a more pronounced effect was observed on cells treated with free pequi oil at 24 h exposure. After 48 h of exposure, PeNE and free pequi oil demonstrated similar activity at 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (96.9 and 96.3%, respectively); whereas, at the dose of 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PeNE led to higher reduction on lysosomal acidity than free pequi oil (77.1 and 51.2%, respectively; $p < 0.01$).

Furthermore, this study showed that the exposure of 4T1 cells to PeNE and free oil induced significant dose and time-dependent modifications on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) (Fig. 4E-F). A similar tendency was observed after 24 and 48 hours for both treatments. Interestingly, at the dose of 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no-significant alterations on the $\Delta\Psi\text{m}$ of cells treated with free pequi oil were observed; while significant reductions of 55 % and 80 % on the $\Delta\Psi$ was induced on PeNE treated cells at 24 and 48h respectively ($p < 0.001$).

DNA fragmentation was noted after 24 and 48 h of exposure (Fig. 4 G-H). After 24 hours, PeNE at both concentrations, and free oil at 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, increased DNA fragmentation in 4T1 cell line around 20 % ($p < 0.001$) when compared to the control group (Fig. 4G). In this experiment, time exposure showed to be an important factor. Indeed, 70 and 60 % of DNA fragmentation was detected after 48 hours of exposure to PeNE and free oil at 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Fig. 4H).

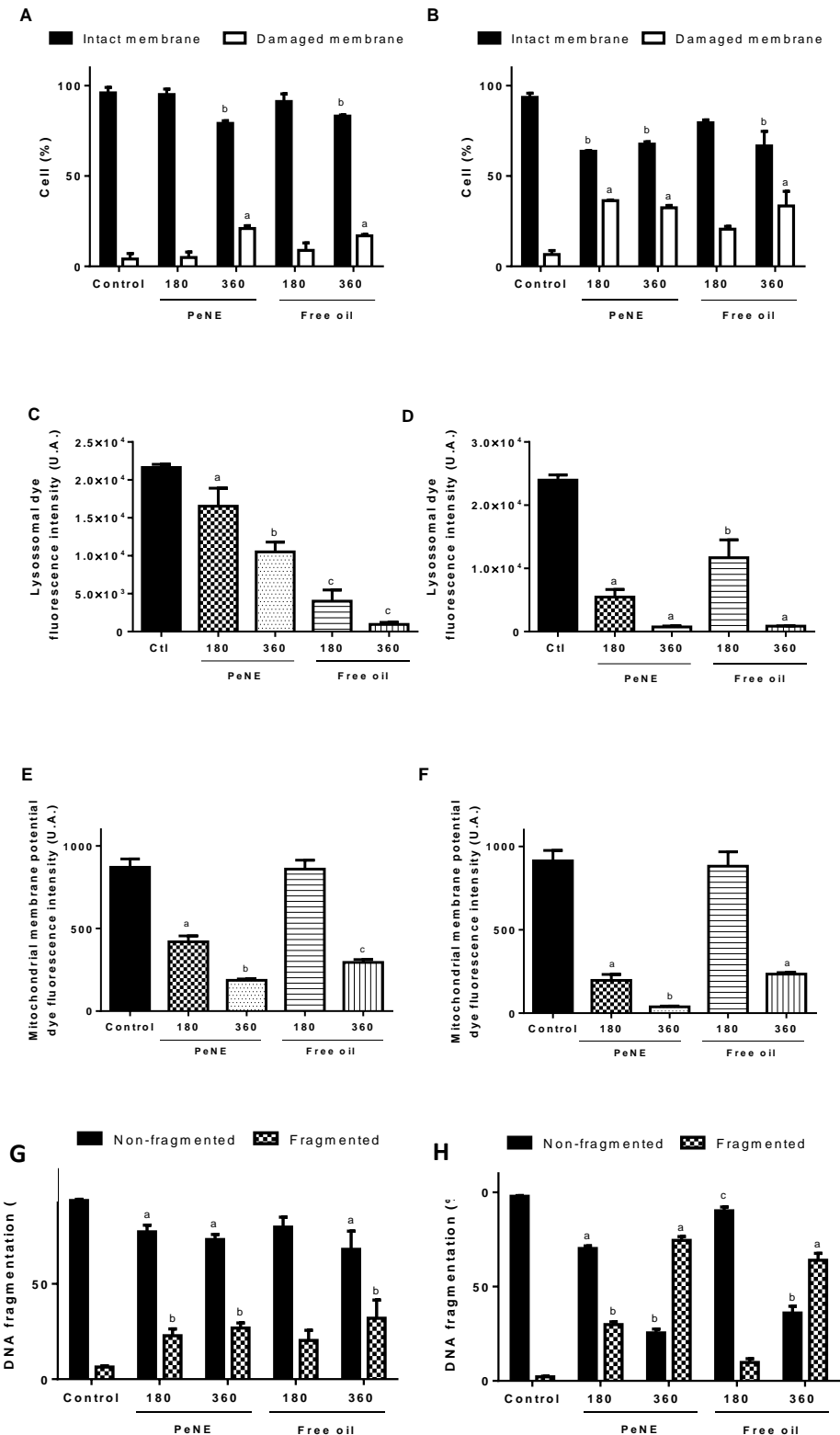


Figure 4. Effect of PeNE and free pequi oil on keys organelles and plasmatic membrane. Cells of adenocarcinoma mammary (4T1) were exposed to PeNE and free pequi oil at 180 and 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 and 48 hours. (A-B) Plasmatic membrane damage by trypan blue assay. (C-D) Lysosomal acidity evaluated by acridine orange and flow cytometry (10,000 events/sample, geometric mean representation). (E-F) Mitochondrial membrane potential analyzed by flow

cytometry and rhodamine 123 fluorescence. (10,000 events/sample, geometric mean representation). (G-H) DNA fragmentation measured by flow cytometry (10,000 events/sample). Phosphate buffer was used as control. Two-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test) (A-B and G-H). One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test) (C-D and E-F). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.5. PeNE reduced ROS level and increased intracellular calcium proportion

Cells exposed to PeNE at 180 $\mu\text{g/mL}$ and free pequi oil at both concentrations presented increase in ROS production of approximately 50% ($p < 0.01$) after 24 h (Fig. 5A-B). Free pequi oil led to higher level of intracellular ROS after 48 hours at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$ (50.2 and 46.9%, respectively) than PeNE at both concentrations (33.9 and 24.6%, respectively).

Further, significant decrease, followed by significant increase, of intracellular calcium levels were detected in all experimental groups after 24 and 48 hours, respectively ($p < 0.05$) (Fig. 5C-D).

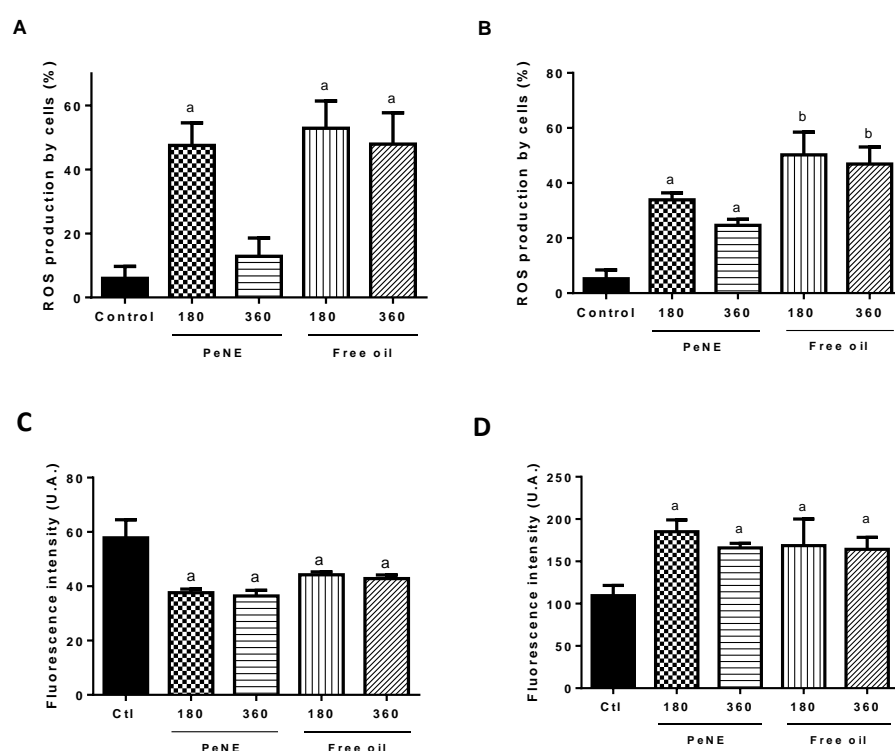
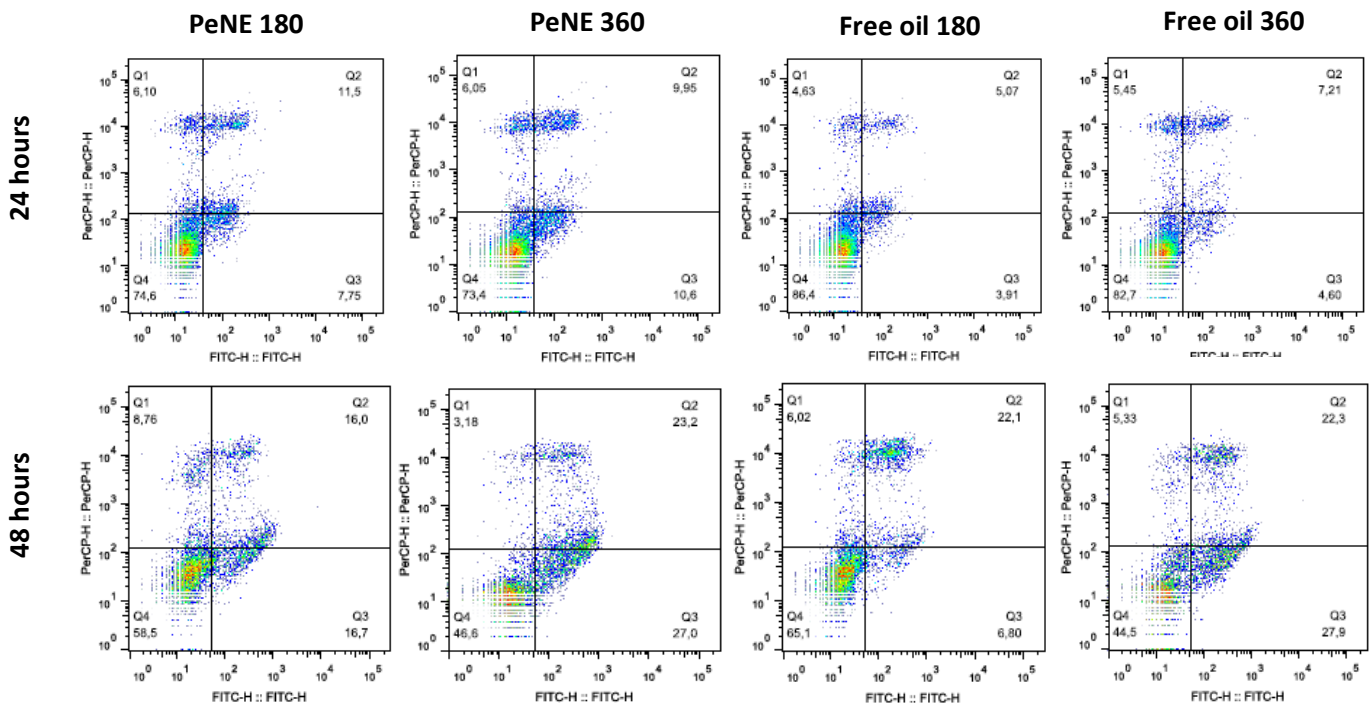


Figure 5. Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) analysis with CM-H₂DCFDA (A-B) and intracellular calcium analysis with fluo-4 AM (C-D) were evaluated by flow cytometry after 24 and 48 hours of exposure to PeNE and free oil at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$.

Representation of geometric mean of DCF and fluo-4 AM fluorescence. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.6 PeNE increased the proportion of apoptotic cells

After treatments, cells were categorized as viable cells (unmarked), cells in early stage of apoptosis (FITC+/PI-), cells in late apoptosis and/or necrosis (FITC+/PI+) and necrotic cells (FITC-/PI+). After 24 hours, cells exposed to PeNE at both concentrations presented higher percent of early apoptosis marker (FITC+/PI-) than free pequi oil ($p < 0.05$). After 48 hours, PeNE and free pequi oil at 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presented similar increase of early apoptotic cells (27.7 and 25.6%, respectively; $p < 0.05$). Nevertheless, at the dose of 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$, this percentage was higher on PeNE treated cells (17.3%) than after free pequi oil treatment (6.2%). Additionally, the proportion of cells in late apoptosis and/or necrosis significantly increased after exposure at both concentrations of PeNE and free pequi oil when compared to control group ($p < 0.05$) (Fig. 6 A-B).



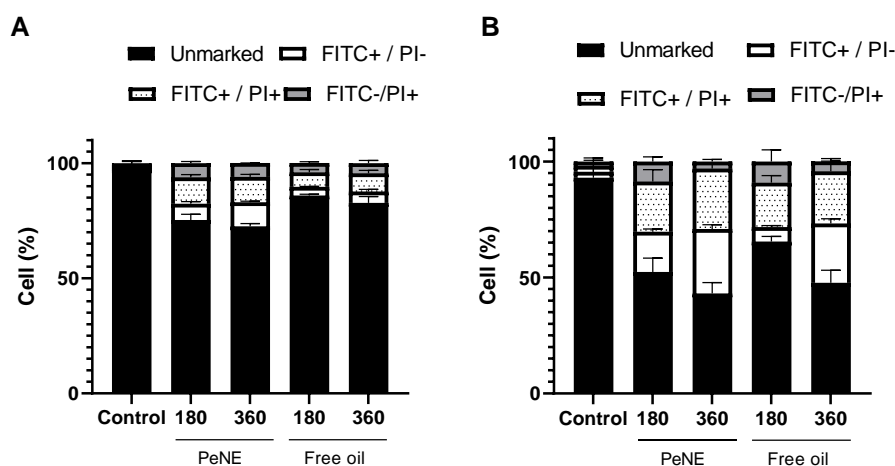


Figure 6. Representation of apoptotic cells stained by Annexin V-FITC in 4T1 cells after 24 (A) and 48 hours (B) of exposure to PeNE and free oil at 180 and 360 $\mu\text{g/mL}$. Phosphate buffer was used as negative control. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3 Discussion

This study aimed to investigate the effects of pequi oil PeNE on cell proliferation and on key cellular organelles and structures of a triple negative breast cancer cell line (4T1). The results showed that PeNE impaired cell proliferation, altered ROS production, extracellular calcium level, exposition of phosphatidylserine, integrity of plasma membrane, and organelle functions (lysosome, mitochondria, and nucleus). Although even free pequi oil also induced antitumor activity, PeNE showed improved effects, mostly at 180 $\mu\text{g/mL}$, promoting higher cytotoxicity and cellular alterations, which supports the idea that nanotechnology is a great strategy to overcome challenges involving the administration of hydrophobic compounds administration in cancer treatments. In the present work, it was shown that PeNE induces a dose-dependent reduction on total cell number without showing impressive alterations on cell cycle (Fig. 3F). This observation can be explained by the fact that cell number decrease may occur quickly by the activation of cell death mechanisms that do not necessarily affect cell cycle regulation. Data obtained from real time growth monitoring of treated cells (Fig XX) corroborate with these results where the reduction of cell index may correspond to loss of cell adherence due to morphological alterations and cell death.

Lysosomes are cytoplasmic membrane-enclosed organelles characterized by an acidic milieu ($\text{pH} < 5$) and contain hydrolytic enzymes responsible for controlled degradation

of cellular compounds. In the present work, PeNE and free pequi oil induced a decrease of lysosomal acidity (Fig. 4C-D) which is a remarkable consequence of lysosome membrane permeability - LMP (Boya et al., 2008; Replik et al., 2014). A total or partial damage of lysosomal membrane has been shown to induce cell death by different pathways including necrosis and apoptosis (Boya et al., 2008; Replik et al., 2014). LPM can cause the release of cathepsins and other lysosomal enzymes to the cytosol that can trigger the activation of caspases leading to cytochrome c release and activation of caspases for example (Boya et al., 2008; Replik et al., 2014). Cancer cells are particularly susceptible to LMP due to the presence of large lysosomes and for exhibiting higher metabolic rates that leads to lysosome iron accumulation (Boya et al., 2008; Replik et al., 2014). Free fatty acids and ROS are among the stimuli able to trigger LMP. Interestingly, both PeNE and free pequi oil treatments increased ROS levels (Fig. 5A-B), which might be directly involved with alterations observed not only in lysosomes but also in other cellular structures (plasma membrane) and organelles such as mitochondria and endoplasmic reticulum.

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) is associated with ATP synthesis and is a quality control system of the cell. Alterations on the $\Delta\Psi_m$ can result in cell dysfunctions that can lead to cell death (Zorova et al., 2013). At the dose of 180 $\mu\text{g/mL}$, PeNE induced significant and higher depolarization of mitochondrial membrane when compared to free pequi oil. This result may suggest that cell death observed after the exposure to PeNE to 4T1 cells might be associated to the activation of apoptotic pathways. Cell shrinkage (Fig. 1), DNA fragmentation (Fig. 4G-H) and exposure of phosphatidylserine (Fig. 6), common features of apoptosis (D'Arcy, 2019; Saadat et al., 2015), observed on PeNE treated cells reinforces this hypothesis.

Calcium (Ca^{2+}) homeostasis is important for cell functioning and it is involved in several cellular mechanisms such as gene expression, proliferation, differentiation, DNA repair, apoptosis, metastasis, and hormone secretion (Tajbakhsh et al., 2017). The endoplasmic reticulum (ER) is the principal organelle responsible for Ca^{2+} storage (Tajbakhsh et al., 2017). During apoptosis, alterations on ER Ca^{2+} storage can cause a stress response leading to cell death. In breast cancer, the natural product resveratrol triggers the release of Ca^{2+} from ER which activates the calpain protease and induces cell death by apoptosis (Sareen et al., 2007). Therefore, variations in Ca^{2+} levels observed on treated cells may be involved with endoplasmic reticulum stress.

Herein, it was possible to map the main effects of PeNE and free pequi oil on key cellular structures and organelles of triple negative breast cancer cells. Taken together, the results suggest an interesting induction of cell death mechanisms involving a combined action of factors that impair nucleus, mitochondria, lysosome, and endoplasmic reticulum functioning (Fig.7). In addition, more pronounced effects were observed in treated cells by PeNE at 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ when compared to free pequi oil, thereby reinforcing the advantages of using nanometric platforms for antitumor treatments. Moreover, considering the stability and physic-chemical characteristics of PeNE, this nanoparticle platform may be used as carriers of other antitumor compounds, particularly hydrophobic molecules, in order to improve their delivery to tumoral cells and enable a combined and enhanced treatment efficacy. These promising results highlight the use of PeNE as a potential complementary therapeutic approach to be employed along with conventional treatments against breast cancer in the future.

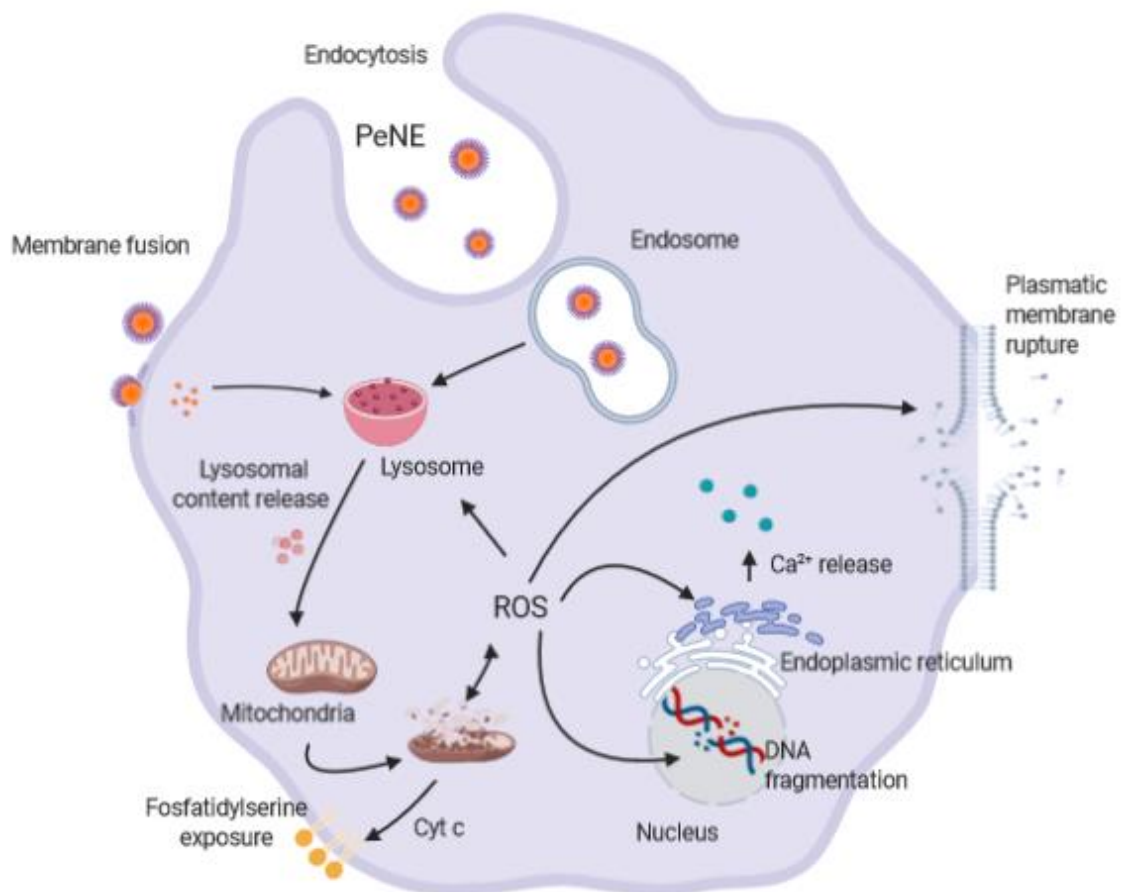


Figure 7. Suggested cell targets involved in the cytotoxicity of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE) on breast cancer cells (4T1). PeNE may be internalized by cells through endocytosis mechanism or membrane fusion. Source: own authorship creating in BioRender.com.

4 Conclusion

The results of this study revealed that nanotechnology strategy improved pequi oil effects against triple negative breast cancer cells, mainly at 180 µg/mL, inducing significant alterations on several key cellular structures and organelles functions leading to cell death. These promising results highlight the use of PeNE as a potential complementary therapeutic approach to be employed along with conventional treatments against breast cancer in the future.

References

- Boya, P., and G. Kroemer. 2008. "Lysosomal Membrane Permeabilization in Cell Death." *Oncogene* 27 (50): 6434–51. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.310>.
- Colombo, N. B.R., M. P. Rangel, V. Martins, M. Hage, D. P. Gelain, D. F. Barbeiro, C. K. Grisolia, E. R. Parra, and V. L. Capelozzi. 2015. "Caryocar Brasiliense Camb Protects against Genomic and Oxidative Damage in Urethane-Induced Lung Carcinogenesis." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48 (9): 852–62. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154467>.
- D'Arcy, Mark S. 2019. "Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy." *Cell Biology International* 43 (6): 582–92. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- Denkert, Carsten, Cornelia Liedtke, Andrew Tutt, and Gunter von Minckwitz. 2017. "Molecular Alterations in Triple-Negative Breast Cancer—the Road to New Treatment Strategies." *The Lancet* 389 (10087): 2430–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0).
- e Carvalho, Andréa Cruz, César Augusto Prías Márquez, Ricardo Bentes Azevedo, Graziella Anselmo Joanitti, Osmino Rodrigues Pires Júnior, Wagner Fontes, and Mariana S. Castro. 2015. "Cytotoxic Activity and Antiproliferative Effects of Crude Skin Secretion from *Physalaemus Nattereri* (Anura: Leptodactylidae) on in Vitro Melanoma Cells." *Toxins* 7 (10): 3989–4005. <https://doi.org/10.3390/toxins7103989>.
- Hay, Veronique Nogueira and Nissim. 2013. "Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy." <https://doi.org/10.1158/1078-0432>.
- Kavčič, Nežka, Katarina Pegan, and Boris Turk. 2017. "Lysosomes in Programmed Cell Death Pathways: From Initiators to Amplifiers." *Biological Chemistry* 398 (3): 289–301. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0252>.
- Miranda-Vilela, Ana L., Luiz C.S. Pereira, Carlos A. Gonçalves, and Cesar K. Grisolia. 2009. "Pequi Fruit (*Caryocar Brasiliense* Camb.) Pulp Oil Reduces Exercise-Induced Inflammatory Markers and Blood Pressure of Male and Female Runners." *Nutrition Research* 29 (12): 850–58. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.022>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Cesar K. Grisolia, João Paulo F. Longo, Raphael C.A. Peixoto, Marcos Célio de Almeida, Lilian Carla P. Barbosa, Mariana M. Roll, et al. 2014. "Oil Rich in Carotenoids Instead of Vitamins C and E as a Better Option to Reduce Doxorubicin-Induced Damage to Normal Cells of Ehrlich Tumor-Bearing Mice: Hematological,

- Toxicological and Histopathological Evaluations.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (11): 1161–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Flávia A. Portilho, Vitor G.B. De Araujo, Luciana L.C. Estevanato, Bélin P. Mezzomo, Maria de Fátima M. De Almeida Santos, and Zulmira G.M. Lacava. 2011. “The Protective Effects of Nutritional Antioxidant Therapy on Ehrlich Solid Tumor-Bearing Mice Depend on the Type of Antioxidant Therapy Chosen: Histology, Genotoxicity and Hematology Evaluations.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (11): 1091–98. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.09.009>.
- na C. Garrido-Castro , Nancy U. Lin, and Kornelia Polyak. 2019. “Insights into Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment.” <https://doi.org/158/2159-8290.CD-1>.
- Ombredane, Alicia S., Victor H.S. Araujo, Clarissa O. Borges, Patrícia L. Costa, Marcela G. Landim, Andréia C. Pinheiro, Ísis O. Szlachetka, et al. 2020. “Nanoemulsion-Based Systems as a Promising Approach for Enhancing the Antitumoral Activity of Pequi Oil (Caryocar Brasiliense Cambess.) in Breast Cancer Cells.” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 58 (May): 101819. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819>.
- Santos Câmara, Ana Lygia Dos, Gregor Nagel, Harald R. Tschiche, Camila Magalhães Cardador, Luis Alexandre Muehlmann, Daniela Mara De Oliveira, Paula Queiroz Alvim, Ricardo Bentes Azevedo, Marcelo Calderón, and João Paulo Figueiró Longo. 2017. “Acid-Sensitive Lipidated Doxorubicin Prodrug Entrapped in Nanoemulsion Impairs Lung Tumor Metastasis in a Breast Cancer Model.” *Nanomedicine* 12 (15): 1751–65. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0091>.
- Sareen, Dhruv, Soesiawati R. Darjatmoko, Daniel M. Albert, and Arthur S. Polans. 2007. “Mitochondria, Calcium, and Calpain Are Key Mediators of Resveratrol-Induced Apoptosis in Breast Cancer.” *Molecular Pharmacology* 72 (6): 1466–75. <https://doi.org/10.1124/mol.107.039040>.
- Sosa, Venus, Teresa Moliné, Rosa Somoza, Rosanna Paciucci, Hiroshi Kondoh, and Matilde E. LLeonart. 2013. “Oxidative Stress and Cancer: An Overview.” *Ageing Research Reviews* 12 (1): 376–90. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>.
- Tajbakhsh, Amir, Alireza Pasdar, Mehdi Rezaee, Mostafa Fazeli, Saman Soleimanpour, Seyed Mahdi Hassanian, Zahra Farshchiyan Yazdi, Tayebe Younesi Rad, Gordon A. Ferns, and Amir Avan. 2018. *The Current Status and Perspectives Regarding the Clinical Implication of Intracellular Calcium in Breast Cancer. Journal of Cellular Physiology*. Vol. 233. <https://doi.org/10.1002/jcp.26277>.
- Wang, Lijuan, Xuefeng Li, Gaoyong Zhang, Jinfeng Dong, and Julian Eastoe. 2007. “Oil-in-Water Nanoemulsions for Pesticide Formulations.” *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1): 230–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.079>.
- Zorova, Ljubava D, Vasily A Popkov, Egor Y Plotnikov, Denis N Silachev, B Irina, Stanislovas S Jankauskas, Valentina A Babenko, et al. 2018. “HHS Public Access,” 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>. Mitochondrial.

CAPÍTULO III

Additive cytotoxic effects of the association of docetaxel and anacardic acid entrapped in pequi oil based-nanoemulsion on adenocarcinoma mammary cells, *in vitro*.

Este capítulo ainda não foi publicado. Alicia Simalie Ombredane, Natália Ornelas Martins, Gabriela Mara Vieira de Souza, Victor Hugo Sousa Araujo, Ísis O. Szlachetka, Sebastião W. da Silva, Carlos, Mariana, Márcia Cristina Oliveira da Rocha, Luiz Antonio Soares Romeiro, Ricardo Bentes Azevedo, Graziella Anselmo Joanitti.

Abstract

Combinatory therapy associated with nanotechnology represents an alternative for the treatment of breast cancer, the type of cancer with the highest incidence among women in the world with 2.1 million cases in 2018. The combination of pequi oil, anacardic acid (AA) and docetaxel (DTX) in nanoemulsion can enhance the antitumor effect of each molecules and decrease side effects. Therefore, the aim of the study is the faith in formulated nanoemulsions based on pequi oil (PeNE) containing DTX and AA and to investigate cytotoxicity in breast cancer cells (4T1), *in vitro*. PeNE alone and with AA (PAA) and DTX (PDTX) were obtained by sonication method. Hydrodynamic diameter (DH), polydispersity index (PdI) and Zeta potential were measured by ZetaSizer®. Cytotoxicity and combination index (CI) were determined by MTT and Chou-Talalay methods, respectively. Flow cytometry was used to investigate effects of nanoemulsions on lysosomal membrane permeability (PML), mitochondrial membrane potential (PMM), cell cycle, apoptosis / necrosis cell death and caspase activation. Additionally, cell morphology was observed by inverted microscopy. PeNE, PDTX and PAA presented DH less than 200 nm and moderate PdI below 0.3. Then, the association PDTX+PAA induced a greater decrease in cell viability (~ 70%, $p < 0.0001$) and additive effect ($CI \sim 1$). In parallel, the association DTX+AA led to antagonism effect ($IC > 1$). Furthermore, PDTX+PAA induced morphological change, higher alteration on PML and PMM, cell cycle block in G2 / M phase and phosphatidylserine exposure. Thus, the study reports the success of the use of pequi oil-based nanoemulsion as a drug delivery system for DTX and AA, which improves the antitumor effect of each isolated compound and leads to additive effect. Both DTX and AA aggregated greater antitumor activity against breast cancer cells when associated with PeNE, suggesting that nanotechnology represents great potential for the treatment of breast cancer.

Key words: Nanoemulsion, Pequi Oil, Breast cancer, Docetaxel, Anacardic acid, Combinatory therapy

1- Introduction

Breast cancer is one of the most common cancer type worldwide among women (WWO, 2020). Conventional therapies such as chemotherapy are recommended to be employed mainly in early stages of cancer in order to increase cure chances. However, since it is known that different and heterogeneous cancer cell populations can be present in the same tumor mass, some cells may be resistant to the chemotherapeutic approach chosen; thereby, challenging treatment success. In this context, combination of therapies represents a great alternative for cancer treatment where different drugs are able to achieve different cellular targets, to increase cytotoxic activity (Jadia et al., 2016), and to reduce side effects (Kushwah et al., 2018).

Drugs combination is one type of combinatory therapy approved by FDA (Food and Drugs Administration). Docetaxel (DTX), a chemotherapeutic agent acting on tubulin stabilization, is commonly used in clinical administration and has showed to be highly efficient for metastatic breast cancers, although it is involved in several sides effects. DTX had been successfully associated with some others drugs like Gemcitabine, Ramucirumab, Pertuzumab, and cisplatin in treatment of breast cancer, non-small cell lung cancer, and prostate cancer (Jadia et al., 2016; Kushwah et al., 2018; Farha & Kasi, 2019).

Anacardic acid (AA) is a bioactive compound isolated from cashew nut (*Anacardium occidentale*) and has been described to present antitumor activities by reducing cell proliferation (Schultz et al., 2010; Zhao et al., 2018) and inducing apoptosis in cancer cells (Hemshekhar et al., 2012). Additionally, AA showed to be a great ligand for targeted cancer therapy because of its high affinity to vascular endothelial growth factor receptor (VEGF) receptors that are overexpressed in cancer cells (Kushwah et al., 2018b). Some studies reported the association of DTX and AA in nanoparticles against breast cancer (Kushwah et al., 2018; Kushwah et al., 2018b). However, in these cases, AA was used as a surface ligand to interact specifically to cancer cell receptors (eg. VEGF). In the present study, DTX and AA were used as antitumor agents acting in different cellular targets. Due to the hydrophobic nature of both molecules, nanotechnology strategies were chosen to enable their future application into lived organisms.

Nanoparticles have been increasingly used as carriers for hydrophobic compounds and as drug delivery systems for cancer treatment (Singh et al., 2017). These systems avoid early degradation of drugs and increase their internalization into targeted cells, reducing side effects (Rocha et al., 2017). Nanoemulsion is one type of nanometric drug

delivery system characterized by a mixture of aqueous and oil phases stabilized by surfactants (Kumar & Divya, 2015; Gupta et al., 2016). Usually, the oil phase has a structural role to form stable nanoemulsions able to carry hydrophobic molecules. Interestingly, in some cases, the oil phase can be chosen according to its biological properties (Ombredane & Araujo et al., 2020) and play a dual role acting both as structural and antitumor agents in synergism with the carried molecules.

Brazilian Cerrado represents great biodiversity environment with plants rich in antioxidants molecules. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is a native tree of Brazilian Cerrado rich in carotenoids, vitamin C, and phenolic compounds (Miranda-Vilela et al., 2009; Colombo et al., 2015; Guedes et al., 2017; Palmeira et al., 2016). Pequi oil have demonstrated anticancer activity in animal models. Oral supplementation of this oil led to inhibition of tumor growth, reduction of side effects induced by chemotherapeutic drugs, and potentiation of anticancer effects of magnetic hyperthermia therapy (Miranda-Vilela et al., 2011; Miranda-Vilela et al., 2013; Miranda-Vilela et al., 2014). Moreover, previous studies have reported the design, characterization, stability and cytotoxic effects of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE) on breast cancer cells, *in vitro* (Ombredane & Araujo et al., 2020).

Therefore, considering the above mentioned advantages of therapies associating different antitumor compounds, the aim of this study was to design and characterize PeNE formulation entrapping docetaxel and anacardic acid, separately, and also investigate their combined effects on the cytotoxicity, proliferation, and key cellular structures/organelles of triple-negative adenocarcinoma mammary cells (4T1), *in vitro*.

2- Materials and methods

2.1 Materials

The oil used in this study was extracted from the fruit by cold pressing and filtration and was purchased from pharmacopoeia of University of Brasilia. Docetaxel was purchased from. Anacardic acid was synthesized by Dr Luiz Romeiro from University of Brasilia (Brazil). The materials used for cell culture were purchased from the following companies: Ethanol, Penicillin, Streptomycin, Trypan Blue, Sodium Bicarbonate, Bovine Insulin, and Dimethyl sulfoxide were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Trypsin were purchased from Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA). The materials used

for flow cytometry were purchased from the following companies: Rhodamine 123 and Propidium iodide were purchased from Thermo Fisher (EUA); Binding buffer and Annexin-V FITC were purchased from Biosciences (BD, EUA). Murine breast adenocarcinoma cells (4T1) were donated by Professor Dra Suzanne Ostrand-Rosenberg (University of Maryland, Baltimore County, EUA).

2.2 Development of formulations

The development of the nanoemulsions was an adaptation of a method previously used in our previously study (Ombredane & Araujo et al., 2020). First, 1.7 mg of anacardic acid and 3 mg of docetaxel were dissolved, separately, in 32 mg of pequi oil and 5 ml of ethanol. The solvent was then removed by rota-evaporation. The two films formed by pequi oil and compounds were resuspended with 10 mL of phosphate buffer 1x containing egg lecithin (pequi oil:egg lecithin at proportion 1:2 (v/v)) and submitted to sonication at altered pulse of 40% amplitude for 3 minutes in ice bath. Then, 5 mL of phosphate buffer 1x were added to each solution and sonicated a second time at the same conditions previously described. Pequi oil based-nanoemulsion without compound and the blank formulation (without compound and pequi oil) were prepared similarly as described above. The developed formulations were stored at 4°C and under dark conditions until further analysis, in view of their better stability in this condition as evidenced by previous studies (Ombredane & Araujo et al., 2020).

2.3 Dynamic light scattering (DLS) and stability under time

The droplet hydrodynamic diameter as well as the Polydispersion Index (PdI) were determined by the dynamic light scattering method. The surface charge was determined by the electrophoretic mobility method. The stability of the formulations stored at 4 °C according to these parameters were evaluated for 60 days. All analyzes were performed with the Zetasizer equipment (DLS, Malvern, USA).

2.4 Analysis of infrared spectrophotometry – FTIR

For the FTIR measurements, the nanoemulsions were previously lyophilized (Thermo Savant SPD121P - Thermo scientific) and stored under nitrogen atmosphere until analysis. The FTIR experiments were performed using a Bruker spectrometer (model Vertex 70). Analysis was performed using the module attenuated total reflectance (ATR, Attenuated Total Reflectance). The measurements were averaged over 96 scans,

which were taken at a resolution of 4 cm^{-1} from 400 to 4000 cm^{-1} . The background signal was averaged over 96 scans before each measurement. Finally, the spectra were fitted using Gaussian functions. Data were treated with IR Solution software 1.50[®] and transferred to the graphics program GraphPad Prism 5.0[®] construction.

2.5 Electronic transmission microscopy

A morphological analysis of the nanoemulsions were performed by transmission electron microscopy (TEM). The sample were diluted 1:100 (v:v) in distilled water and 3 μL of this solution were diluted in copper screens covered with formvar film. The sample dried at room temperature, and then, they were contrasted with osmium tetroxide (OsO_4) steam for 5 minutes. The images were acquired using a transmission electron microscope (JEOL JEM-1011, Japan) at 80 kV.

2.6 Cell culture

The cell lines murine breast carcinoma (4T1) and murine fibroblast (NIH-3T3) were grown in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) supplemented with 10% of heat inactivated fetal bovine serum (v/v) or 10% of calf serum (v/v), respectively, and 1% of antibiotic solution (100 IU/mL Penicillin – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin – v/v) at 37°C and 5% CO_2 in humid atmosphere.

2.7 Cell treatment

For viability assay, cells were seeded into 96-well culture plate at a density of 2.10^3 cells per well (4T1) in DMEM culture medium overnight at 37°C , 5% CO_2 in humid atmosphere. Then, the medium was changed and various concentrations of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated to anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX), blank (BR), free AA, free DTX and free pequi oil (OL) were added. The concentrations tested were 90 – 180 – 360 - 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ considering pequi oil, 5 – 10 – 20 - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ considering AA and 8 – 17 – 33 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of docetaxel. The free pequi oil was previously diluted in ethanol. The final ethanol concentration was lower than 1% per well. The plates were incubated for 24 and 48 hours at 37°C , 5% CO_2 in humid atmosphere.

Combinations of sample were also tested. Cells were seeded into 96-well culture plate at a density of 2.10^3 cells per well (4T1) and 3.10^3 cells per well (NIH-3T3) in DMEM culture medium overnight at 37°C , 5% CO_2 in humid atmosphere. The medium was

changed and cells were exposed to “PeNE”, “PAA”, “PDTX”, “AA”, “DTX”, “PAA+PDTX” and “AA+DTX”. The concentration tested were 135 - 180 µg/mL considering pequi oil, 7 - 10 µg/mL considering AA and 12 - 16 µg/mL considering docetaxel. The plates were incubated for 24 and 48 hours at 37°C, 5% CO₂ in humid atmosphere. Combination index (CI) was calculated using CompuSyn® (Version 1.0) and interpreted according to Chou and Talalay method (1983).

2.8 Cell viability assay

Cell viability assay was performed using MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The MTT assay is based on the reduction of tetrazolium derivatives in living cells by mitochondrial dehydrogenases, allowing the estimation of the metabolic activity of cells. This assay enables the assessment of cell viability and proliferation as parameters of cell survival and growth. After 24 and 48 hours of incubation, the treatments were removed and 150 µL of the MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) was added in each well. The plates were incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO₂ in humid atmosphere. The culture medium was discarded and 150 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added in each well. The absorbance was monitored using a spectrophotometer with a microplate reader at 595 nm (Molecular Devices, EUA). The control group was considered as 100% of cell viability.

2.9 Plasma membrane integrity and cell count

Membrane integrity and cell proliferation evaluation by trypan blue assay was performed in a 24-well plate containing 2.10^4 cells / well. After 24 hours of exposure to PeNE, PAA, PDTX, AA, DTX, PAA+PDTX and AA+DTX at 180 µg/mL considering pequi oil, 10 µg/mL considering AA and 16 µg/mL, considering DTX, cells were trypsinised, centrifuged and the pellet obtained was resuspended in 100 µl of culture medium. The cells were stained with a tripan blue solution (0.4% in PBS - Sigma, USA). The number of total cells was determined in Neubauer's chamber, counting stained or non-stained cells. Cells with intact membrane were considered as non-stained cells; and stained blue as cells with damaged plasma membrane. Phosphate buffer (PBS) was used as a negative control.

2.10 Flow cytometry

2.10.1 Cells Treatment

For flow cytometry experiments, 4T1 cells were plated into 24-well culture plate at a density of 2.10^4 cells. After incubation for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in humid atmosphere, the cells were incubated with 0.5 mL of PeNE, PAA, PDTX, AA, DTX, PAA+PDTX and AA+DTX at 180 µg/mL considering pequi oil, 10 µg/mL considering AA and 16 µg/mL considering DTX. Cells incubated with phosphate buffer (PBS 1x) were used as control. After 24 hours of treatment, the cells were harvested by trypsinization with 5 minutes of exposure to trypsin (Life, USA) at 37°C, 5% CO₂ in humid atmosphere. Then, the trypsin was neutralized with complete culture media, and the cells were centrifuged at 3083 g for 5 minutes at 4 °C in order to be further prepared for the assays described below. Then, each assay was analyzed by flow cytometer (BD FACSVerserTM, USA) and a total of 10,000 events were collected per sample.

2.10.2 Lysosomal membrane permeabilization

Acridine orange (AO) is a lysosome-tropic metachromatic fluorochrome. When excited with blue light, AO emits red fluorescence at high concentrations when it is present in lysosomes. Cells were exposed to 50 µM of AO for 30 minutes protected from light at room temperature. Red fluorescence was observed using PI channel.

2.10.3 Mitochondrial membrane potential and cells morphologic aspects

The mitochondrial membrane potential analysis was performed to evaluate mechanism associated with apoptosis, using Rhodamine 123, a cationic fluorescent probe able to accumulate specifically in the mitochondria due to the negative transmembrane potential in this organelle in living cells. Cells were washed twice in PBS 1x, and then 300 µL of Rhodamine 123 (5 µg/mL in PBS 1x, Thermo Fisher, USA) were added to each sample and incubated for 15 minutes at room temperature, protected from light. Then, the cells were washed twice with PBS 1x and were analyzed using FTIC channel. Parameters related to the size and granularity of treated cells were obtained by flow cytometry (BD FACSVerserTM, USA) using FSC and SSC channels, respectively.

2.10.4 ROS level

Reactive Oxygen Species (ROS) level was analyzed using H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-29, 79-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, acethyl ester). Unspecific esterase cleaved H₂DCFDA in DCFDA that turns into fluorescent molecule of DCF with the presence of intracellular ROS. The cells were exposed to 100 µL of H₂DCFDA at 10 µM final concentration for 40-60 minutes, protected from light at room temperature. Cells were analyzed using FITC channel.

2.10.5 DNA fragmentation assay and cell-cycle

The cells were resuspended into 1 mL of cold ethanol (70%) and stored at -2°C for 24 hours. After the incubation time, the cells were washed twice by PBS 1x and 100 µL of RNase (50 µg/mL) were added for 30 minutes at 37°C, protected from light. Then, 100 µL of propidium iodide (PI – 20 µg/mL, Probes, Thermo Fisher, EUA) in PBS 1x were incubated for 30 minutes at room temperature, protected from light. Then, the cells were analyzed using PI channel.

2.10.6 Annexin-V FITC/propidium iodide (PI) staining

The annexin-V FITC/PI staining was applied to distinguish apoptotic cells and necrotic cells. The cells were washed in PBS 1x and resuspended in 100 µL of binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂]. Then, 5 µL of Annexin-V FITC (BD, EUA) were added and incubated for 15 minutes in the dark at room temperature. Next, 10 µL of PI (50 µg/mL) and 200 µL of binding buffer were added. The cells were analyzed using FITC and PI channels.

2.10.7 Multicaspase

Multicaspase assay was performed using Muse[®] MultiCaspase Kit (Merck, German). Basically, cells were resuspended in caspase buffer 1X and 5 µL of Muse[®] Multicaspase working solution was added to each sample. After 30 minutes of incubation at 37°C, protected from light, 150 µL of 7-AAD working solution were added. The samples were analyzed by flow cytometer (Muse[®] Cell Analyzer, German). A total of 5,000 events were collected per sample.

2.11 Clonogenic assay

Clonogenic assay was performed to measure the ability of cells to form colony. Cells were seeded at density of $2 \cdot 10^4$ cells per well in 24-well culture plate. After 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in humid atmosphere, the cells were exposed to PeNE, PAA, PDTX, AA, DTX, PAA+PDTX and AA+DTX at 180 µg/mL considering pequi oil, 10 µg/mL considering AA and 16 µg/mL considering DTX, for 24 hours. After time incubation, cells were plated in 6-well culture plates at the density of 1,000 cells per well in complete media and cultured for another 5 days at 37°C, 5% CO₂ in humid atmosphere without changing medium. Then, the media were removed, colonies were washed twice with cold PBS, fixed with methyl alcohol for 5 minutes at room temperature and stained with 0.5% violet crystal dye in 25% methyl alcohol and 75% of distilled water for 10 minutes at room temperature. Cells were then washed with distilled water and the number of colonies containing at least 50 cells was determined. The surviving fractions were calculated using the equations:

$$PE = n^\circ \text{ of formed colonies} / n^\circ \text{ of seeded cells} \times 100$$

$$FS = n^\circ \text{ formed colonies} / (n^\circ \text{ of seeded cells} \times PE)$$

2.12 Cell morphology analysis by optical microscopy

The 4T1 cell morphology was evaluated by optical microscopy images after 24 and 48 hours of treatment with pequi oil based-nanoemulsions (PeNE). Cells were seeded in 12-wells plates ($3 \cdot 10^4$ cells / well) and treated with 180 and 360 µg/mL of PeNE and free oil. Phosphate buffer (PBS 1X) was used as a negative control. Each treatment was performed in triplicate. After 24 and 48 hours, wells were analyzed by Leica DMi1 microscope with 5X and 20X objectives. The images were captured by Leica MC170 HD camera.

2.13 Statistical analysis

Statistical differences between control and treated cells were evaluated by the analysis of variance (ANOVA) and Tukey post hoc test at a significance level of 0.05 using Graph Pad Prism 6.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) with Shapiro-Wilk. All values were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) and a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. All assays were performed in triplicates in three independent experiments.

3 Results and discussion

3.1 Preparation and characterization of nanoemulsions

Nanoemulsions have been increasingly used as hydrophobic drug delivery systems for cancer therapies, including breast cancer (Kumar & Divya, 2015; Singh et al., 2017; Sanchez-López et al., 2019). Herein, we investigated for the first time the cytotoxicity of PeNE associated with docetaxel and anacardic acid in adenocarcinoma mammary cells, *in vitro*.

Firstly, we evaluated the physicochemical properties of the formulations obtained. Studies have reported that mean diameter of nanoemulsion droplets should be less than 500 nm (Kumar & Divya, 2015; Singh et al., 2017). However, some other studies considered a mean size below 200 nm (Harwansh et al., 2019). We obtained formulations with hydrodynamic diameter (HD) inferior to 200 nm (Table 1) corroborating with both concepts. Formulations also presented PDI values below 0.3 (Table 1). As technical approach, a polydispersity index (PDI) values of 0.1 to 0.4 is considered as moderately polydisperse (Bhattacharjee, 2016). Nevertheless, for drug delivery system PDI values below 0.3 indicate homogeneous size distribution (Danaei et al., 2018).

At neutral pH, all formulations presented negative zeta potential of approximately -20 mV. Additionally, PeNE, PAA and PDTX presented spherical shape by electronic transmission microscopy analysis (Fig. 1). Yadav&Gupta (2013) also reported spherical shape of docetaxel loaded fat nanoemulsion stabilized by soy phosphatidylcholine. AA-containing liposome samples demonstrated circular structure by TEM analysis (Filipcjak et al., 2019).

Table 1. Physicochemical characteristics of the different formulations.

	HD (NM)	PDI	ZETA POTENTIAL (MV)	PH
PeNE	164.8 ± 6.1	0.269 ± 0.015	-19.2 ± 0.9	7
PAA	164.8 ± 0.7	0.272 ± 0.019	-23.7 ± 0.4	7
PDTX	146.6 ± 3.4	0.257 ± 0.030	-20.3 ± 1.6	7

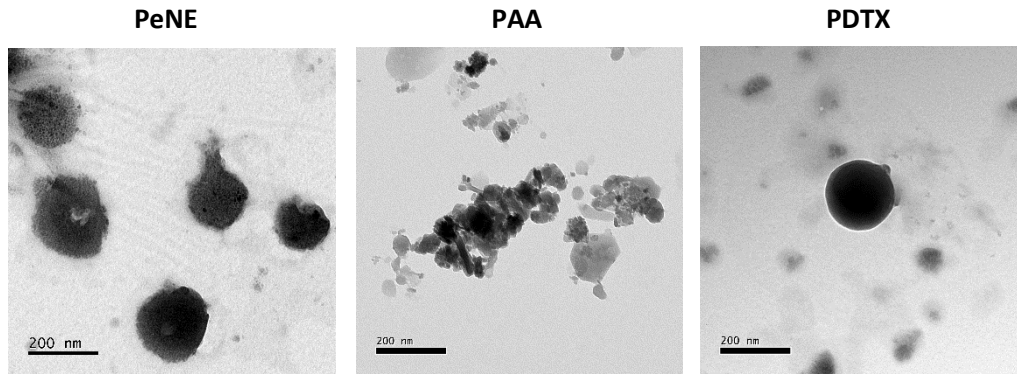


Figure 1. Transmission electron micrograph of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated with anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX). Scale bar = 200 nm.

The knowledge of stability indexes of nanoemulsions is an important parameter to be evaluated, particularly when considering their future biomedical applications, Nanoemulsion are kinetically stable but thermodynamically unstable. Consequently, some instability can be observed such as gravitational separation, flocculation, coalescence, and Ostwald ripening (McClement, 2018; Kumar et al., 2019). In this study, all nanoemulsions remained homogeneous during period evaluated (60 days). Characteristics such as hydrodynamic diameter (HD), PdI, and zeta potential values continued stable over time at 4°C storage temperature (Fig. 2).

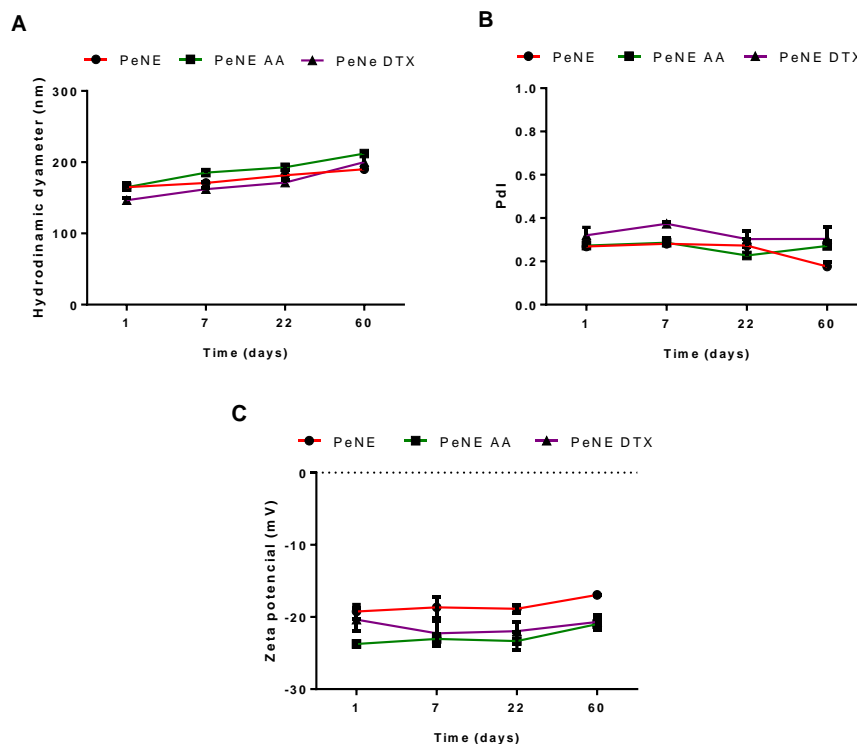


Figure 2. Evaluation of stability of pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated to anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX) over time storage at 4°C according to hydrodynamic diameter (A), polydispersity index (B) and zeta potential (C). One-way ANOVA $p < 0.05$ (Tukey post hoc test).

Figure 3 shows the FTIR spectra of the nanoemulsions PeNE (i), PAA (ii) and PDTX (iii). For comparison purposes, FTIR spectra of lecithin (iv), pure pequi oil (v), and the free drugs anacardic acid (AA) (vi) and docetaxel (DTX) (vii) are also required. The spectra of the PeNE, PAA, and PDTX presented spectral characteristics similar to the lecithin, with bands associated with the polar head at 970 and 1234 cm^{-1} , referring to the vibration modes. The absorption bands of the methylene and methyl groups from the hydrocarbon chain are found at 721 ($\delta(\text{CH}_2)$), 1380 ($\delta(\text{CH}_3)$), 1465 ($\tau(\text{CH}_2)$), 2852 ($\nu_s(\text{CH}_2)$), 2920 ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$) e 2955 cm^{-1} ($\nu_{as}(\text{CH}_3)$) (Wong, 1984).

Since the molecular composition of pequi oil and lecithin are very similar, with the exception of the vibrations from the polar head group of the phosphatidylcholines that make up lecithin, it is not possible to separate the individual contributions of each component in the FTIR spectra (see Fig. 3 spectra (iv) and (v)). Furthermore, by comparing the FTIR spectra of the nanoemulsions (Fig. 3 (i-iv)) with the spectra of the AA (Fig. 3 (vi)) and DTX (Fig. 3 (vii)), it is possible to verify that there is obvious spectral

evidence of the presence of the latter in the spectra of nanoemulsions. Finally, the stretching vibrations of the carbonyl ester group $\nu(\text{C}=\text{O})$ are found around 1740 cm^{-1} .

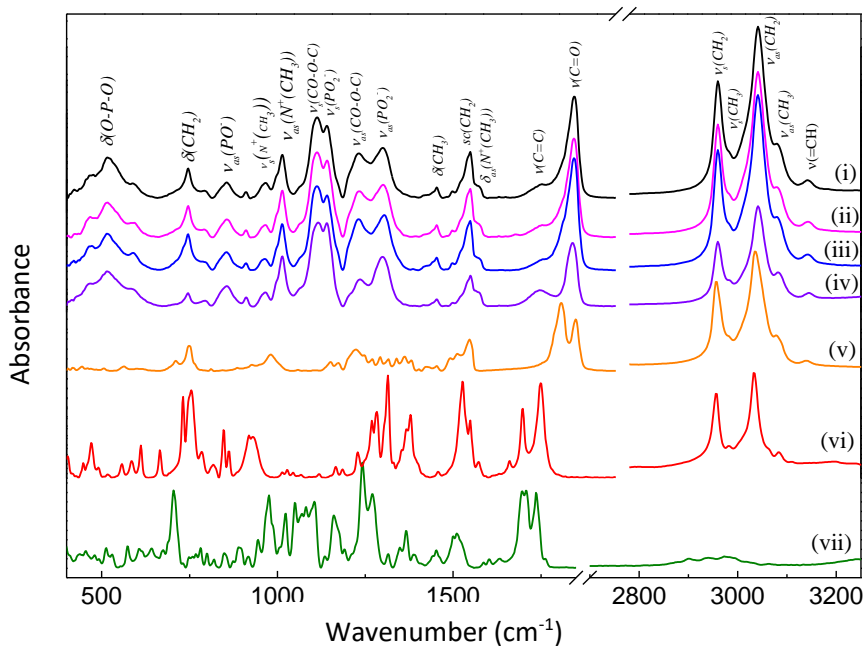


Figure 3. Infrared absorbance spectrum of pequi nanoemulsion (PeNE) (i), pequi nanoemulsion with anacardic acid (PAA) (ii), pequi nanoemulsion with docetaxel (PDTX) (iii), white (iv), pure pequi oil (v), pure anacardic acid (vi) and pure docetaxel (vii).

The hypothesis of the drug's effect on the packaging of the hydrocarbon chains is reinforced by the absorption bands of the methylene group's stretching modes ($\nu(\text{CH}_2)$) (see Fig. 4). Note that, although small, the vibrational energies, as well as the ratios between the intensities ($I_{\nu_{as}(\text{CH}_2)} / I_{\nu_s(\text{CH}_2)}$) of the symmetric and asymmetric stretching modes of the group CH_2 decrease in the same sequence as before, ie PeNE, PAA and PDTX (see Fig. 4 (be)).

It is known from the literature that the stretching vibrations of the CH_2 group are sensitive to the conformation of the hydrocarbon chain and respond to changes in the proportion of trans / gauche rotamers of the fatty acid acyl chains (Genova et al., 2018; Mantsch & McElhaney, 1991). For example, the conformational disorder of the all-trans acyl chain is accompanied by an increase in vibrational energies and an increase in the ratio between the intensities I_{2922} / I_{2853} of the bands associated with the CH_2 group of lipid hydrocarbon chains. (Orendorff et al., 2002).

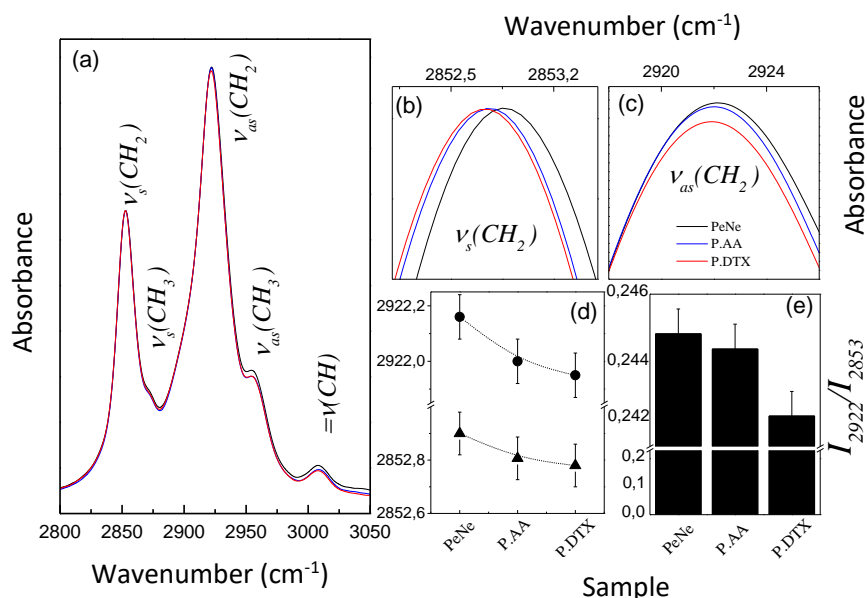


Figure 4. (a) Infrared absorbance spectrum in the region of 2800 to 3050 cm⁻¹ of the pequi nanoemulsion (PeNE - black line), pequi nanoemulsion with anacardic acid (PAA - blue line) and pequi nanoemulsion with docetaxel (PDTX - red line). Magnification of spectral regions around 2852 cm⁻¹ (b) and 2922 cm⁻¹ (c). Dependence on vibrational energies (d) and the ratios between the intensities of the absorption bands $\nu_s(\text{CH}_2)$ and $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ as a function of the different nanoemulsions.

Based on the previous discussions, it is possible to suggest that the addition of drugs promotes a conformational ordering in the hydrocarbon chains that make up the nanoemulsions. Since the drug DTX promotes a higher order than AA, this conformational ordering is greater than the nanoemulsion without the drugs.

3.2 Additive cytotoxic effects of PAA and PDTX on adenocarcinoma mammary cells (4T1)

Cell viability was analyzed after 24 and 48 h of exposure by MTT assay (Table 2). We observed that PeNE significantly decreased cell viability at 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20 and 30% after 24 and 48 hours, respectively, $p < 0.0001$) as expected since our previous studies have showed dose- and time- dependent cytotoxicity of PeNE in 4T1 cells (Ombredane & Araujo, 2020). The presence of AA and DTX (PAA and PDTX) increased the cytotoxicity of PeNE. Indeed, it was noted a reduction on cell viability of 34 and 50% ($p < 0.0001$), respectively, after 24 h at 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (concentration corresponding to pequi oil). After 48 h, this reduction was higher, with cell viability decrease of 60 and 64%

($p < 0.0001$), respectively. Interestingly, the encapsulation of AA and DTX improved their cytotoxic activity. AA did not induce cytotoxicity in the tested concentrations (7 and 10 $\mu\text{g/mL}$), and DTX only reduced 30% of viability at both concentrations 12 and 16 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.0001$) after 24 and 48 h. Next, the association of AA+DTX did not enhanced the cytotoxic effect of both molecules. Instead, AA+DTX demonstrated similar reduction of cell viability to DTX alone. However, and interestingly, PAA+PDTX showed better cytotoxic activity ($p < 0.0001$) when compare to all others groups, including PAA and PDTX alone.

Table 2. Cytotoxic effect on adenocarcinoma mammary cells and fibroblasts after 24 and 48 hours.

				24 hours	48 hours
	[Pequi oil]	[AA]	[DTX]		
	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$		
Control	-	-	-	100.0 \pm 5.2	100.0 \pm 19.5
PeNE	135	-	-	90.2 \pm 12.8	91.9 \pm 17.1
	180	-	-	75.1 \pm 10.1 ^a	68.7 \pm 10.5 ^a
PAA	135	7	-	79.4 \pm 9.3 ^{a,b}	62.4 \pm 12.2 ^a
	180	10	-	66.8 \pm 5.9 ^{b,d}	40.0 \pm 8.3 ^b
PDTX	135	-	12	57.1 \pm 9.6 ^{c,d}	40.7 \pm 6.2 ^b
	180	-	16	50.7 \pm 6.0 ^{c,d}	36.8 \pm 5.4 ^b
AA	-	7	-	100.5 \pm 11.4	115.7 \pm 21.2
	-	10	-	107.7 \pm 7.2	187.5 \pm 23.0 ^d
DTX	-	-	12	74.2 \pm 6.0 ^{a,b}	73.6 \pm 6.8 ^a
	-	-	16	72.9 \pm 6.8 ^{a,b}	69.0 \pm 10.3 ^a
	135	7	12	45.8 \pm 6.6 ^c	30.3 \pm 8.1 ^{b,c}
PAA+PDTX	135	7	12	39.3 \pm 6.6 ^c	25.9 \pm 5.7 ^{b,c}
	180	10	16	40.2 \pm 5.9 ^{c,e}	17.9 \pm 3.8 ^c
	180	10	16	31.4 \pm 6.0 ^e	12.7 \pm 2.6 ^c
	-	7	12	76.6 \pm 6.8 ^{a,b}	81.8 \pm 8.7
AA+DTX	-	7	12	69.8 \pm 10.3 ^b	72.1 \pm 8.0 ^a
	-	10	16	76.3 \pm 7.3 ^{a,b}	77.7 \pm 9.4 ^a
	-	10	16	65.4 \pm 8.9 ^b	61.0 \pm 4.3 ^a

The values are expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0,05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

Combination index values were calculated to determine whether association of AA and DTX in PeNE and combination of AA+DTX and PAA+PDTX induced synergism, additive effect, or antagonism (Table 3). Chou and Talalay (1983) elaborated a combination index (CI) theorem that defines additive effect ($CI = 1$), synergism ($CI < 1$), and antagonism ($CI > 1$) in drug combination. Herein, we demonstrated that AA+DTX induced antagonism ($CI = 2.572$). As previously observed in MTT assay, the presence of AA did not influence the cytotoxicity of DTX. However, the association of AA and DTX in PeNE led to synergism ($CI = 0.913$ and 0.640 , respectively). Additionally, the

association of AA and DTX encapsulated (PAA+PDTX) demonstrated additive effect (CI = 0.991) suggesting that the use of nanotechnology improves cytotoxic outcomes.

Table 3. Combination index values 24 hours.

	Fa*	DRI** PeNE	DRI AA	DRI DTX	DRI PAA	DRI PDTX	CI*** VALUES	EFFECT
PAA	0.52	1.82	2.71	-	-	-	0.91361	Additive
PDTX	0.67	2.62	-	3.84	-	-	0.64067	Synergism
PAA+PDTX	0.68	-	-	-	2.13	1.90	0.99141	Additive
AA + DTX	0.34	-	1.17	0.73	-	-	2.57225	Antagonism

*Fa: Fraction affected (death cells)

**DRI: Dose Reduction Index

***CI: Combination Index

Considering 180 µg/mL of pequi oil for each pequi oil based-nanoemulsion and corresponding AA and DTX concentration (10 and 16 µg/mL, respectively).

The use of combination therapy provides improved cytotoxic response rates than treatments with one chemotherapeutic drug alone (Li, et al., 2015) (Hejazi, et al., 2015). In the present work, we suggested that the combination of bioactive compounds present in pequi oil along with DTX and AA may have increased the tumor cells sensitivity to the treatment.

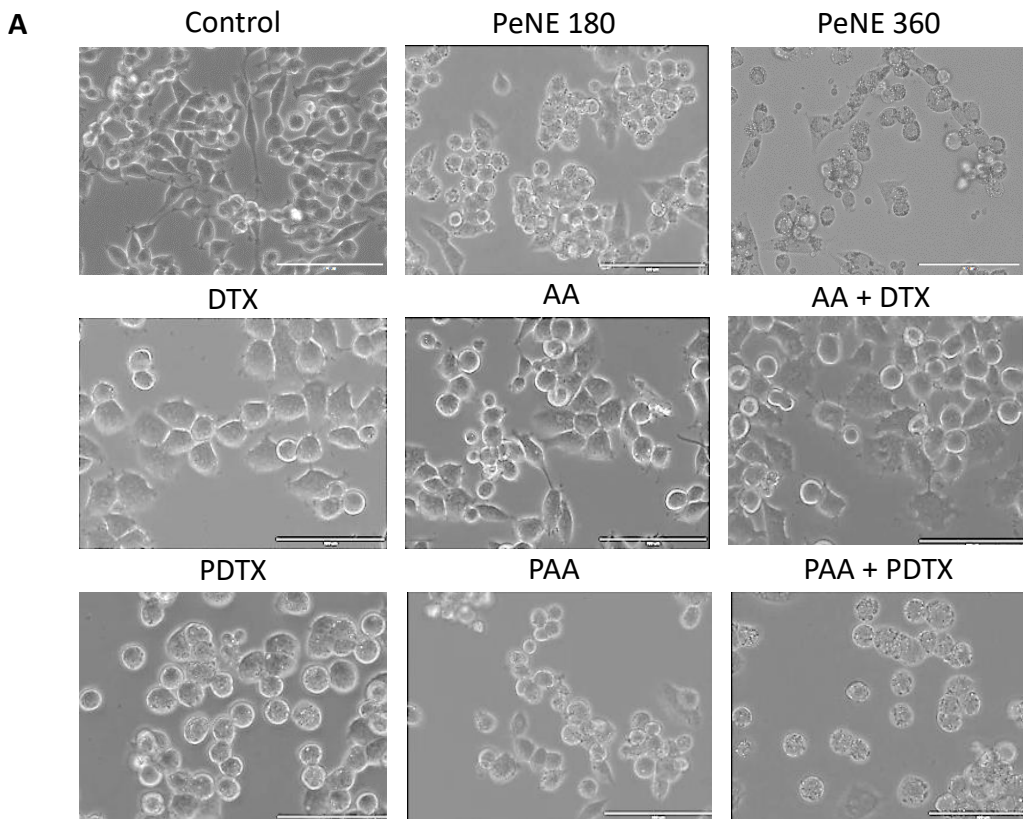
3.3 PAA + PDTX altered breast cancer cell morphology

Alterations on cell morphology indicate changes of physiological processes and cell death. The morphology of adenocarcinoma mammary cells (4T1) exposed to samples for 24 hours was evaluated by contrast phase microscopy and flow cytometry (Figure). Cells from control group presented regular morphology of 4T1 (a mix of rounded and stretched cells) (Figure A). No significant alteration was observed in cells exposed to AA alone. However, cells exposed to all other samples (DTX, AA+DTX, PeNE, PAA, PDTX and PAA+PDTX) presented changes in morphology with higher density of rounded cells and presence of vacuoles (Fig.5A).

Size (FSC-H) and granularity (SSC-H) analysis corroborated with microscopic observations. Cells exposed to AA did not suffer morphological changes. On the other hand, significant decrease on cell size was noted in cells exposed to PeNE, PAA, PDTX, PAA+PDTX (22 – 18 – 46 and 52 %, respectively, p<0.0001). Regarding granularity,

only cells exposed to PDTX and AA did not present significant changes when compared to control group.

Different morphological changes are associated with cell death mechanism as apoptosis, necrosis, and autophagy. Shrinkage and formation of vacuoles (apoptotic bodies) characterized apoptosis. However, further analysis should be done to confirm cell death mechanism.



B

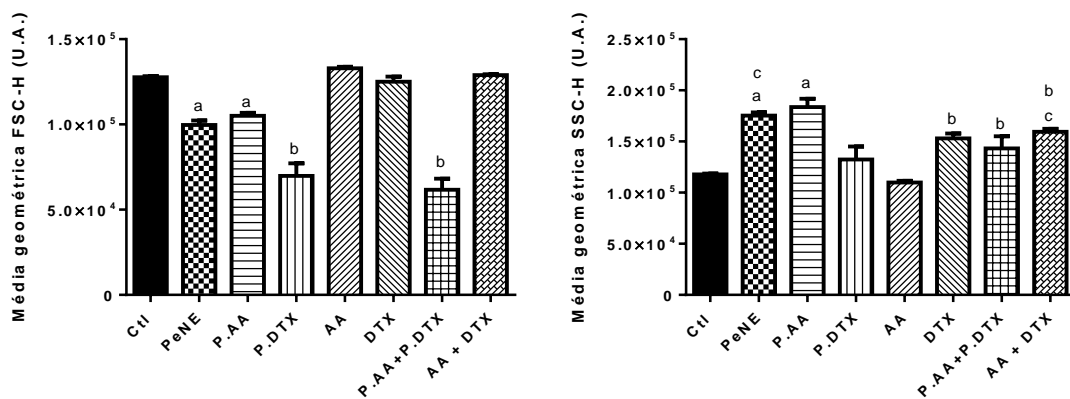


Figure 5. Morphologic analysis of adenocarcinoma mammary cells (4T1) by optic microscopy (A) and flow cytometer (B) after 24 hours of exposure with pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated with anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX), free anacardic acid (AA), free docetaxel (DTX), association of PeNEAA e PeNEDTX (PAA + PDTX) and association of free AA and free DTX (AA + DTX) at 180 µg/mL of pequi oil, 10 µg/mL of AA and 16 µg/mL of DTX. Control group was treated with phosphate buffer. (A) Scale bar = 100 µm. (B) FSC-H = size and SSC-H = granularity. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0,05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.4 PAA + PDTX significantly altered key organelles

Further analysis was performed to evaluate the effect of samples in different key organelles, plasma membrane and in some physiological processes like Ca^{2+} level and intracellular ROS production (Fig.6).

Lysosome is an acidic organelle containing several hydrolase enzyme responsible for recycling cell content. Recently, lysosome was shown to be also associated with regulating cell metabolism and cell growth. It is known that lysosome function can improve carcinogenesis, that is why it represents a great target for cancer treatment (Towers 2018; Fennelly, 2017). After 24 hours of exposure, we measured the lysosomal membrane permeability by flow cytometry using acridine orange (AO), a specific dye for acidic organelle. Significant decrease of AO accumulation into lysosome was observed after exposure to PeNE, PAA, PDTX, AA and PAA+PDTX ($p < 0.0001$). PAA+PDTX reduced more this accumulation when compare to other groups. This reduction suggests release of lysosomal content into cytosol and decrease of its acidity environment. DTX and AA+DTX significantly increased the accumulation of AO into lysosome. Zhang and coworkers (2018) also reported increase in lysosomal acidification after docetaxel exposure to gastric cells, *in vitro*. The exposure of some drugs may induce lysosomal biogenesis resulting in higher number of lysosome per cell, increase of lysosomal volume, and enzyme activity. Thus, hydrophobic drugs may be sequestered into lysosomal compartment, reducing the access to their target sites and decreasing their cytotoxic effect. (Zhitomirsky&Assaraf, 2016; Zhang et al., 2018). In this study, DTX and AA+DTX results in higher acidity of lysosome when compared to control group and also, when compared to PDTX and PAA+PDTX, respectively. Moreover, PDTX and PAA+PDTX also demonstrated higher cytotoxic activity than DTX and AA+DTX (Table

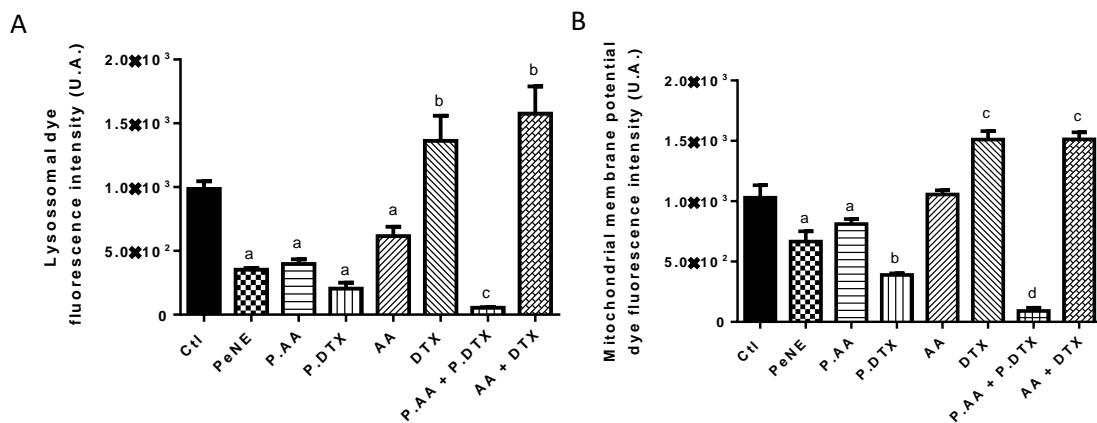
2) suggesting that the use of nanotechnology might change the interactions and intracellular targets of the drugs.

Recently, lysosomal membrane permeation has been considered as an initiation step in cell death mechanism, leading to alterations in other organelles such as mitochondria. Cell exposure to PeNE, PAA, PDTX and PAA+PDTX led to depolarization of mitochondrial membrane ($p < 0.0001$) (Fig. 6B). Depolarization was at least 30% higher after exposure to PAA+PDTX when compared to related groups and 90% higher when compare to control group. In parallel, DTX and AA+DTX induced increase of fluorescence intensity, suggesting hyperpolarization ($p < 0.0001$).

Additionally, we evaluated the effect of the treatments on DNA integrity. DNA fragmentation is other remarkable signal of cell death mechanism, mainly associated to apoptosis (ref). Significant increase of DNA fragmentation was observed after exposure to DTX ($p < 0.05$), PDTX ($p < 0.001$) and PAA+PDTX ($p < 0.0001$) when compared to control group (Fig. 6C).

Furthermore, plasma membrane remained intact after exposure to all sample (Fig. 6E). However, a tendency of PeNE to increase (~10%) damage of plasma membrane was observed when compared to control group. This result corroborates with data reported in our previous study (Parte I - Capítulo II).

All samples containing DTX (DTX, PDTX, AA+DTX and PAA+PDTX) induced significant intracellular ROS production ($p < 0.0001$) (Fig. 6F). High rates of intracellular ROS are involved in the impairment of organelles functions, including mitochondria and lysosomes (Boya et al., 2008; Repnik et al., 2014). Therefore, the effects observed on these organelles herein might be involved with those mechanisms.



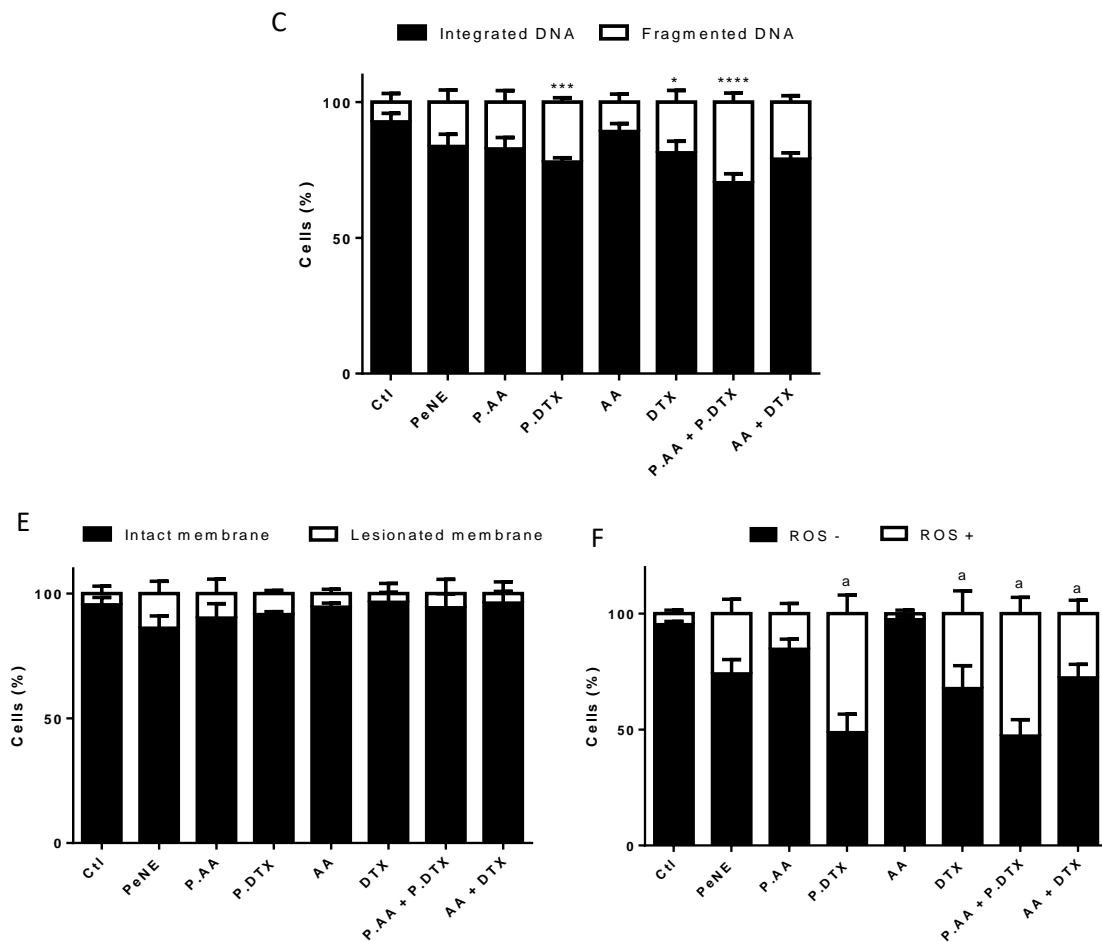


Figure 6. Evaluation of cytotoxic effect on key organelles, plasma membrane and intracellular physiology of adenocarcinoma mammary cells (4T1) by flow cytometry. The cells were exposed to pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated with anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX), free anacardic acid (AA), free docetaxel (DTX), association of PeNEAA e PeNEDTX (PAA + PDTX) and association of free AA and free DTX (AA + DTX) at 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pequi oil, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AA and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DTX for 24 hours. (A) Lysosomal membrane permeability. (B) Mitochondrial membrane potential. (C) Fragmentation of DNA. (D) Intracellular calcium level. (E) Membrane integrity by trypan blue assay. The cells were counted in hemacytometer and differentiated as intact membrane cells (cells no stained) and lesionated membrane cells (cells stained). No significant difference between groups. (F) Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) analysis with CM-H₂DCFDA. One-way and two-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0,05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

3.5 PAA + PDTX inhibited cells proliferation

All samples containing DTX (DTX, PDTX, AA+DTX and PAA+PDTX) significantly reduced total cell number (~77%), blocked cell cycle in G2/M phase (~80%), and induced a 100% inhibition on the capacity of cancer cells to form colonies ($p < 0.0001$)

(Fig. 7). Taken together, these results showed an inhibition of cell proliferation. AA also demonstrated reduction of cell capacity to form colonies but did not reduce total cell number and did not alter cell cycle.

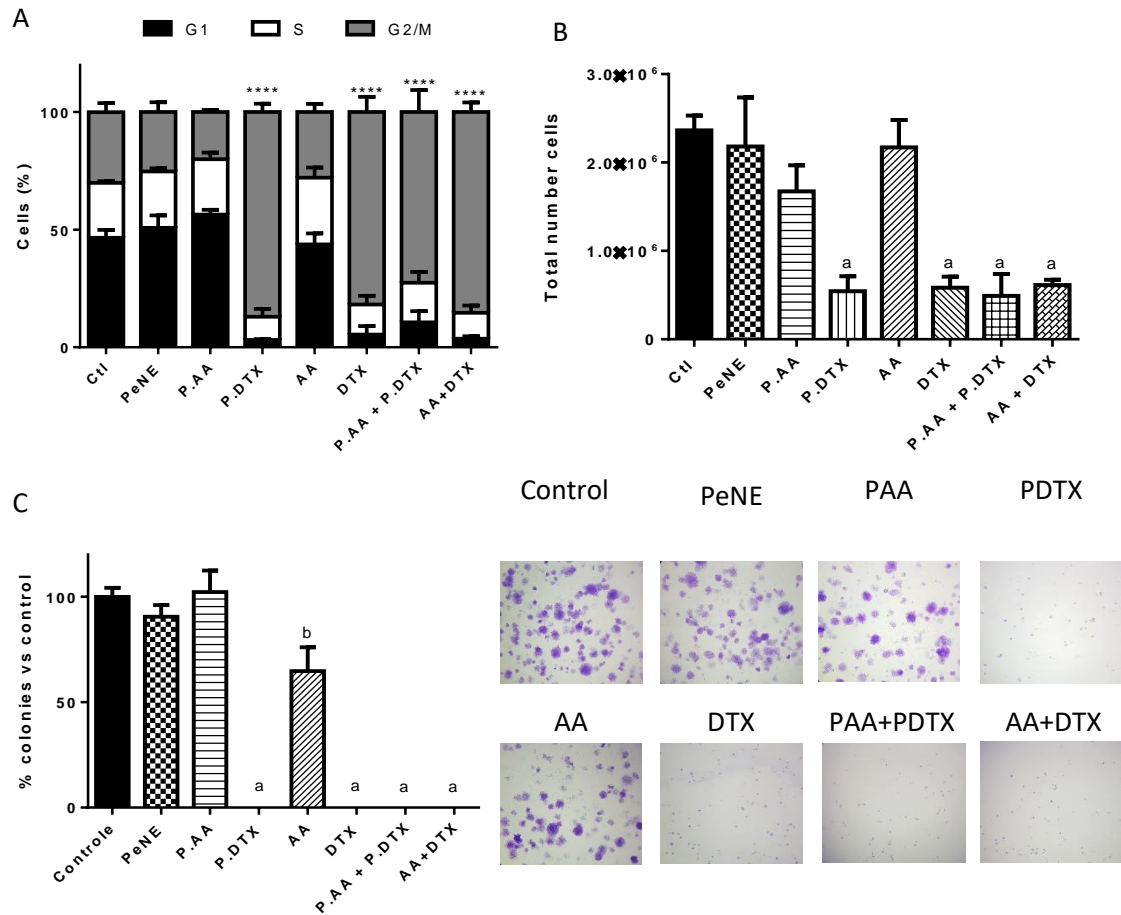


Figure 7. Effect on cell proliferation. The cells were exposed to pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated with anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX), free anacardic acid (AA), free docetaxel (DTX), association of PeNEAA e PeNEDTX (PAA + PDTX) and association of free AA and free DTX (AA + DTX) at 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pequi oil, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AA and 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DTX for 24 hours. **(A) Total cell number** by trypan blue assay. **(B) Cell cycle** using propidium iodide by flow cytometry. **(C) Clonogenic assay** for formation of colonies. **(A)** and **(C)** One-way ANOVA : significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups. **(B)** Two-way ANOVA: significant difference between groups **** $p < 0.001$ (Tukey post hoc test).

3.6 PAA + PDTX induced phosphatidylserine exposure and multicaspase activation

Herein, early apoptosis was observed in cells exposed to PDTX and PAA+PDTX (50 and 30%, respectively) ($p < 0.0001$). Low increase of late apoptosis / dead (~5%) was observed ($p < 0.05$) in cells exposed to PeNE, PAA, PDTX and PAA+PDTX, and no alteration of dead cell proportion was noted when compare to control group (Fig. 8A). Additionally, PeNE, PAA, PDTX and PAA+PDTX induced caspase activation with significant increase of caspase⁺/dead cells ($p < 0.0001$) (Fig. 8B). PAA+PDTX induced higher caspase activation when compare to other groups ($p < 0.0001$).

Exposure of phosphatidylserine and activation of caspase are signs of cell death by apoptosis. Both were observed in cells exposed to PDTX and PAA+PDTX. Additionally, no change of dead cells proportion was noted, suggesting no damage of plasma membrane and, consequently, no cell death by necrosis.

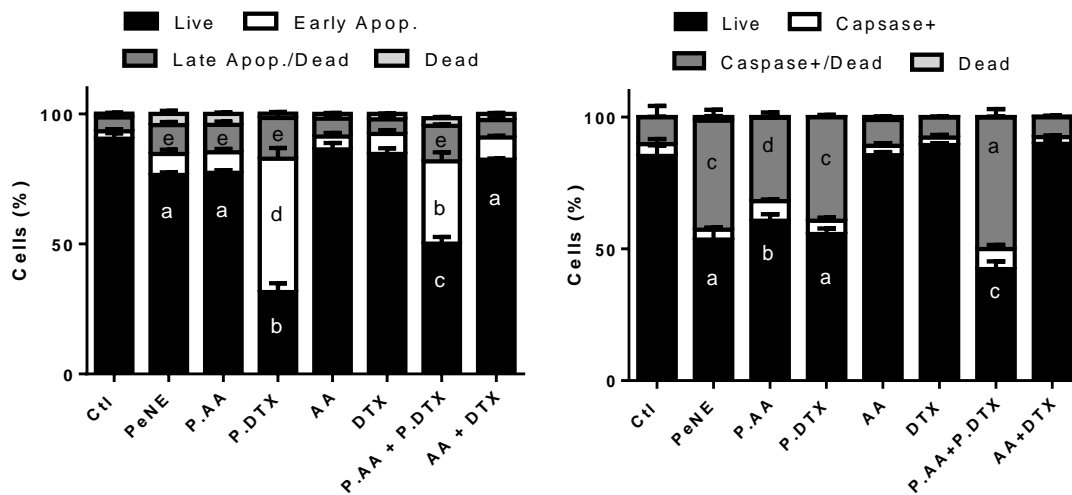


Figure 8. Mechanism of death: apoptosis vs necrosis, and caspase activation. The cells were exposed to pequi oil based-nanoemulsion (PeNE), pequi oil based-nanoemulsion associated with anacardic acid (PAA) and docetaxel (PDTX), free anacardic acid (AA), free docetaxel (DTX), association of PAA e PDTX (PAA + PDTX) and association of free AA and free DTX (AA + DTX) at 180 $\mu\text{g/mL}$ of pequi oil, 10 $\mu\text{g/mL}$ of AA and 16 $\mu\text{g/mL}$ of DTX for 24 hours. (A) **Apoptotic vs necrotic cells** population stained with annexin V-FITC and propidium iodide by flow cytometry. (B) **Multicaspase activity**. One-way ANOVA: significant difference between groups $p < 0.05$ (Tukey post hoc test). Different letters indicate statistically significant differences between groups.

Taken together, these results suggest that PAA+PDTX was the most promising treatment against 4T1 cells herein, showing a combined additive effect among the antitumor compounds (Fig.9). The use of nanoemulsion clearly improved the anticancer activity when compared to AA+DTX and its antagonism effect. PAA+PDTX acted on lysosomal membrane permeability that might induce depolarization of mitochondrial membrane, that in turn, lead to exposure of phosphatidylserine, and activation of caspases. In parallel, alterations on mitochondrial membrane potential may higher production of ROS, which might induce DNA fragmentation, cell cycle block and, consequently, reduction of cell proliferation and alteration on cell morphology.

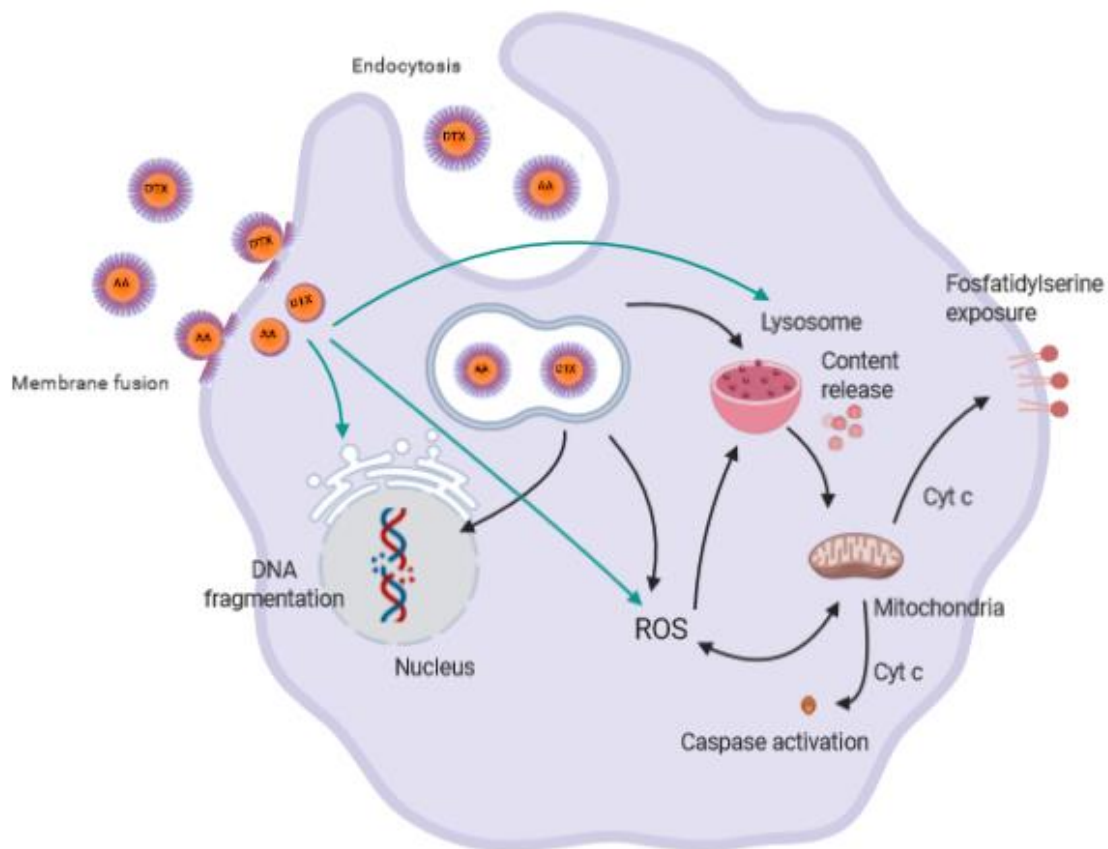


Figure 9. Suggested cell targets involved in the cytotoxicity of pequi oil based-nanoemulsion associated to docetaxel (PDTX) and anacardic acid (PAA) on breast cancer cells (4T1). Source: own authorship creating in BioRender.com.

4 Conclusion

Natural products represent rich source of bioactive molecules with anticancer activity. The use of pequi oil-based nanoemulsion (PeNE) as platform to drug delivery have shown to be successful in breast cancer cells 4T1 *in vitro*. Moreover, the association of docetaxel (DTX) and anacardic acid (AA) in PeNE demonstrated to be a promising approach, resulting in additive cytotoxic effects and suggesting that this strategy has a great potential for breast cancer treatment. This study is the first to report combinatory therapy between pequi oil, DTX and AA. Further evaluations to verify the efficacy of this treatment on *in vivo* models are underway.

References

- Ankur Gupta, H. Burak Eral, T. Alan Hatton and Patrick S. Doyle. 2016. "Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications."
- Bhattacharjee, Sourav. 2016. "DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not?" *Journal of Controlled Release* 235: 337–51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Boya, P., and G. Kroemer. 2008. "Lysosomal Membrane Permeabilization in Cell Death." *Oncogene* 27 (50): 6434–51. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.310>.
- Chou, T.C and Talalay, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1983, v. 4, p. 450-454. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(83\)90490-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(83)90490-X)
- Colombo, N. B.R., M. P. Rangel, V. Martins, M. Hage, D. P. Gelain, D. F. Barbeiro, C. K. Grisolia, E. R. Parra, and V. L. Capelozzi. 2015. "Caryocar Brasiliense Camb Protects against Genomic and Oxidative Damage in Urethane-Induced Lung Carcinogenesis." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48 (9): 852–62. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154467>.
- Fennelly, Colin, and Ravi K. Amaravadi. 2017. "Lysosomal Biology in Cancer." *Methods in Molecular Biology* 1594: 293–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6934-0_19.
- Genova, Julia, Minko Petrov, Isak Bivas, Peter Rafailov, Haritun Naradikian, and Boyko Katranchev. 2018. "Fourier-Transform Infrared and Raman Characterization of Bilayer Membranes of the Phospholipid SOPC and Its Mixtures with Cholesterol." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 557 (April): 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.04.044>.
- Harwansh, Ranjit K., Rohitas Deshmukh, and Md Akhlaquer Rahman. 2019. "Nanoemulsion: Promising Nanocarrier System for Delivery of Herbal Bioactives." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51 (January): 224–33. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.006>.
- Hemshkhar, Mahadevappa, Martin Sebastin Santhosh, Kempaiah Kemparaju, and Kesturu S. Girish. 2011. "Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110 (2): 122–32. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>.
- Jadia, Rahul, Cody Scandore, Prakash Rai, and Biotechnology Program. 2016. "Nanoparticles for Effective Combination Therapy of Cancer." *International Journal of Nanotechnology and Nanomedicine* 1 (1): 1–27. <https://doi.org/10.33140/ijnn/01/01/00003>.
- Jain, Vikas, Hitesh Kumar, Haritha V. Anod, Pallavi Chand, N. Vishal Gupta, Surajit Dey, and Siddharth S. Kesharwani. 2020. "A Review of Nanotechnology-Based Approaches for Breast Cancer and Triple-Negative Breast Cancer." *Journal of Controlled Release* 326 (July): 628–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.003>.
- Jintapattanakit, Anchalee, Hafiz Mahmood Hasan, and Varaporn Buraphacheep

- Junyaprasert. 2018. "Vegetable Oil-Based Nanoemulsions Containing Curcuminoids: Formation Optimization by Phase Inversion Temperature Method." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 44: 289–97. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.12.018>.
- Kashyap, Dharambir, Hardeep Singh Tuli, Mukerrem Betul Yerer, Ajay Sharma, Katrin Sak, Saumya Srivastava, Anjana Pandey, Vivek Kumar Garg, Gautam Sethi, and Anupam Bishayee. 2019. "Natural Product-Based Nanoformulations for Cancer Therapy: Opportunities and Challenges." *Seminars in Cancer Biology*, no. August: 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.014>.
- Kumar, Manish, Ram Singh Bishnoi, Ajay Kumar Shukla, and Chandra Prakash Jain. 2019. "Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review." *Preventive Nutrition and Food Science* 24 (3): 225–34. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>.
- Kushwah, Varun, Devesh Kumar Jain, Ashish Kumar Agrawal, and Sanyog Jain. 2018. "Improved Antitumor Efficacy and Reduced Toxicity of Docetaxel Using Anacardic Acid Functionalized Stealth Liposomes." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172 (December): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.047>.
- Kushwah, Varun, Sameer S. Katiyar, Chander Parkash Dora, Ashish Kumar Agrawal, Dimitrios A. Lamprou, Ramesh C. Gupta, and Sanyog Jain. 2018. "Co-Delivery of Docetaxel and Gemcitabine by Anacardic Acid Modified Self-Assembled Albumin Nanoparticles for Effective Breast Cancer Management." *Acta Biomaterialia* 73: 424–36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.057>.
- M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani and M.R. Mozafari. 2018. "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 44: 289–97.
- McClements, David Julian, and Seid Mahdi Jafari. 2018. *General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>.
- Miranda-Vilela, Ana L., Luiz C.S. Pereira, Carlos A. Gonçalves, and Cesar K. Grisolia. 2009. "Pequi Fruit (Caryocar Brasiliense Camb.) Pulp Oil Reduces Exercise-Induced Inflammatory Markers and Blood Pressure of Male and Female Runners." *Nutrition Research* 29 (12): 850–58. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.022>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Cesar K. Grisolia, João Paulo F. Longo, Raphael C.A. Peixoto, Marcos Célio de Almeida, Lilian Carla P. Barbosa, Mariana M. Roll, et al. 2014. "Oil Rich in Carotenoids Instead of Vitamins C and E as a Better Option to Reduce Doxorubicin-Induced Damage to Normal Cells of Ehrlich Tumor-Bearing Mice: Hematological, Toxicological and Histopathological Evaluations." *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (11): 1161–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Flávia A. Portilho, Vitor G.B. De Araujo, Luciana L.C. Estevanato, Bélin P. Mezzomo, Maria de Fátima M. De Almeida Santos, and Zulmira G.M. Lacava. 2011. "The Protective Effects of Nutritional Antioxidant

- Therapy on Ehrlich Solid Tumor-Bearing Mice Depend on the Type of Antioxidant Therapy Chosen: Histology, Genotoxicity and Hematology Evaluations.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (11): 1091–98.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.09.009>.
- Mosmann, Tim. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Oliveira, Paula a., Aura Colaço, Raquel Chaves, Henrique Guedes-Pinto, Luis F. De-La-Cruz P., and Carlos Lopes. 2007. “Chemical Carcinogenesis.” *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 79 (4): 593–616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>.
- Ombredane, Alicia S., Victor H.S. Araujo, Clarissa O. Borges, Patrícia L. Costa, Marcela G. Landim, Andréia C. Pinheiro, Ísis O. Szlachetka, et al. 2020. “Nanoemulsion-Based Systems as a Promising Approach for Enhancing the Antitumoral Activity of Pequi Oil (Caryocar Brasilense Cambess.) in Breast Cancer Cells.” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 58 (May): 101819. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819>.
- Orendorff, Christopher J., Michael W. Ducey, and Jeanne E. Pemberton. 2002. “Quantitative Correlation of Raman Spectral Indicators in Determining Conformational Order in Alkyl Chains.” *Journal of Physical Chemistry A* 106 (30): 6991–98. <https://doi.org/10.1021/jp014311n>.
- Palmeira, Simone M., Paula R.P. Silva, Juliana S.P. Ferrão, Aliny A.B.L. Ladd, Maria L.Z. Dagli, Cesar K. Grisolia, and Francisco J. Hernandez-Blazquez. 2016. “Chemopreventive Effects of Pequi Oil (Caryocar Brasiliense Camb.) on Preneoplastic Lesions in a Mouse Model of Hepatocarcinogenesis.” *European Journal of Cancer Prevention* 25 (4): 299–305.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.000000000000187>.
- Peixoto, Raphael Cândido Apolinário, Ana Luisa Miranda-Vilela, José de Souza Filho, Marcella Lemos’ Brettas Carneiro, Ricardo G.S. Oliveira, Matheus Oliveira da Silva, Aparecido R. de Souza, and Sônia Nair Bão. 2015. “Antitumor Effect of Free Rhodium (II) Citrate and Rhodium (II) Citrate-Loaded Maghemite Nanoparticles on Mice Bearing Breast Cancer: A Systemic Toxicity Assay.” *Tumor Biology* 36 (5): 3325–36. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2966-x>.
- Praveen Kumar, Gannu. 2015. “Nanoemulsion Based Targeting in Cancer Therapeutics.” *Medicinal Chemistry* 5 (6): 272–84. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000275>.
- Radde, Brandie N, Negin Alizadeh-Rad, Stephanie M Price, David J Schultz, and Carolyn M Klinge. 2016. “Anacardic Acid, Salicylic Acid, and Oleic Acid Differentially Alter Cellular Bioenergetic Function in Breast Cancer Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 117 (11): 2521–32.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25544>.
- Rocha, Marcia, Natalia Chaves, and Sonia Bao. 2017. “Nanobiotechnology for Breast Cancer Treatment.” *Breast Cancer - From Biology to Medicine*.
<https://doi.org/10.5772/66989>.

- Sánchez-López, Elena, Mariana Guerra, João Dias-Ferreira, Ana Lopez-Machado, Miren Ettcheto, Amanda Cano, Marta Espina, Antoni Camins, Maria Luisa Garcia, and Eliana B. Souto. 2019. "Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics." *Nanomaterials* 9 (6). <https://doi.org/10.3390/nano9060821>.
- Santos Câmara, Ana Lygia Dos, Gregor Nagel, Harald R. Tschiche, Camila Magalhães Cardador, Luis Alexandre Muehlmann, Daniela Mara De Oliveira, Paula Queiroz Alvim, Ricardo Bentes Azevedo, Marcelo Calderón, and João Paulo Figueiró Longo. 2017. "Acid-Sensitive Lipidated Doxorubicin Prodrug Entrapped in Nanoemulsion Impairs Lung Tumor Metastasis in a Breast Cancer Model." *Nanomedicine* 12 (15): 1751–65. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0091>.
- Singh, Santosh Kumar, Shriti Singh, James Wlillard, and Rajesh Singh. 2017. "Drug Delivery Approaches for Breast Cancer." *International Journal of Nanomedicine* 12: 6205–18. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140325>.
- Wang, Lijuan, Xuefeng Li, Gaoyong Zhang, Jinfeng Dong, and Julian Eastoe. 2007. "Oil-in-Water Nanoemulsions for Pesticide Formulations." *Journal of Colloid and Interface Science* 314 (1): 230–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.079>.
- Wong, Patrick T. T. 1984. "Raman Spectroscopy of Thermotropic and High-Pressure Phases of Aqueous Phospholipid Dispersions." *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 13: 1–24. <https://doi.org/0731-5171/86/0605-0147S10.00/0>.
- Zhang, Jianbin, Jigang Wang, Yin Kwan Wong, Xin Sun, Yun Chen, Liming Wang, Liu Yang, Liqin Lu, Hanming Shen, and Dongsheng Huang. 2018. "Docetaxel Enhances Lysosomal Function through TFEB Activation." *Cell Death and Disease* 9 (6). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0571-4>.
- Zhao, Qing, Xiaofeng Zhang, Haifeng Cai, Pei Zhang, Dong Kong, Xiaosong Ge, Min Du, Rong Liang, and Wenxia Dong. 2018. "Anticancer Effects of Plant Derived Anacardic Acid on Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells." *American Journal of Translational Research* 10 (8): 2424–34.
- Zhitomirsky, Benny, and Yehuda G. Assaraf. 2016. "Lysosomes as Mediators of Drug Resistance in Cancer." *Drug Resistance Updates* 24: 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.11.004>.

CAPÍTULO IV

Avaliação do efeito anticâncer de nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo docetaxel e ácido anacárdico em modelo de câncer de mama *in vivo* (Camundongos fêmeas Balb/c)

Os capítulos anteriores demonstraram que nanoemulsão à base de óleo de pequi representa potencial anticâncer em células de câncer de mama metastático, *in vitro*. Além disso, a associação com quimioterápico docetaxel e biomolécula ácido anacárdico apresentou melhoria no efeito antitumoral com efeito combinatório.

Neste capítulo, iremos discutir o efeito da associação de PeNE com DTX e AA em modelo de câncer de mama, *in vivo*.

1- Metodologia

2.1 Manutenção dos animais

Setenta e dois (72) camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) foram usados para os experimentos (Biotério da Universidade Federal de Goiás). Ao chegarem ao laboratório os animais permaneceram inicialmente em observação por um período de 15 dias (“quarentena”) antes o início dos experimentos. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno contendo maravalha, com temperatura controlada (~24 °C), ciclo circadiano automatizado (12/12 horas claro/escuro) e filtragem de ar no biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília. A água e alimentação foram disponíveis *ad libidum* em todo o tempo de experimentação. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, no processo nº 88/2018 (anexo I). Para garantir melhor organização de tempo e respeitar escala de trabalho no laboratório (em período de pandemia da Covid19), os animais foram divididos em 2 lotes de 12 grupos contendo 3 animais, totalizando 36 animais por lote. Todos os procedimentos foram realizados igualmente nos dois lotes com 2 dias de intervalo.

2.2 Indução Tumoral

A linhagem 4T1 (Células de Adenocarcinoma Murino, Linhagem ATCC-CRL-2539) foi utilizada para realizar indução tumoral nos camundongos fêmeas Balb/c. Para implantação ortotópica, os animais foram submetidos à anestesia profunda com ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal. Após a anestesia dos animais, um

transplante de células contendo 1×10^5 células 4T1 diluídas em 50 μL de meio DMEM (sem soro) foram injetados na 5ª mama direita dos animais com auxílio de seringa de insulina ultrafina (0,3 mL, agulha de 6 mm, calibre 0,25 mm, BD). Os animais foram acompanhados todos os dias até a detecção clínica do tumor. Neste período os animais foram mantidos nas condições padrão do biotério com livre acesso à ração e à água. O comportamento clínico também foi avaliado diariamente.

2.3 Tratamento

Quatro sessões de tratamento foram realizadas nos diferentes grupos experimentais (Tabela 1). Os animais foram anestesiados com dose de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal. Em seguida, as amostras foram administradas por via intratumoral, 4 doses a cada 3 dias totalizando 10 dias de tratamento. A concentração de docetaxel (DTX) e ácido anacárdico (AA) administrada foi de 4 mg/kg/dose. As demais amostras foram administradas de acordo com o volume correspondente à concentração de DTX e AA.

Tabela 1. Descrição do tratamento dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Tratamentos
1- Controle sem tumor	Sem tratamento
2- Controle com tumor	PBS (tampão fosfato 1x)
3- PeNE 1,3	Nanoemulsão à base de óleo de pequi (concentração de óleo = 1,3 mg/mL)
4- PeNE 2,6	Nanoemulsão à base de óleo de pequi (concentração de óleo = 2,6 mg/mL)
5- PAA	Nanoemulsão à base de óleo de pequi com ácido anacárdico
6- PDTX	Nanoemulsão à base de óleo de pequi com docetaxel
7- AA	Ácido anacárdico livre
8- DTX	Docetaxel livre
9- AA+DTX	Ácido anacárdico + Docetaxel livres
10- PAA+PDTX	Nanoemulsões à base de óleo de pequi com AA e DTX
11- Branco	Lecitina em PBS 1x
12- Veículo de AA e DTX	Tween 80 e etanol na proporção 1:1 + 5% glicose (1:8 (v/v))

2.4 Avaliação do volume tumoral

As dimensões dos tumores foram mensuradas, a cada 3 dias a partir do primeiro dia de tratamento, em todos os grupos experimentais, até o dia da eutanásia, com auxílio

de paquímetro digital milimetrado (200MM Pd 200 Vonder®). O volume tumoral (VT) foi calculado por meio da fórmula abaixo, conforme descrito na literatura (Ramos, K. L. V., 2014).

$$VT = (\text{Comprimento}) \times (\text{Largura})^2 \times 0,5$$

O peso dos animais foi determinado, a cada 3 dias, por meio de balança digital e o peso dos tumores (no dia da eutanásia) em balança analítica modelo OHAUS®220.

2.5 Análise por tomografia computadorizada

A medida do espaço alveolar é uma forma de avaliação que indica que possíveis alterações podem estar ocorrendo neste tecido. Isso foi medido por meio de tomografia computadorizada (TC). Os camundongos foram mantidos sob anestesia com isoflurano (2,5%) e colocados no leito de microtomografia de TC (Bruker, Billerica, EUA) para captura de imagens. Os parâmetros usados foram resolução do sinal de TC, baixa dose (200µA), qualidade de TC de baixa tensão (35µA) (padrão) e volume alveolar. As imagens obtidas foram analisadas usando o software PMOD 3.307 (PMOD Technologies LLC, software Albira Suíte). O perfil do volume alveolar foi avaliada delimitando a região pulmonar em todos os planos de imagem usando a face interna da caixa torácica como referência. Selecionamos a faixa da unidade Hounsfield (HU), que foi -1000/0 de área saudável. Os dados gerados foram apresentados em volume alveolar / mm³.

2.6 Avaliação de marcadores bioquímicos

Para avaliar função hepática e renal após os diferentes tratamentos, 800 µL de sangue foram coletados em tubos com gel separador por punção cardíaca em todos os animais. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 2000 rpm para separação do soro. Em seguida, o soro foi analisado por um analisador bioquímico automático Chemwell-t (Labtest, Brasil), conforme orientações do fabricante. As enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e as enzimas renais, creatinina K e ureia, foram medidas.

2.7 Hemograma

A avaliação sanguínea permite investigar possíveis alterações geradas pelos diferentes tratamentos. Assim, 100 µL de sangue de cada animal foram coletados por

punção cardíaca e colocados em tubos contendo agente anticoagulante EDTA 10%. O sangue foi analisado por um analisador automático de hematologia Sysmex pocH-100i™ (Curitiba / Paraná, Brasil) calibrado para camundongos para obter informação sobre eritrograma e leucograma.

2.8 Análise Histopatológica

O tecido tumoral e os órgãos (pulmão, fígado, baço, rins, linfonodo adjacente) de todos os animais foram lavadas com PBS 1x para retirar excesso de sangue e fixados com solução de formol a 10 % e tampão fosfato (pH 7,0) por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os órgãos foram desidratados em soluções alcoólicas, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 0,5 µm foram realizados no micrótomo Rotativo de Parafina (O Patologista, MR 2014) e as lâminas foram coradas por hematoxilina/eosina (HE). As amostras foram processadas pela professora doutora Eliza Carla Barroso Duarte da Faculdade de Medicina da UnB e sua equipe. As imagens foram obtidas por microscópio Invitrogen EVOS FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) no laboratório de Nanobiotecnologia da UnB.

2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (Version 6.01, Hammer & Harper, Noruega). A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças entre os grupos analisados foram investigadas através de ANOVA para dados que seguiram a distribuição normal. Para os resultados significativos de ANOVA, comparações dois a dois foram avaliadas por Student's t-test com significância $p < 0,05$.

2- Resultados

3.1 Monitoramento clínico dos animais

O peso dos animais foi monitorado ao longo do tempo iniciando 3 dias antes da indução tumoral e terminando no dia da eutanásia. Pode-se observar que os animais de todos os grupos ganharam peso passando de uma média de $22,1 \pm 1,6$ a $25,6 \pm 2,0$ g (Figura 1 A-B).

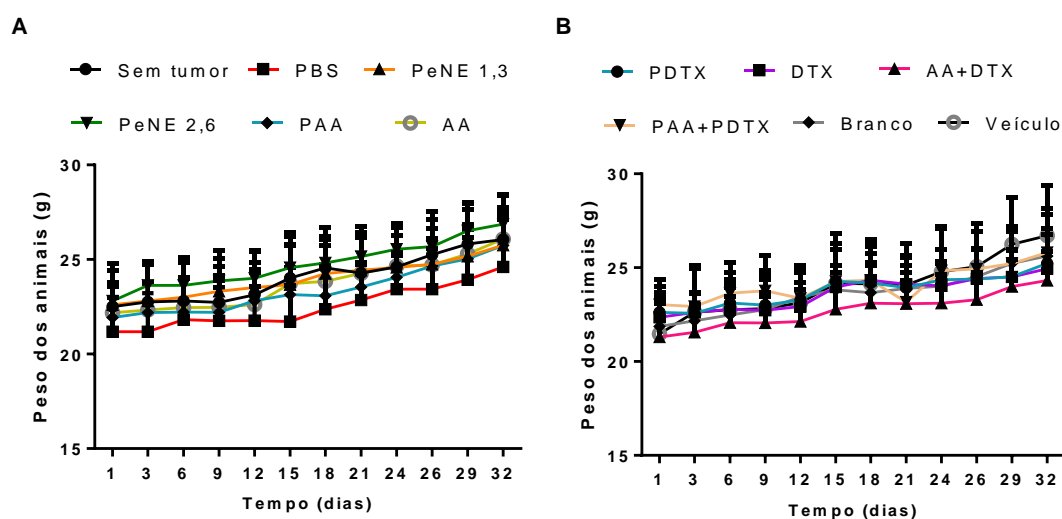


Figura 1. Avaliação do peso corporal dos camundongos (A-B). O peso corporal começou a ser monitorado 3 dias antes da indução tumoral até o dia da eutanásia.

Em paralelo, o consumo de ração de cada grupo também foi monitorado até o dia da eutanásia. Todos os grupos mantiveram um consumo constante de ração de $25,6 \pm 2,0$ g (Figura 2 A-B).

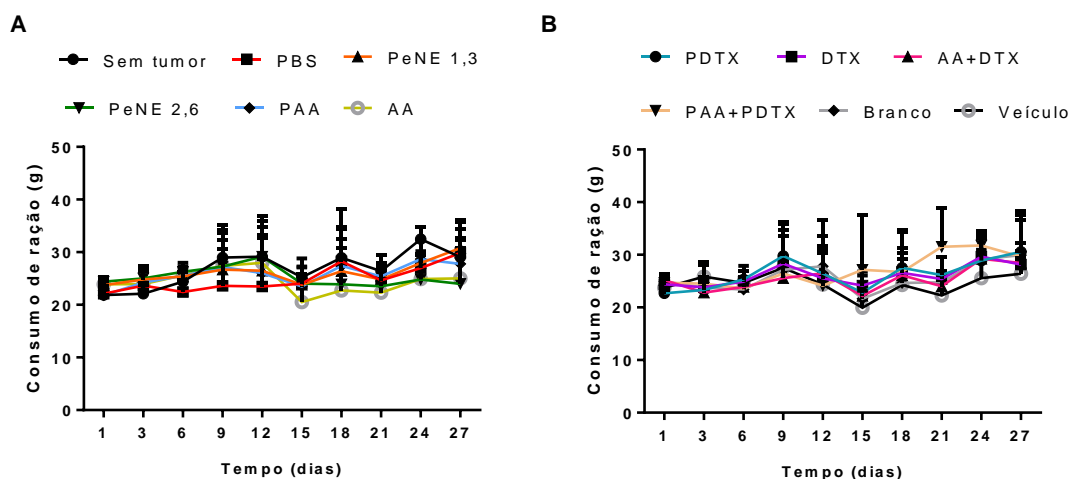


Figura 2. Avaliação do consumo de ração (A-B) ao longo do tempo. O consumo de ração foi monitorado a partir do 3º dia após indução tumoral.

Após as 4 sessões de tratamento, foi observado em alguns animais de três grupos experimentais (“PeNE 1,3”, “AA” e “PAA+PDTX”) perda de pelos e bigodes na região do focinho (Figura 3). Para os grupos “PeNE 1,3” e “PAA+PDTX”, alguns animais perderam apenas o bigode. Entretanto, 2 animais que receberam o tratamento à base de AA perderam todos os pelos do focinho. Em paralelo, os animais tratados com o PAA não apresentaram esse efeito tóxico do tratamento.

Ao longo do experimento, nenhum animal apresentou problema de comportamento como agressividade, medo, sinal de dor ou fraqueza. Pelo contrário, todos os animais mantiveram boa energia e socialização, e curiosidade.



Figura 3. Observação de alopecia em camundongos após as sessões de tratamentos. Imagens representativa do grupo.

3.2 Efeito dos tratamentos no volume tumoral

Neste trabalho, a indução tumoral foi sucedida na maioria dos animais submetidos ao procedimento. No total de 72 animais, apenas 3 não desenvolveram tumor dentro do tempo de 15 dias, durante os quais foi possível detectar clinicamente presença do tumor primário nos outros 69 animais. Esses 3 animais foram retirados das análises.

Fotografias representativas da região tumoral dos animais em cada grupo experimental estão apresentadas na figura 4. Pode-se notar o crescimento visível clinicamente a partir do dia 13 após indução tumoral (correspondente ao primeiro dia de tratamento) até o dia da eutanásia (41 dias após indução tumoral) de alguns grupos: “PBS”, “PeNE1,3”, “PeNE2,6”, “PAA”, “AA”, “Branco” e “veículo”. Os animais dos grupos “PDTX”, “DTX”, “AA+DTX” e “PAA+PDTX” não apresentaram crescimento tumoral tão grande.

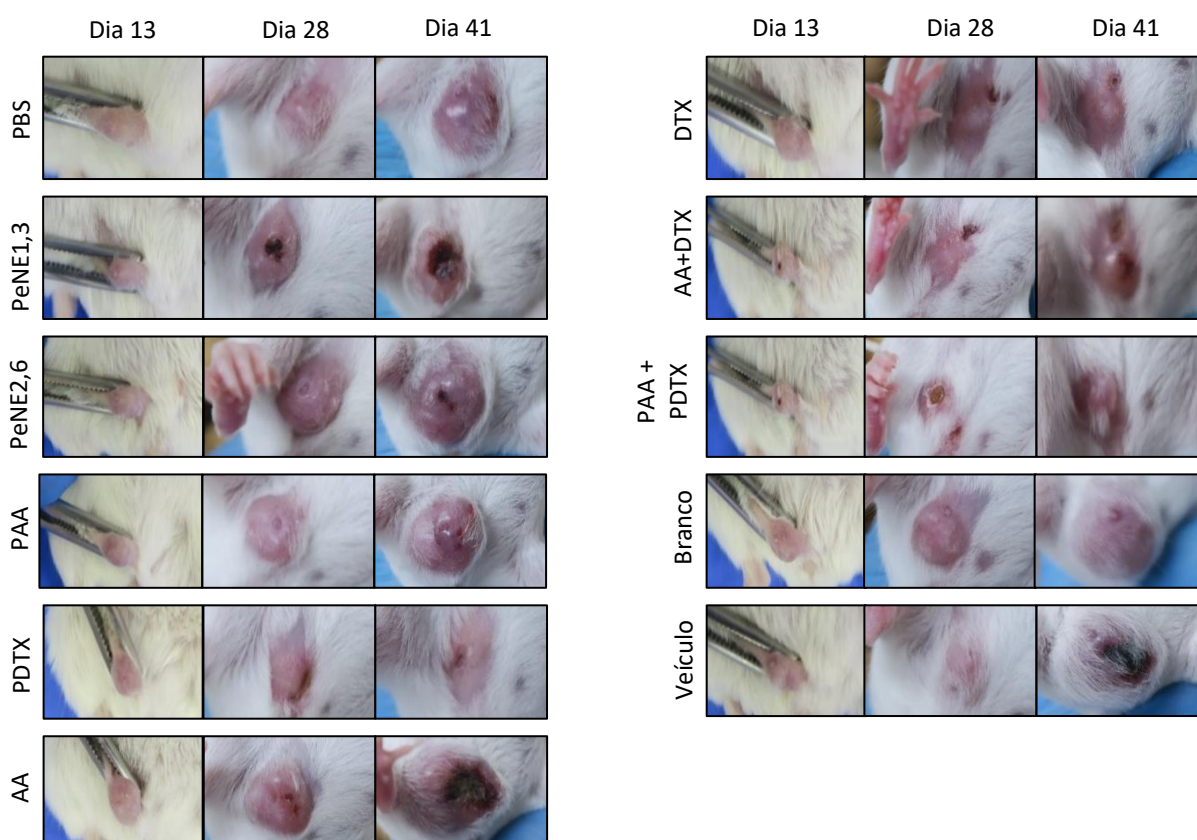


Figura 4. Imagens representativas da evolução do volume tumoral ao longo do tempo (dias 13, 28 e 41 após indução tumoral) em camundongos fêmeas Balb/c expostos a diferentes tratamentos.

O volume tumoral *in vivo* foi medido a cada 3 dias a partir do primeiro dia do tratamento até o dia da eutanásia. A figura 5 mostra a evolução do volume tumoral ao

longo do tempo em cada grupo experimental. Pode-se observar que os animais tratados com “PeNE2,6”, “AA”, “PAA”, “branco” e “veículo” apresentaram volume tumoral superior ao grupo controle positivo (tratado com PBS). O encapsulamento do AA em nanoemulsão não apresentou melhor efeito antitumoral na concentração testada (4mg/kg/dose). Destaque-se que alguns tratamentos diminuíram drasticamente o desenvolvimento tumoral tais como “DTX”, “PDTX”, “AA+DTX” e “PAA+PDTX” ($p < 0,001$), quando comparado com o controle PBS. Não houve diferença estatística entre esses 4 grupos.

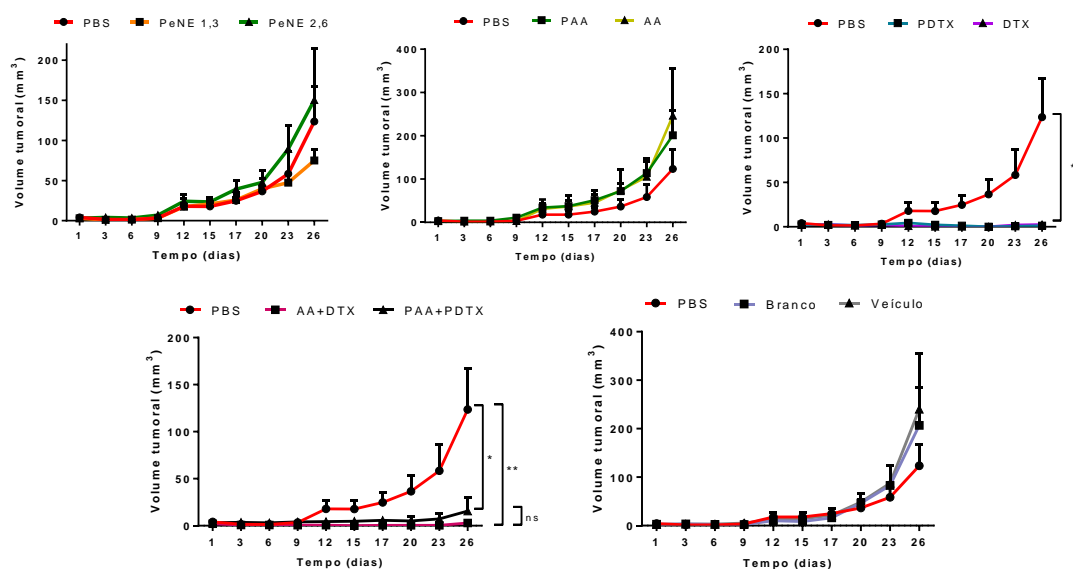


Figura 5. Análise do volume tumoral dos camundongos fêmeas Balb/c ao longo do tempo. O volume tumoral foi monitorado com paquímetro digital a cada 3 dias a partir do primeiro dia de sessão de tratamento até o dia da eutanásia, completando 26 dias no total. As sessões de tratamento ocorreram nos dias 1, 3, 6 e 9.

No dia da eutanásia, o tumor foi retirado do animal. Fotografias representativas do tumor de cada grupo experimental estão apresentadas na figura 6A. O volume tumoral foi medido *ex vivo* com paquímetro digital e corrobora com os dados obtidos *in vivo* (Figura 6B). Além disso, o tumor foi pesado (Figura 7A) e elevada correlação foi estabelecida entre volume tumoral e peso tumoral com coeficiente de correlação de Pearson $r=0,9764$ (Figura 6C).

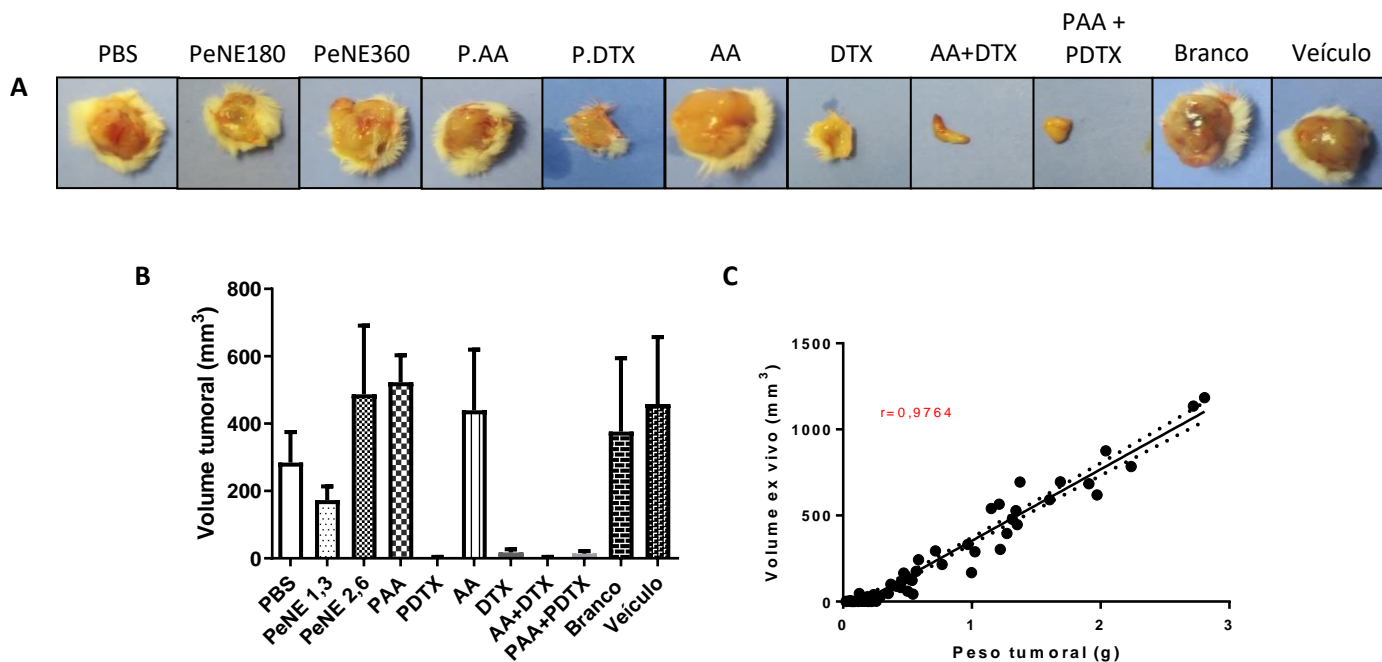


Figura 6. Análise do volume tumoral dos camundongos fêmeas Balb/c *ex vivo*, após eutanásia. (A) Fotografias dos tumores após retirada dos camundongos. Imagens representativa de cada grupo. (B) Representação gráfica do volume tumoral (média \pm desvio padrão). (C) Correlação entre peso tumoral e volume tumoral *ex vivo* com teste de correlação de Pearson.

Além do tumor, outros órgãos foram retirados dos animais e pesados no dia da eutanásia. O baço é o órgão que apresentou mais variação de peso entre os grupos experimentais (Figura 7B) e elevada correlação foi observada entre o peso do baço e o peso do tumor com coeficiente de correlação de Pearson $r=0,8415$ (Figura 7C.). Quando mais pesado o tumor, mais pesado é o baço. Os outros órgãos (linfonodo, fígado, rim) não apresentaram diferença de peso quando comparado com o grupo sem tumor. Dois animais do grupo “veículo” e um animal do grupo “branco” apresentaram peso pulmonar maior quando comparado com grupo sem tumor (Figura 8).

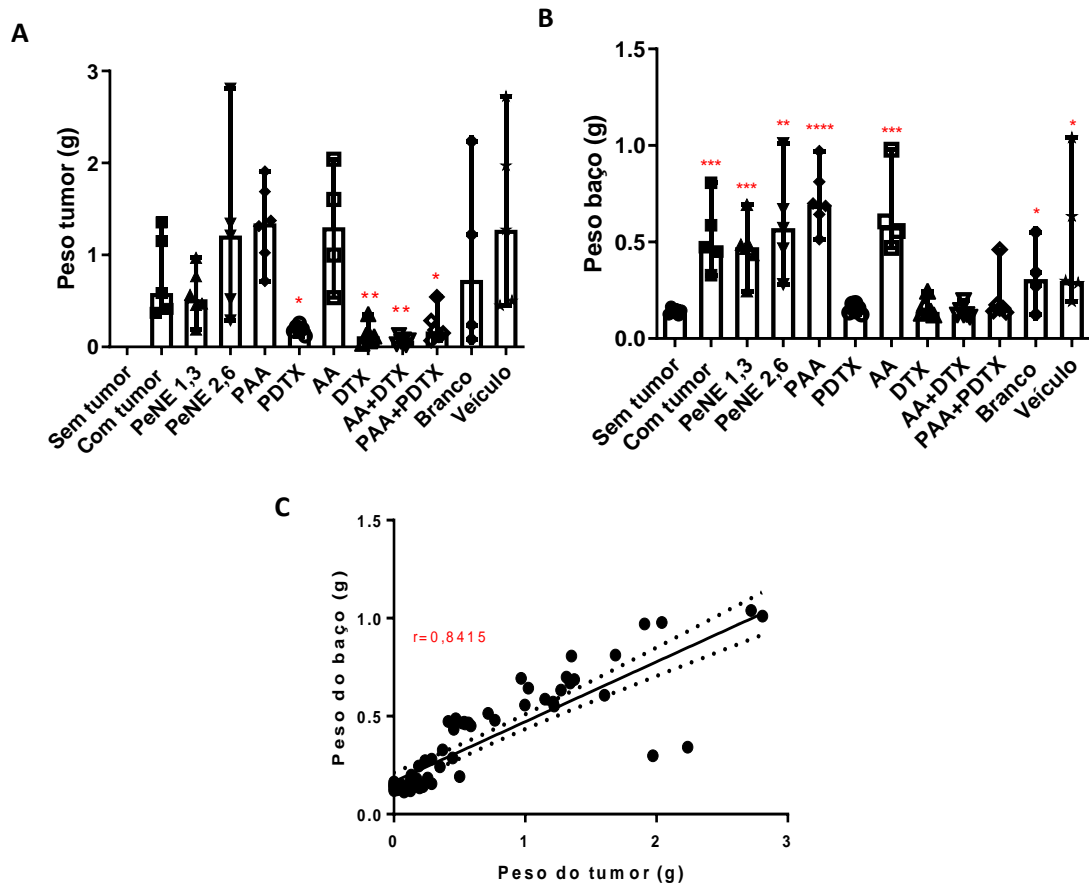


Figura 7. Avaliação do peso do baço (A) e sua correlação com peso do tumor pelo teste de correlação de Pearson (B). Teste t (vs grupo sem tumor): * $p<0,05$; ** $p<0,01$; * $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.**

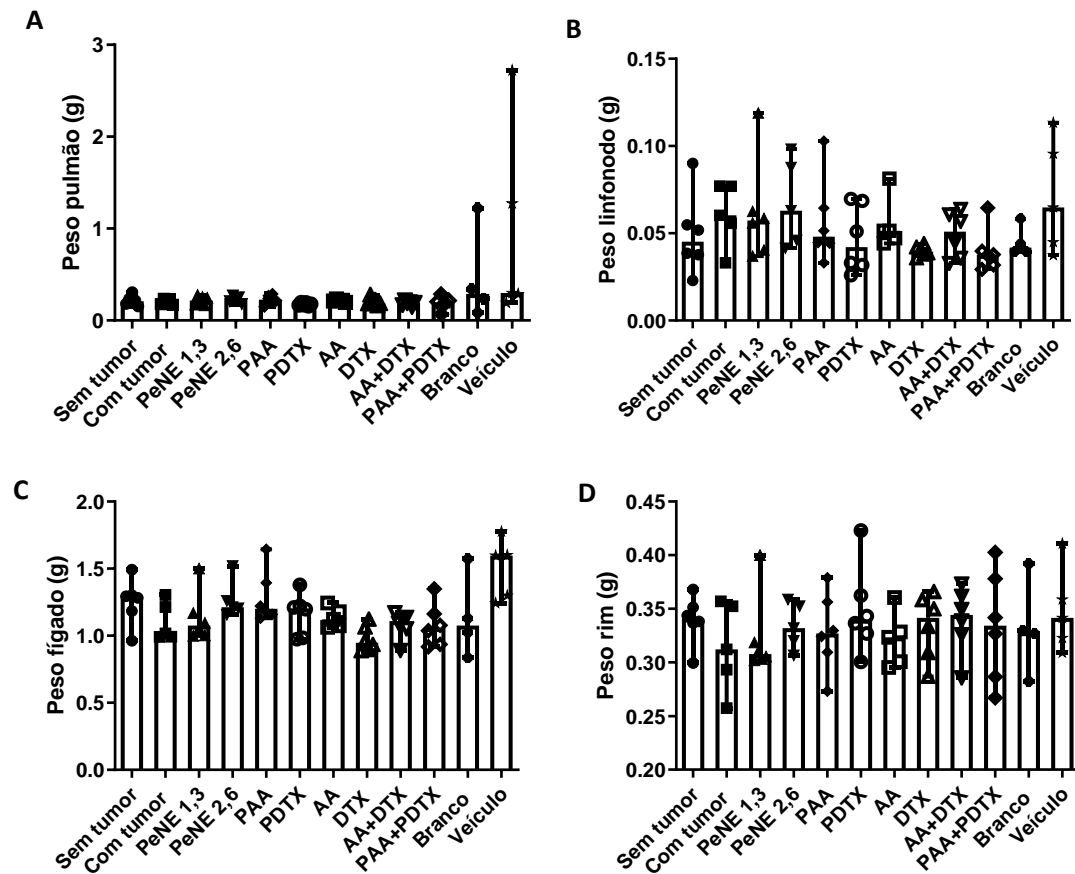


Figura 8. Avaliação do peso do tumor e dos órgãos (pulmão, linfonodo, fígado e rins) *ex vivo*. Representação gráfica da mediana.

3.3 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas a partir do soro dos animais para detectar possíveis variações nas funções hepáticas (ALT e AST) e renais (Creatinina K e Ureia). (Tabela 2 e figura 9A-B). De acordo com os dados, apenas os animais tratados com “AA+DTX” apresentaram significativo aumento no nível de ALT quando comparado com o controle sem tumor ($p < 0,05$). Entretanto, pode-se observar tendência no aumento de ALT nos demais grupos. Essa tendência foi menor nos grupos “DTX” e “AA”.

Os níveis de AST não apresentaram variações significativas entre os grupos devido ao desvio padrão elevado. Mesmo assim, pode-se observar tendência no aumento de AST nos grupos “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6”, “AA”, “DTX”, “AA+DTX” e “PAA+PDTX”, e tendência na redução de AST nos grupos “PBS”, “Branco” e “Veículo”.

Em paralelo, os tratamentos não levaram a alterações significativas nos níveis de creatinina K e ureia. Porém, nós observamos tendência na diminuição de creatinina K em todos os grupos experimentais, e aumento da ureia na exceção de “PeNE 2,6” e “AA+DTX”, quando comparado com grupo controle sem tumor (Tabela 2).

Tabela 2. Análises bioquímicas em camundongos fêmeas Balb/c após aplicação de diferentes tratamentos.

	<i>ALT</i> (U/L)	<i>AST</i> (U/L)	<i>Creatinina K</i> (mg/dL)	<i>Ureia</i> (mg/dL)
<i>Sem tumor</i>	36,8 ± 9,7	185,4 ± 64,0	0,78 ± 0,54	38,3 ± 7,4
<i>PBS</i>	72 ± 78,2	155,3 ± 80,6	0,52 ± 0,18	50 ± 13,9
<i>PeNE 1,3</i>	76,2 ± 55,2	241,7 ± 60,4	0,52 ± 0,10	53,5 ± 9,9
<i>PeNE 2,6</i>	51,2 ± 18,9	243 ± 104,7	0,44 ± 0,02	39,8 ± 4,9
<i>P.AA</i>	57,6 ± 36,8	167,5 ± 109,1	0,46 ± 0,07	50,4 ± 9,3
<i>P.DTX</i>	61 ± 53,4	188,2 ± 68,8	0,49 ± 0,08	51,3 ± 11,0
<i>AA</i>	52 ± 18,0	266,4 ± 69,8	0,45 ± 0,04	46,4 ± 6,2
<i>DTX</i>	43 ± 15,3	275,2 ± 31,9	0,44 ± 0,09	46,4 ± 8,3
<i>AA+DTX</i>	141,6 ± 90,9*	229,2 ± 100,8	0,48 ± 0,07	41,1 ± 7,3
<i>PAA + PDX</i>	61,5 ± 29,0	244,8 ± 64,4	0,47 ± 0,04	52 ± 3,6
<i>Branco</i>	59 ± 30,0	113 ± 111,2	0,42 ± 0,06	50,2 ± 3,9
<i>Veículo</i>	58,2 ± 35,6	135 ± 63,1	0,50 ± 0,09	52,6 ± 13,8

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; PBS: tampão fosfato; PeNE 1,3 e PeNE 2,6: nanoemulsão à base de óleo de pequi na concentração de óleo de 1,3 e 2,6 µg/mL, respectivamente; PAA: nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo ácido anacárdico; PDTX: nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo docetaxel; AA: ácido anacárdico; DTX: docetaxel. Média ± desvio padrão. Teste T (vs controle sem tumor): * p<0,05.

3.4 Análises hematológicas

As análises de sangue demonstraram que os tratamentos não alteraram parâmetros do eritrograma como número total de eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular médio (MCH) e concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) (Tabela 3).

Tabela 3. Eritrograma em camundongos fêmeas Balb/c após aplicação de diferentes tratamentos.

	<i>RBC</i> ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	<i>HGB</i> (g/dL)	<i>HCT</i> (%)	<i>MCV</i> (fL)	<i>MCH</i> (pg)	<i>MCHC</i> (g/dL)
<i>Sem tumor</i>	8,5 ± 1,8	12,8 ± 2,5	31,4 ± 6,6	36,9 ± 0,3	15,1 ± 0,3	40,8 ± 0,8
<i>PBS</i>	8,7 ± 0,8	13,0 ± 1,0	32,3 ± 2,8	37,0 ± 0,4	14,9 ± 0,3	40,2 ± 0,7
<i>PeNE 1,3</i>	8,2 ± 1,5	12,2 ± 2,1	30,6 ± 5,5	37,3 ± 0,5	14,8 ± 0,3	39,9 ± 0,5
<i>PeNE 2,6</i>	8,0 ± 2,5	11,9 ± 3,6	29,9 ± 9,3	37,1 ± 0,3	14,8 ± 0,2	39,9 ± 0,6
<i>P.AA</i>	8,4 ± 1,0	12,6 ± 1,5	31,7 ± 3,3	37,5 ± 0,9	14,9 ± 0,2	39,7 ± 1,1
<i>P.DTX</i>	9,0 ± 0,4	13,4 ± 0,4	33,9 ± 1,4	37 ± 0,4	14,8 ± 0,2	40,0 ± 0,5
<i>AA</i>	8,0 ± 2,1	11,9 ± 3,1	33,8 ± 2,8	37,4 ± 0,4	14,9 ± 0,2	39,9 ± 0,8
<i>DTX</i>	9,2 ± 0,7	13,6 ± 1,0	34,3 ± 2,5	37,1 ± 0,3	14,7 ± 0,2	39,6 ± 0,4
<i>AA+DTX</i>	8,9 ± 0,7	13,3 ± 0,8	33,8 ± 3,0	37,5 ± 0,4	14,8 ± 0,3	39,5 ± 1,2
<i>PAA + PDX</i>	8,9 ± 1,1	12,9 ± 1,4	32,8 ± 3,9	36,8 ± 0,5	14,5 ± 0,3	39,4 ± 0,6
<i>Branco</i>	8,8 ± 1,0	12,9 ± 1,4	32,9 ± 3,4	37,1 ± 0,5	14,5 ± 0,2	39,2 ± 0,6
<i>Veículo</i>	8,5 ± 0,7	12,8 ± 1,0	31,9 ± 2,9	37,2 ± 0,3	14,9 ± 0,2	40,2 ± 0,5

RBC: glóbulos vermelhos; HGB: hemoglobina; HCT: Hematócrito; MCV: Volume Corpuscular Médio; MCH: Hemoglobina Corpuscular Média; MCHC: Concentração Média de Hemoglobina Corpuscular; PBS: tampão fosfato; PeNE 180 e PeNE360: nanoemulsão à base de óleo de pequi na concentração de óleo de 180 e 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; PAA: nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo ácido anacárdico; PDTX: nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo docetaxel; AA: ácido anacárdico; DTX: docetaxel.

O leucograma demonstrou aumento significativo do número total de leucócitos (WBC) após tratamento com “PBS”, “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6”, “PAA”, “AA”, “Branco” e “Veículo” ($p < 0,05$) (Tabela 4 e figura 9). Esse aumento possui moderada correlação com o aumento do peso tumoral com índice de Pearson $r = 0,7779$ (Figura 9). Houve aumento significativo do número de linfócitos (SCC) nos grupos “PeNE 2,6”, “PAA”, “AA” e “Veículo” ($p < 0,001$), de monócitos, basófilos e eosinófilos (MCC) nos grupos “PBS”, “AA” ($p < 0,05$), “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6”, “PAA”, e “Veículo” ($p < 0,01$), e de neutrófilos (LCC) nos grupos “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6”, “PAA”, e “Veículo” ($p < 0,05$).

Além da leucocitose, observamos diferencia na proporção das células no sangue dos animais quando comparado com o grupo “sem tumor”. De fato, a porcentagem de linfócitos (W-SCR) diminuiu significativamente nos grupos “PBS”, “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6”, “PAA”, “AA”, “branco” e “Veículo” ($p < 0,01$). Em paralelo, houve aumento significativa na proporção de células médias (monócitos, basófilos, eosinófilos – W-

MCR) nesses mesmos grupos ($p < 0,01$). Adicionalmente, animais tratados com “PAA” e “Veículo” apresentaram aumento na proporção de neutrófilos ($p < 0,05$).

Tabela 4. Leucograma em camundongos fêmeas Balb/c após aplicação de diferentes tratamentos.

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	W-SCR (%)	W-MCR (%)	W-LCR (%)	SCC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	MCC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	LCC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
<i>Sem tumor</i>	5,35 \pm 2,8	75,4 \pm 6,8	22,0 \pm 5,2	2,5 \pm 2,2	4,0 \pm 2,1	1,1 \pm 0,6	0,1 \pm 0,1
<i>PBS</i>	29,3 \pm 22,8	26,7 \pm 11,3 ^a	69,5 \pm 9,7 ^b	3,7 \pm 1,8	6,1 \pm 1,6	21,8 \pm 20,0*	1,4 \pm 1,8
<i>PeNE 1,3</i>	24,8 \pm 15,5*	29,2 \pm 8,8 ^a	66,9 \pm 9,2 ^b	3,8 \pm 1,2	6,4 \pm 2,9	17,5 \pm 11,9**	0,9 \pm 0,7*
<i>PeNE 2,6</i>	38,6 \pm 24,1*	26,6 \pm 9,8 ^a	69,4 \pm 8,4 ^b	3,9 \pm 1,6	8,6 \pm 2,9*	28,2 \pm 19,8**	1,7 \pm 0,7*
<i>P.AA</i>	80,9 \pm 44,7**	18,6 \pm 6,5 ^a	74,1 \pm 4,0 ^b	7,2 \pm 3,0 ^c	12,7 \pm 2,1 ^d	61,2 \pm 35,9**	6,9 \pm 6,9*
<i>P.DTX</i>	5,1 \pm 3,2	69,7 \pm 7,0	26,5 \pm 5,9	3,7 \pm 1,9	3,5 \pm 2,3	1,3 \pm 0,7	0,2 \pm 0,2
<i>AA</i>	55,6 \pm 30,0**	35,1 \pm 25,8 ^a	59,9 \pm 23,6 ^b	4,9 \pm 3,1	10,6 \pm 5,9 ^d	31,8 \pm 25,8*	3,0 \pm 3,1
<i>DTX</i>	5,7 \pm 2,4	66,3 \pm 9,7	30,0 \pm 9,6	3,5 \pm 2,6	3,6 \pm 0,9	1,8 \pm 1,4	0,2 \pm 0,1
<i>AA+DTX</i>	7,7 \pm 7,2	73,2 \pm 10,7	24,1 \pm 9,1	2,6 \pm 2,3	5,7 \pm 5,9	1,8 \pm 1,7	0,1 \pm 0,1
<i>PAA + PDX Branco</i>	7,1 \pm 3,6	67,3 \pm 10,8	31,1 \pm 10,3	1,5 \pm 1,0	4,6 \pm 2,0	2,3 \pm 1,8	0,1 \pm 0,1
<i>Veículo</i>	75,8 \pm 52,9**	21,2 \pm 7,5 ^a	73,1 \pm 4,4 ^b	7,6 \pm 3,2 ^c	12,6 \pm 7,3 ^d	56,18 \pm 39,5**	7,0 \pm 6,7*

WBC: glóbulos brancos totais; W-SCR: Taxa de células pequenas (linfócitos); W-MCR: Taxa de células médias (monócitos, basófilos e eosinófilos); W-LCR Taxa de células grandes (neutrófilos); Número absoluto de células pequenas (SCC), médias (MCC) e grande (LCC); PBS: tampão fosfato; PeNE 180 e PeNE360: nanoemulsão à base de óleo de pequi na concentração de óleo de 180 e 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; P.AA: nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo ácido anacárdico; P.DTX: nanoemulsão à base de óleo de pequi contendo docetaxel; AA: ácido anacárdico; DTX: docetaxel. Teste T (vs controle sem tumor): * $p < 0,05$ / ** $P < 0,01$. One-way ANOVA com pós teste Dunnet (grupos vs controle sem tumor): ^a, ^b, ^c, ^d: Diferença quando comparado com o grupo “sem tumor” ($p < 0,001$).

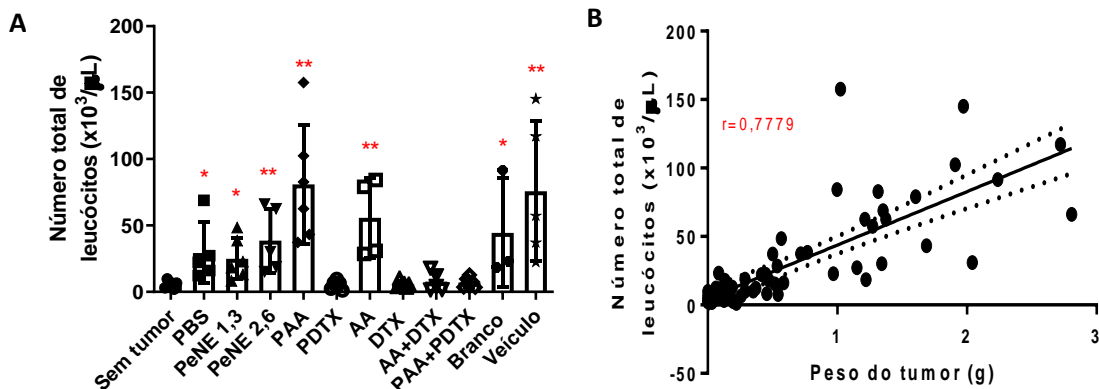


Figura 9. Avaliação do efeito dos tratamentos no número total de leucócitos (A). Correlação entre peso do tumor e número total de leucócitos pelo teste de correlação de Pearson (B).

3.5 Análises histopatológicas

A avaliação do tecido tumoral demonstrou variação na composição histológica entre os grupos experimentais. A classificação elaborada para demonstrar os componentes encontrados no microambiente tumoral está descrita na tabela 5.

Tabela 5. Classificação da região tumoral de acordo com componentes encontrados.

Classificação	Componentes encontrados na região tumoral avaliada
T0	ausência de tumor
T1	presença apenas de células neoplásicas
T2	presença de células neoplásicas, necrose e hemorragia
T3	presença de células neoplásicas, necrose, hemorragia e fibrose
T4	presença de células neoplásicas e fibrose

As imagens representadas na figura 10 ilustram os diferentes componentes histológicos presentes no microambiente tumoral e nas quais se baseia a classificação apresentada anteriormente. Pode-se observar que a área de regressão tumoral (T0) é constituída por tecido conjuntivo, com acúmulo de fibroblastos, em associação com o tecido adiposo típico da área (Figura B). Tecido tumoral constituído apenas por células neoplásicas (T1) está representado na figura C. Pode-se notar que as células apresentam distribuição difusa com limites imprecisos, citoplasma amplo e homogêneo. Os núcleos são arredondados ou lobulados, hipercromáticos e com cromatina heterogênea. Nucléolos evidentes estão presentes. Em seguida, região com células neoplásicas adjacente à área de necrose e hemorragia (T2) é observada na figura D. As células necrosadas possuem citoplasma homogêneo e, às vezes, fragmentado. A hemorragia está observada em meio ao tecido necrótico. Enfim, a figura E representa tecido tumoral T4 constituído por células neoplásicas e fibrose. A região da fibrose apresenta estroma denso com fibroblastos, representados por células mais alongadas.

A classificação tumoral T3 não está representada na imagem devido à dificuldade em encontrar campos da lâmina contendo os quatro componentes histológicos que permitam a realização de uma foto.

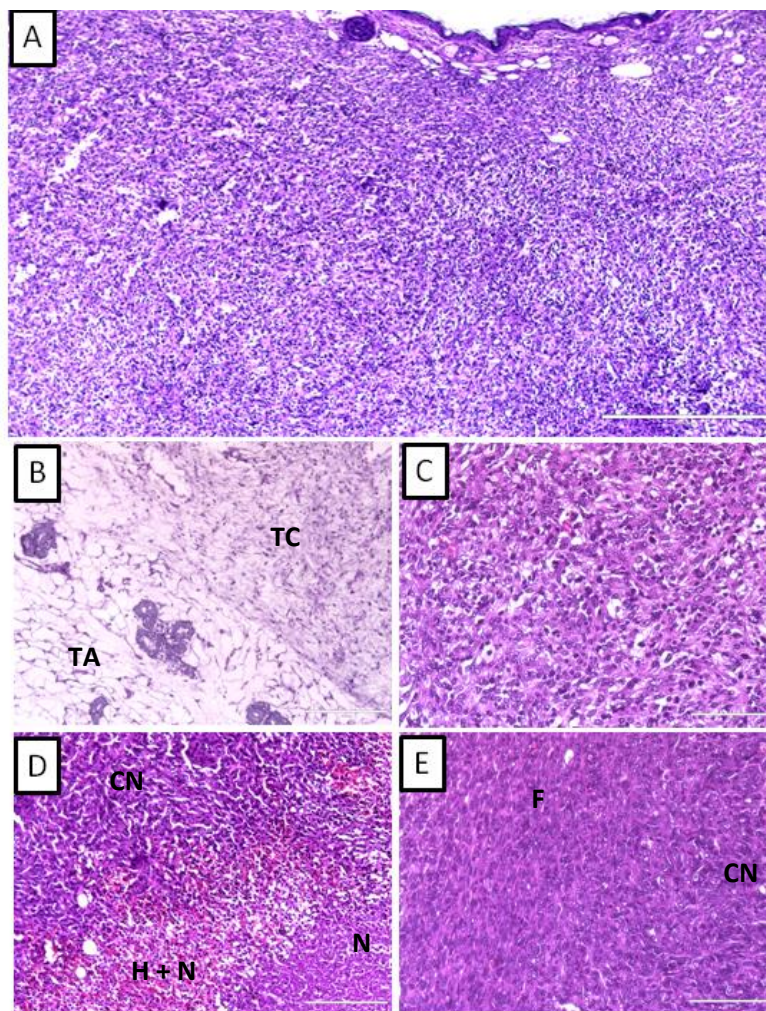


Figura 10. Análise histológica do tecido tumoral por coloração hematoxilina/eosina. (A) Panorama da proliferação neoplásica subcutânea (10x). (B) Regressão tumoral com presença de tecido conjuntivo (TC) e tecido adiposo (TA) - classificação T0. (20x). (C) Tecido tumoral apresentando apenas células neoplásicas (CN) – classificação T1 (20x). (D) Tecido tumoral com células neoplásicas (CN), necrose (N) e hemorragia (H) – classificação T2 (20x). (E) Tecido tumoral com células neoplásicas (CN) e fibrose (F) – classificação T4 (40x).

As características histológicas classificadas como T3 foram as mais observadas em todos os grupos experimentais, na exceção do grupo “AA+DTX” que apresentou metade dos animais em T1 e outra metade sem tecido tumoral (T0). Animais de outros grupos também apresentaram regressão tumoral: 2 animais tratados com “PDTX” e “PAA+PDTX”, e 1 animal tratado com “DTX”. A presença conjunta de células tumorais, necrose e hemorragia (T2) foi observada em 1 animal dos grupos “PBS”, “Branco” e “Veículo”. Além disso, células tumorais e fibrose (T4) foram notadas em animais dos grupos “DTX”, “PAA+PDTX” e “Veículo” (Tabela 6).

Tabela 6. Características tumorais de composição entre os diferentes grupos experimentais.

	T0	T1	T2	T3	T4
PBS	0	0	1	5	0
PeNE 1,3	0	0	0	6	0
PeNE 2,6	0	0	0	5	0
PDTX	2	0	0	4	0
DTX	1	1	0	2	2
PAA	0	0	0	6	0
AA	0	1	0	4	0
PAA+PDTX	2	0	0	3	1
AA+DTX	3	3	0	0	0
Branco	0	1	1	2	0
Veículo	0	0	1	2	2

T0: ausência de tumor / T1: apenas células neoplásicas / T2: células neoplásicas, necrose e hemorragia / T3: células neoplásicas, necrose, hemorragia e fibrose / T4: células neoplásicas e fibrose.

As análises histopatológicas também permitiram investigar presença de metástase em diferentes órgãos (pulmão, linfonodo, fígado, baço e rim). As amostras avaliadas foram classificadas de acordo com presença ou não de metástase em conjunto com outras características histológicas (Tabela 7).

Tabela 7. Classificação da metástase de acordo com componentes encontrados.

Classificação	Componentes encontrados na região tumoral avaliada
M0	ausência de metástase
M1	metástase apresentando apenas células neoplásicas
M2	metástase apresentando células neoplásicas, necrose e hemorragia
M3	metástase apresentando células neoplásicas, necrose, hemorragia e fibrose
M4	metástase apresentando células neoplásicas e fibrose

A figura 11 apresenta imagens representativas de metástase hepática, pulmonar e linfonodal do tipo M1. As células neoplásicas observadas apresentam elevado pleomorfismo citonuclear. Pode-se observar presença de vários focos de infiltração de células neoplásicas (apontados pelas setas pretas) no parênquima hepático (Figura B). As células neoplásicas dispostas lado a lado formando blocos metastáticos também invadiram parênquima pulmonar próximo às vias aéreas de menos calibre ou vasos

sanguíneos (Figura C). Blocos de células neoplásicas dispostos na região interfolicular e seios marginais nodais ainda foram observadas no linfonodo (Figura D).

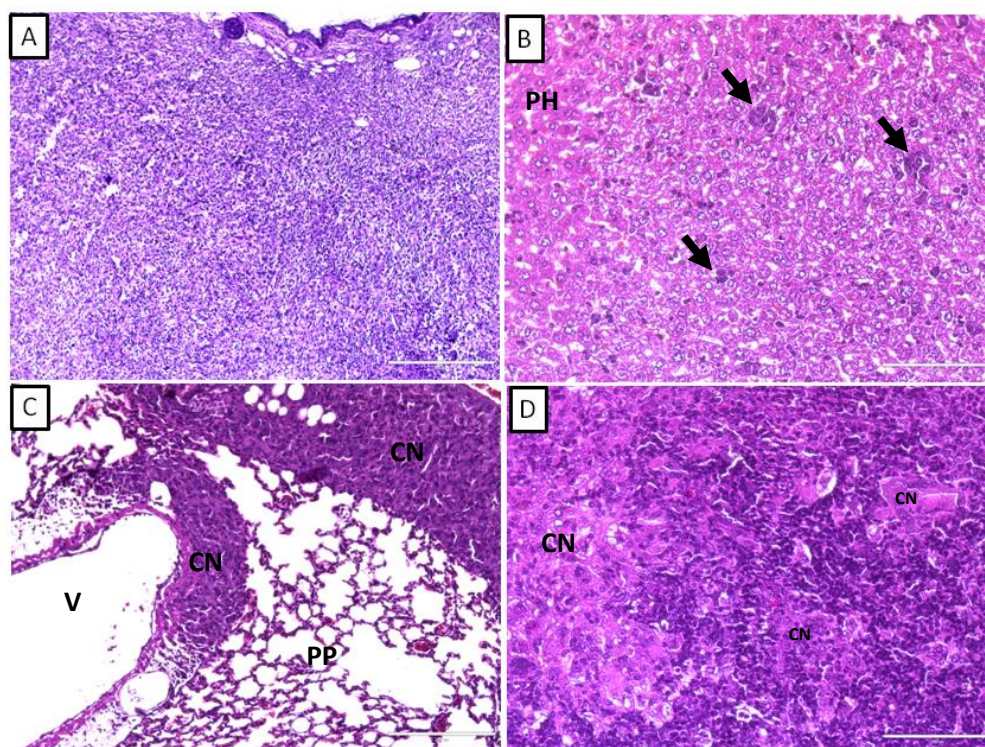


Figura 11. Análise histológica de metástase em fígado, pulmão e linfonodo por coloração hematoxilina/eosina. (A) Panorama da proliferação neoplásica subcutânea (10x). (B) Metástase hepática observada pela infiltração de células neoplásicas (seta preta) no parênquima hepático típico da área (PH). (C) Metástase pulmonar com presença de parênquima pulmonar (PP) normal e células neoplásicas (CN) próximo a vaso sanguíneo (V) ou via aérea de menor calibre. (D) Metástase linfonodal com infiltração de células neoplásicas (CN).

A presença de metástase foi confirmada em todos os grupos experimentais, exceto no “AA+DTX”. Os principais órgãos afetados foram pulmão, fígado e linfonodo com classificação predominante M1 (apenas infiltração de células neoplásicas). Metástases também foram observadas no baço e nos rins em 1 animal dos grupos “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6” e “Veículo”, e “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6” e “PAA”, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8. Número de animais com metástase nos diferentes órgãos de cada grupo experimental de acordo com a classificação M0 – M1 – M2 – M3 e M4.

		PBS	PeNE 1,3	PeNE 2,6	PDTX	DTX	PAA	AA	PAA+PDTX	AA+DTX	Branco	Veículo
Baço	M0	5	5	4	6	6	6	5	6	6	4	4
	M1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	M2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pulmão	M0	2	3	3	4	3	1	2	4	6	1	0
	M1	3	3	2	2	3	4	2	2	0	2	0
	M2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	M3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5
	M4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfonodo	M0	2	3	2	3	4	1	2	5	4	4	2
	M1	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	3
	M2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M4	0	2	2	0	0	3	2	0	0	0	0
	Ausente	1	1	0	2	2	0	1	1	2	0	0
Fígado	M0	1	0	0	6	6	0	1	5	6	1	0
	M1	4	6	5	0	0	5	4	1	0	3	5
	M2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rim	M0	5	5	4	6	6	5	5	6	6	4	5
	M1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	M2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

M0: ausência de metástase / M1: metástase apresentando apenas células neoplásicas / M2: metástase apresentando células neoplásicas, necrose e hemorragia / M3: metástase apresentando células neoplásicas, necrose, hemorragia e fibrose / M4: metástase apresentando células neoplásicas e fibrose.

3.6 Avaliação do efeito dos tratamentos no pulmão

Adicionalmente, avaliação macroscópica dos pulmões *ex vivo* demonstrou presença de nódulos em animais de alguns grupos experimentais (“PBS”, “PAA”, “AA”, “Branco” e “Veículo”) (Figura 12A). Entretanto, as análises por tomografia não corroboram com os dados da histologia e da observação de nódulos pulmonares (Figura 12B). De acordo com a avaliação, não foi possível detectar diferença na região pulmonar dos animais em nenhum grupo comparando com os grupos controles “sem tumor” e

“PBS”. Além disso, a avaliação de pulmões de animais antes da indução tumoral, no pré-tratamento e no pós-tratamento não demonstrou diferença significativa (Figura 12C).

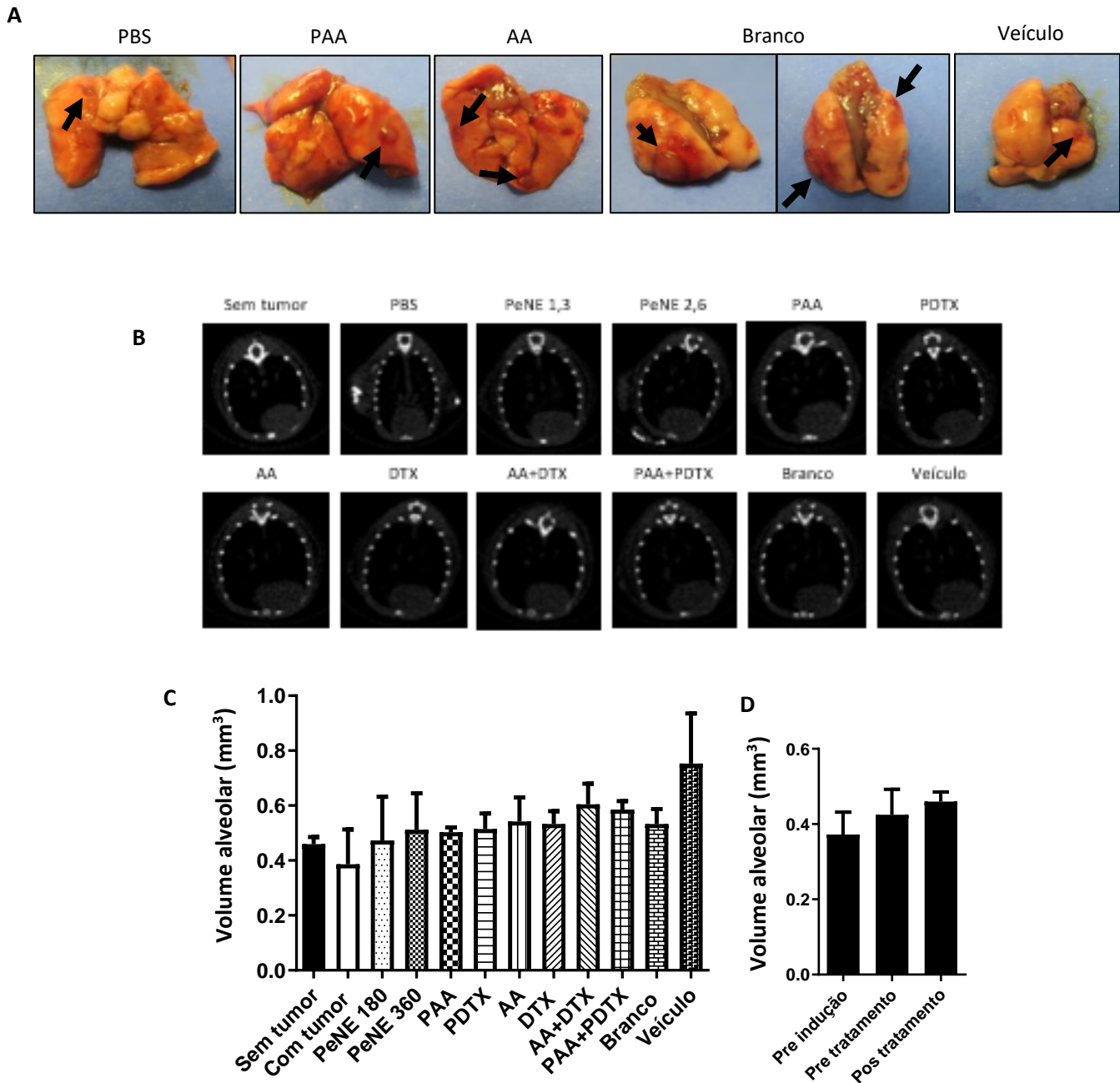


Figura 12. Avaliação do pulmão. (A) Fotografias representativas de pulmões com nódulos (setas pretas) observados após tratamento com “PBS”, “PAA”, “AA”, “Branco” e “Veículo”. (B) Imagens da região pulmonar representativas dos animais de cada grupo obtidas por tomografia computadorizada após tratamentos. (C) Representação gráfica da densidade alveolar do pulmão após tratamentos. (D) Densidade alveolar do pulmão antes a indução tumoral, antes do início do tratamento e após as sessões de tratamento. Sem diferença estatística.

4- Discussão

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) representa a forma mais agressiva com metástase e elevada taxa de morte entre os pacientes (Jhan&Andrechek, 2017). Assim, desenvolver novos agentes terapêuticos e/ou terapias alternativas se torna uma grande necessidade. O modelo de câncer de mama de camundongo ortotópico com metástase espontânea 4T1 representa um excelente modelo de estudo devido à sua similaridade com o modelo humano (Paschall & Liu, 2016; Coligan et al., 2001). De fato, as células são facilmente transplantadas na mama do camundongo para formar tumor primário no sítio anatómico correto. Em seguida, as células possuem a capacidade de desenvolver metástase de forma espontânea principalmente no linfonodo, pulmão, fígado, cérebro e ossos (Coligan et al., 2001).

Neste trabalho, os mesmos grupos experimentais testados *in vitro* no capítulo III foram testados *in vivo*. Porém, observamos várias divergências na resposta aos tratamentos quando comparamos os dois modelos.

Os capítulos anteriores (I, II e III) mostraram os efeitos citotóxicos dose-dependentes da nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE) em células de câncer de mama 4T1, *in vitro*. Entretanto, tais resultados não foram replicados no modelo *in vivo*. De fato, PeNE 1,3 tende a diminuir o volume tumoral, enquanto PeNE 2,6 tende a aumentá-lo quando comparado com o grupo controle (PBS) (Tabela 2-capítulo III). Além disso, a associação do ácido anacárdico à nanoemulsão (PAA) apresentou atividade anticâncer apenas *in vitro*, com efeito aditivo em relação ao AA e PeNE livres (Tabela 3-capítulo III). *In vivo*, o PAA tende a aumentar o volume tumoral quando comparado com o grupo controle (PBS). Diferenças entre os modelos *in vitro* e *in vivo* podem ocorrer, lembrando que nos ensaios *in vitro*, as células em monocamada estão diretamente em contato com os tratamentos em condições de temperatura, umidade e oxigênio controladas, enquanto o metabolismo e a organização estrutural dos tumores e dos tecidos no modelo *in vivo* são mais complexos. De fato, o microambiente tumoral (MT) é constituído por diversos tipos celulares tumorais e não tumorais (fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e células do sistema imune), matrice extracelular (complexo protéico), fatores de crescimento, citocinas, hormônios e enzimas, sistema de drenagem, e possui propriedades físicas próprias como dimensão 3D, pH e taxa de oxigênio (Soyal et al., 2015).

Devido a essa composição complexa, o próprio MT pode interferir a favor da carcinogênese. A presença de células não tumorais como fibroblastos, adipócitos e células endoteliais, pode contribuir com iniciação e progressão tumoral através da secreção de fatores de crescimento, mediadores pró-inflamatórios, interações célula-célula e metabolismos celulares beneficiando células tumorais (Dias et al., 2019). Infiltração de células de defesa como linfócitos e macrófagos pode representar bom prognóstico no CMTN. Porém, esse recrutamento de leucócitos também pode estar associado com imunossupressão e evasão imunológica do tecido tumoral (Adams et al., 2018). Existem vários subtipos de linfócitos e foi reportado que elevado nível de linfócitos do tipo FOXP3 (Treg) no MT contribuiu para evasão do sistema imune em células de câncer de mama e representa alvo interessante para futuro tratamento (Li et al., 2016). No presente estudo, observamos aumento significativo na quantidade de leucócitos totais no sangue dos animais tratados com PBS, PeNE 1,3, PeNE 2,6, PAA, AA e veículo (Tabela 4). Entretanto, podemos notar que a proporção de linfócitos no sangue dos animais diminuiu significativamente nesses grupos quando comparado com animais sem tumor ($p < 0,001$), sugerindo possível infiltração desses linfócitos na região tumoral.

O MT também apresenta alterações no metabolismo lipídico que podem influenciar no crescimento tumoral. Em células normais, ácidos graxos (AG) participam de várias funções metabólicas como síntese de lipídeos complexos e, conseqüentemente, são necessários para formação de membrana biológica, na sinalização de vias para manter homeostasia ou na reserva de energia para o organismo (Beloribi-Djefafia, Vasseur & Guillaumond, 2016). Em células cancerosas, alterações no metabolismo lipídico podem levar à modificação na captação, transporte e estoque de AG exógenos e na realização da lipogênese *de novo* a partir de macromoléculas presentes no microambiente tumoral. Os AG são assim utilizados em diversos mecanismos como produção de lipídios de sinalização pró-tumorigênica ou na oxidação β -mitocondrial para produzir ATP (Monaco, 2017; Koundouros & Poulgiannis, 2020). Tecido adiposo encontrado na região de mama é constituído por adipócitos (ricos em AG) e adipocine (proteínas de sinalização) que podem influenciar o desenvolvimento do tecido tumoral adjacente (Balaban et al., 2017). Co-cultura de adipócitos com células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 resultou no aumento da proliferação e migração tumoral devido à incorporação de AGs originários dos adipócitos pelas células cancerosas, *in vitro*. (Balaban et al., 2017). Guuaita-Esteruelas e colaboradores (2016) demonstraram que

exposição de adipocine FABP4 (proteína de ligação de ácido graxo 4) em células de câncer de mama MCF-7 induz expressão de outras proteínas de transporte de AG como FABP5 e aumento da proliferação celular. A elevada expressão de FABP5, detectada no sangue de paciente com câncer de mama (Guaita-Esteruelas et al., 2017), representa má prognóstico no CMTN (Liu et al., 2018) e seu silenciamento previne o desenvolvimento do câncer de mama em camundongos (Levi et al., 2013). Elevada expressão de esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1), que catalisa transformação de AG saturados em AG monoinsaturados, está associada com alterações no metabolismo lipídico em células tumorais. Inibidores de SCD1 representam alternativa para tratamento do câncer. Porém, Zhao e colaboradores (2017) reportaram que AG exógenos (como o ácido oleico, 100 mM) revertem a ação dos inibidores de SCD1 ao serem internalizados pelas células tumorais via CD36 e promovem o desenvolvimento tumoral em células de câncer de mama (MCF-7), *in vitro*. CD36, também conhecido como ácido graxo translocase, é uma proteína transmembranar que media a captação de AG pela células. A elevada expressão de CD36 é associada a prognóstico ruim em vários tipos de câncer, incluindo o de mama (Koundouros & Poulgiannis, 2020).

O óleo de pequi, presente nas formulações PeNE, PAA e PDTX, é principalmente constituído por AGs como ácido oleico (~50%) e ácido palmítico (~40%) (Tabela 1 – Capítulo I). Vale ressaltar que o óleo de pequi livre (capítulos I e II) e encapsulado (capítulos I, II e III) apresentaram efeito antitumoral em células de câncer de mama 4T1, *in vitro*. Esse efeito foi principalmente associado à presença do ácido oleico, pois vários estudos reportam seu potencial antitumoral em vários tipos de câncer (Joanitti, 2014; Jiang et al., 2017). Entretanto, o efeito anticâncer do ácido oleico é bastante controverso, e outros estudos demonstram seu papel no aumento da viabilidade celular, proliferação e/ou invasão em vários tipos de câncer, *in vitro* (Xiang et al., 2017; Zhao et al., 2017; Radde et al., 2016). Nas condições do presente estudo, podemos sugerir que a administração intratumoral de ácido oleico, ácido palmítico e outros AG presentes no óleo de pequi na forma de nanoemulsão foi recebida pelas células tumorais como fonte de energia e substrato para seu desenvolvimento. Assim, a exposição de maior quantidade de AG leva a maior aumento do volume tumoral como foi observado entre PeNE 1,3 e PeNE 2,6. Entretanto, como esse mecanismo não foi observado nos estudos *in vitro*, levantamos outra hipótese.

A atividade antioxidante do óleo de pequi poderia contribuir para a proteção das células tumorais. De fato, o efeito antioxidante do óleo de pequi foi reportado em vários estudos devido à componentes como carotenoides. A administração preventiva de antioxidante mostrou ser eficiente para impedir o crescimento tumoral. Entretanto, estudos reportaram que a administração de antioxidantes após surgimento do tumor pode acelerar o crescimento e favorecer metástase (Miranda-Vilela et al., 2014). Miranda-Vilela e colaboradores (2014) demonstraram que apenas a administração preventiva de óleo de pequi representou uma boa alternativa como tratamento adjuvante em modelo de câncer de mama Ehrlich. Estudo observacional apontou que o uso de suplemento à base de antioxidante (carotenoide, vitaminas C, A e E, e coenzima Q10) antes e durante tratamento (quimioterapia e radioterapia) aumenta de 41% as chances de recorrência em paciente com câncer de mama (Ambrosome et al., 2019). Assim, os antioxidantes presentes no óleo de pequi podem agir como protetores do estresse oxidativo sofrido pelas células tumorais e favorecer seu crescimento. Portanto, a administração de moléculas antioxidante durante tratamento do câncer deve ser evitada (Jung et al., 2019).

A concentração de óleo de pequi administrada nos animais dos grupos “PAA” e “PeNE 1,3” é a mesma (1,3 mg/kg/dose). No entanto, o efeito do “PAA” no crescimento tumoral foi parecido com o “PeNE 2,6” com volume tumoral parecido com o do grupo controle “PBS”. Assim, pode haver combinação entre efeitos do óleo de pequi e o próprio AA. De fato, notamos que os animais tratados com “AA” livre apresentaram volume tumoral levemente superior ao dos animais tratados com “PAA” (Figura 5). Entretanto, esse resultado não foi esperado, uma vez que nós observamos diminuição da viabilidade celular após exposição com PAA em células 4T1 *in vitro*, e que a maioria dos estudos reportam o efeito antitumoral do AA em vários tipos de câncer, incluindo o de mama. Contudo, Xiu e colaboradores (2014) reportaram o aumento da proliferação celular após exposição ao AA em menores concentrações (2,5 to 20 μM) em células de câncer de ovário com elevada expressão de PI3K e VEGF e baixa expressão de caspase 3. *In vitro*, nos observamos que o AA apresentou maior viabilidade celular quando comparado com o controle negativo nas concentrações de 7 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (correspondentes a 20 e 28 μM) ($p < 0,05$) após 48 horas de exposição em células de câncer de mama 4T1 (Tabela 2 – Capítulo III). O efeito do AA em modelo *in vivo* ainda está pouco investigado. Liu e colaboradores (2019) demonstraram que a administração intraperitoneal de AA (1 mg/kg por 1 mês) não resultou em peso e volume tumoral significativamente diferentes quando

comparados com o controle positivo em câncer de mama ER+ induzido em camundongos NSG. Estudo anterior reportou que a aplicação intraperitoneal de AA (50 mg/kg) em camundongos Swiss com câncer de mama leva a morte celular por apoptose com aumento da expressão de p53 e Bax, assim como a redução da expressão de Bcl-2 (Raj et al., 2016). Pode-se destacar a diferença de concentração de AA administrado nos animais sugerindo que, talvez, uma concentração maior poderia apresentar melhor atividade antitumoral. Entretanto, o aumento do volume tumoral observado pode ter sido influenciado pelo efeito antioxidante do AA (Hamad&Mubofu, 2015). Gomez Júnior e colaboradores (2020) reportaram que a administração intraperitoneal de AA (25 mg/kg) levou à redução do estresse oxidativo em células peritoneais de camundongos Swiss. Similar à discussão referente ao óleo de pequi, a administração de moléculas antioxidantes pode proteger o tecido tumoral de estresse oxidativo e assim, promover crescimento tumoral. Adicionalmente, vale lembrar que o AA foi administrado com veículo constituído por tween 80, etnaol e solução glicosilada 5% (Makhov et al., 2012). Como foi observado, o grupo “Veículo” também apresentou volume tumoral superior ao controle “PBS” (Figura 5). Sabe-se que a glicose representa fonte de energia para as células e pode ser usada como precursores na síntese de AG a partir da lipogênese *de novo* e assim, alimentar o metabolismo lipídico para contribuir na carcinogênese como citado anteriormente.

Em paralelo, houve redução significativa do volume tumoral nos animais tratados com “DTX”, “P.DTX”, “AA+DTX” e “P.AA+P.DTX” ($p < 0,001$) sem diferença entre si (Figura 5). Tais tratamentos foram bastante eficientes, mostrando ausência de células tumorais em 50% dos animais tratados com “AA+DTX”, 33,3% para “PAA+PDTX” e “PDTX”, e 16,6% para “DTX” de acordo com análises histológicas (Tabela 6). Contudo, esses resultados novamente não corroboram com os dados *in vitro* reportados no capítulo III. De fato, nós observamos, *in vitro*, melhoria da atividade antitumoral após encapsulamento do DTX (P.DTX), mostrando sinergismo quando comparado com DTX e PeNE livres. Além disso, a associação “AA+DTX” apresentou efeito antagônico, enquanto a combinação de suas formas nanoencapsuladas “PAA+PDTX” demonstrou efeito aditivo no modelo *in vitro* (Capítulo III).

O DTX é um dos quimioterápicos frequentemente usados no tratamento do câncer de mama e um dos mais estudados a fim de melhorar sua eficácia e reduzir os efeitos adversos associados à sua administração. O DTX impede a despolimerização dos

microtúbulos levando ao bloqueio do ciclo celular e redução da proliferação celular. Os dados evidenciam que a presença do DTX foi primordial na redução do volume tumoral dos 4 grupos experimentais. Podemos sugerir que a ação do DTX livre ou encapsulado, administrado diretamente na região tumoral, agiu de forma rápida levando à morte das células tumorais impedindo a ação estimulante do óleo de pequi e do AA observado nos outros tratamentos. Pode-se hipotetizar que doses menores e/ou redução na frequência de administração permitiriam observar melhor possíveis diferenças no efeito antitumoral entre esses grupos.

Maior tempo de exposição é uma das vantagens da administração intratumoral, principalmente no caso de nanopartículas que podem liberar o fármaco diretamente no tecido tumoral ao longo do tempo, minimizando possível toxicidade sistêmica (Zheng et al., 2010). Além disso, administração intratumoral evita eliminação precoce das nanopartículas pelos sistemas renal e hepático (Wei et al., 2018). Administração intratumoral de nanopartículas contendo DTX (5 e 10 mg/kg) aumentou a eficácia do DTX em câncer de ovário e diminuiu efeitos tóxicos no fígado, rim e células da medula óssea em modelo *in vivo* (Zheng et al., 2010). Em modelo de câncer de mama *in vivo*, o encapsulamento da doxorubicina associada a hidrogel aumentou a eficácia do tratamento, reduzindo os efeitos tóxicos (Fong et al., 2017). Entretanto, no presente trabalho, não foi possível observar melhoria na eficácia do tratamento baseado em nanotecnologia. Assim, podemos sugerir que, além do ajuste na dose e/ou na frequência de administração do DTX, outras vias de administração poderiam melhorar a farmacocinética e demonstrar melhor eficácia nos tratamentos à base de nanoemulsão.

Administração intravenosa é frequentemente usada no tratamento do câncer de mama, inclusive para aplicação de nanopartículas como Abraxane® aprovada pela FDA em 2006 (Chenthamara et al., 2019). Essa via apresenta melhorias na eficácia de tratamentos baseados em nanotecnologia quando comparado com o fármaco livre (Palma et al., 2014). Atrafi e colaboradores (2020) reportaram que administração intravenosa de DTX nanoencapsulado aumenta de mais de 400% a concentração do DTX no tumor comparado com DTX livre em paciente com vários tipos de câncer cujo tratamento com taxane é recomendado. Administração intravenosa de nanopartículas de PLGA contendo DTX (30 mg/kg com total de 6 sessões de tratamento) aumentou a inibição do crescimento tumoral e elevaram o tempo de sobrevivência em modelo de câncer de mama

triplo negativo resistente a taxanos quando comparado com a administração de DTX livre (Bowerman et al., 2016).

Apesar de não ter demonstrado diferença significativa na redução do volume tumoral, notamos que houve diferença no processo de metástase entre os grupos experimentais contendo o DTX (Tabela 6). A metástase se define pela formação de tumor secundário fora da região tumoral de origem por espalhamento de células cancerosas primárias via corrente sanguínea ou linfática. O CMTN é conhecido pela elevada taxa de metástase associada com elevada taxa de mortalidade. Alguns animais tratados com “DTX”, “PDTX” e “PAA+PDTX” apresentaram metástases em alguns órgãos (pulmão, pulmão e linfonodo, pulmão e fígado, respectivamente) observadas por histologia. Entretanto, nenhuma metástase foi observada em animais tratados com “AA+DTX”. Este grupo se destaca então dos demais, pois além de reduzir volume tumoral, ele também impediu processo de metástase em todos os animais tratados. Esse resultado sugere algum efeito combinatório entre DTX e AA. O efeito anti-metastático do AA foi reportado em câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7, *in vitro* (Zhao et al., 2018; Shilpa et al., 2015). Os autores sugerem que o AA suprime o poder de invasão e migração induzindo regulação negativa da metaloproteinase 9 (MMP9), envolvida no processo de metástase. Adicionalmente, a transição epitelial-mesenquimal, na qual células epiteliais adquirem poder de invasão de células mesenquimais, pode ser suprimida pelo AA em células MDA-MB-231 (Zhao et al., 2018). Em células MCF-7, Shilpa e colaboradores (2015) demonstraram o efeito anti-metastático do AA com regulação negativa na expressão de VEGF (receptor do fator de crescimento endotelial vascular) e, conseqüentemente, inibição da transição epitelial-mesenquimal. Até o momento, o efeito combinatório entre DTX e AA em modelo de câncer de mama é pouco investigado. Porém, alguns estudos reportam o uso do AA para funcionalizar e direcionar nanopartículas transportadoras de DTX em células cancerosas de mama *in vivo*, devido à sua afinidade por receptores VEGF, superexpressos em células cancerosas (Kushwah et al., 2018a; Kushwah et al., 2018b). Vale ressaltar que esses estudos não reportam o efeito antitumoral do AA sozinho ou da associação do AA com DTX foram da nanopartícula. Assim, podemos sugerir que células viáveis mas fragilizadas pela exposição ao DTX podem sofrer efeito anti-metastático do AA, impedindo migração para outros órgãos.

Observamos que animais tratados com “PeNE 1,3” e “PeNE 2,6” apresentaram maior espalhamento das células tumorais com metástase em todos os órgãos estudados (baço, pulmão, linfonodo, fígado e rim). Animais tratados com “PAA” também apresentaram metástase em todos os órgãos, na exceção do baço. Pulmão, fígado e linfonodo são órgãos que apresentam com mais frequência metástase em modelo de CMTN. Metástase no baço é extremamente raro (Fadli et al., 2017). O processo de metástase necessita de muita energia para ocorrer. Assim, o metabolismo lipídico pode contribuir para migração e invasão de células tumorais gerando energia através da oxidação dos AG (Chen&Huang, 2019). De fato, exposição do ácido palmítico em células de carcinoma oral humano levou à maior taxa de metástase no linfonodo via internalização através proteína de transporte de AG, CD36 (Pascual et al. 2017). Em células de câncer de pâncreas, o ácido palmítico também induziu invasão e migração das células tumorais com ativação da via de sinalização TLR4/ROS/NF- κ B/MMP-9, *in vitro* (Binker-Cosen et al., 2017). Xu e colaboradores (2020) relatam que a enzima ácido graxo sintase promove metástase das células de câncer de mama. Xiang e colaboradores (2018) demonstraram que o ácido oleico promove invasão de células de câncer gástrico através via de sinalização PI3K/Akt (Xiang et al. 2017).

A avaliação clínica dos animais permite acompanhar o efeito do tratamento ao longo do tempo e observar possíveis efeitos tóxicos. O consumo de ração foi constante ao longo do experimento e todos os animais ganharam peso corporal quando comparado com o primeiro e último dia de avaliação (Figuras 1 e 2). Em geral, estudos apontam que a não perda de peso corporal dos animais indica não toxicidade do tratamento nas condições testadas. Além disso, a perda de apetite também pode sugerir algum efeito tóxico nos animais. Diversos outros parâmetros clínicos podem ser observados tais como alopecia, sinais de dor, agressividade, fraqueza entre outros. Alguns animais dos grupos “PeNE 1,3” e “PAA+PDTX” apresentaram perda do bigode enquanto alguns animais tratados com AA perderam bigode e pelos da região do focinho (Figura 3). É relevante notar que o AA encapsulado (PAA) não levou a alopecia nos animais tratados o que pode apontar para algum benefício do uso da nanotecnologia na citotoxicidade não seletiva. A alopecia, ou perda de pelos, é um efeito adverso comum em tratamento do câncer baseado em quimioterapia (Rubio-Gonzalez et al., 2018) e é considerado como toxicidade não seletiva. A frequência de alopecia encontrada em pacientes tratados com taxanos (DTX e PTX) é de 80% (Rubio-Gonzalez et al., 2018). Entretanto, o DTX livre e encapsulado

(P.DTX) não apresentaram esse fenômeno nas condições testadas neste estudo. Dados da literatura não corroboram com a toxicidade do AA observada neste estudo. A administração oral de AA em camundongos Balb/c não apresentou efeitos mutagênicos nem toxicidade aguda ou subaguda em concentrações abaixo de 300 mg/kg (Carvalho et al., 2011). Além disso, o AA administrado por via intraperitoneal em camundongos Swiss apresentou atividade anti-inflamatório, antioxidante e antinociceptivo na dose de 25 mg/kg (Gomes Júnior et al., 2020).

O modelo de câncer de mama 4T1 é conhecido por induzir reação leucemóide (aumento do número de leucócitos no sangue periférico) com esplenomegalia (DuPré, Redelman, and Hunter 2007). De fato, nós observamos aumento da leucocitose em vários grupos experimentais (“PBS”, “PeNE 1,3”, “PeNE 2,6”, “PAA”, “AA”, “Branco” e “Veículo”). Esse aumento apresentou correlação com o volume tumoral dos animais (Figura 11B). Notamos também que os animais desses mesmos grupos experimentais apresentaram aumento significativo no volume do baço. O baço é o maior órgão do sistema linfático do organismo. Ele possui o papel de filtração do sangue circulante e apresenta também função imunológica sendo um dos sítios de produção de linfócitos (McKenzie et al., 2018). O aumento no volume do baço é conhecido como esplenomegalia e apresentou elevada correlação com volume tumoral (Figura 7C).

Investigar possíveis efeitos tóxicos é importante no processo de desenvolvimento de novos tratamentos. Os sistemas hepático e renal são responsáveis por uma parte da eliminação de NPs e fármacos do organismo (Longmire et al., 2008). Assim, possíveis efeitos tóxicos associados aos tratamentos podem ser observados nesses órgãos. Alterações no nível de algumas enzimas hepáticas (AST - aspartato aminotransferase e a ALT - alanina aminotransferase) e renais (creatinina K e ureia) podem indicar presença de lesão. Os dados obtidos neste estudo demonstram que apenas animais do grupo “AA+DTX” apresentaram aumento significativo de ALT quando comparado com o grupo sem tumor (Tabela 2). Adicionalmente, de acordo com as análises histológicas, não foi possível observar alterações significativas nos tecidos hepático e renal em nenhum grupo experimental (figuras não mostradas). Esse fato pode estar associado à via de administração intratumoral que limita o contato direto dos tratamentos para outras regiões do organismo.

5- Conclusões

Os dados dos experimentos *in vivo* mostraram que apenas os grupos contendo DTX apresentaram redução significativa do volume tumoral associada a um restabelecimento dos parâmetros sanguíneos, particularmente o leucograma, atingindo valores semelhantes aos de animais saudáveis. Adicionalmente, nenhum dos tratamentos induziu toxicidade expressivas nos rins e no fígado, preservando as características histológicas desses tecidos e os níveis de suas enzimas detectadas por avaliações bioquímicas. O tratamento considerado mais promissor, ou seja, que apresentou maior redução no volume tumoral e nenhuma metástase, foi a associação do DTX e AA livres. Este estudo é o primeiro a reportar efeito da combinação do DTX e AA em modelo de câncer de mama *in vivo*. Assim, esse potencial anticâncer deve ser mais investigado. Futuros estudos precisam ser realizados para entender melhor o efeito dessa associação e determinar seus mecanismos de ação.

6- Perspectivas

Alguns ensaios ainda precisam ser realizados para complementar os resultados já obtidos:

- fragmentação de DNA das células da medula óssea para avaliação de genotoxicidade;
- micronúcleo no sangue periférico para avaliação de genotoxicidade;
- imunohistoquímica dos tumores (ki67)
- investigação de outras vias de administração e ajustes na dose e/ou frequência de administração de DTX.

Referências

- Adams, Thomas A., Paris J. Vail, Amanda Ruiz, Mehri Mollaei, Peter A. McCue, Erik S. Knudsen, and Agnieszka K. Witkiewicz. 2018. "Composite Analysis of Immunological and Metabolic Markers Defines Novel Subtypes of Triple Negative Breast Cancer." *Modern Pathology* 31 (2): 288–98. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.126>.
- Al, Xiu et. n.d. "Xiu et Al., 2014 AA Ovario Cancer Enhanced.Pdf."
- Ambrosone, Christine B., Gary R. Zirpoli, Alan D. Hutson, William E. McCann, Susan E. McCann, William E. Barlow, Kara M. Kelly, et al. 2020. "Dietary Supplement Use during Chemotherapy and Survival Outcomes of Patients with Breast Cancer Enrolled in a Cooperative Group Clinical Trial (SWOG S0221)." *Journal of Clinical Oncology* 38 (8): 804–14. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01203>.
- Antonio Luiz Gomes Júnior, Muhammad Torequl Islam, Lucas Antonio Duarte Nicolau, Luan Kevin Miranda de Souza, Tiago de Souza Lopes Araújo, Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Kerolayne de Melo Nogueira, Luciano da Silva Lopes, Jand-Venes Rolim Medeiros, Mohammad S Mubarak and Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante. 2020. "Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Properties of Anacardic Acid in Experimental Models."
- Atrafi, Florence, Herlinde Dumez, Ron H.J. Mathijssen, Catharine W. Menke van der Houven van Oordt, Cristianne J.F. Rijcken, Rob Hanssen, Ferry A.L.M. Eskens, and Patrick Schöffski. 2020. "A Phase I Dose-Escalation and Pharmacokinetic Study of a Micellar Nanoparticle with Entrapped Docetaxel (CPC634) in Patients with Advanced Solid Tumours." *Journal of Controlled Release* 325 (June): 191–97. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.020>.
- Balaban, Seher, Lisa S. Lee, Bianca Varney, Atqiya Aishah, Quanqing Gao, Robert F. Shearer, Darren N. Saunders, Thomas Grewal, and Andrew J. Hoy. 2018. "Heterogeneity of Fatty Acid Metabolism in Breast Cancer Cells Underlies Differential Sensitivity to Palmitate-Induced Apoptosis." *Molecular Oncology* 12 (9): 1623–38. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12368>.
- Balaban, Seher, Robert F. Shearer, Lisa S. Lee, Michelle van Geldermalsen, Mark Schreuder, Harrison C. Shtein, Rose Cairns, et al. 2017. "Adipocyte Lipolysis Links Obesity to Breast Cancer Growth: Adipocyte-Derived Fatty Acids Drive Breast Cancer Cell Proliferation and Migration." *Cancer & Metabolism* 5 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0163-7>.
- Beloribi-Djefafli, S, S Vasseur, and F Guillaumond. 2016. "Lipid Metabolic Reprogramming in Cancer Cells." *Oncogenesis* 5 (1): e189–e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>.
- Binker-Cosen, Makena J., Daniel Richards, Brenda Oliver, Herbert Y. Gaisano, Marcelo G. Binker, and Laura I. Cosen-Binker. 2017. "Palmitic Acid Increases Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells AsPC-1 through TLR4/ROS/NF-KB/MMP-9 Signaling Pathway." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 484 (1): 152–

58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.051>.
- Bowerman, C.J.; Byrne, J.D.; Chu, K.S.; Schorzman, A.N.; Keeler, A.W.; Sherwood, C.A.; Perry, J.L.; Luft, J.C.; Darr, D.B.; Deal, A.M.; Napier, M.E.; Zamboni, W.C.; Sharpless, N.E.; Perou, C.M. and De Simone J.M. 2016. "Docetaxel Loaded PLGA Nanoparticles Improve Efficacy in Taxana Resistant Tripl Negative Breast Cancer."
- Carvalho, Ana Laura Nicoletti, Raquel Annoni, Paula Regina Pereira Silva, Primavera Borelli, Ricardo Ambrósio Fock, Maria Teresa Salles Trevisan, and Thais Mauad. 2011. "Acute, Subacute Toxicity and Mutagenic Effects of Anacardic Acids from Cashew (*Anacardium Occidentale* Linn.) in Mice." *Journal of Ethnopharmacology* 135 (3): 730–36. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.002>.
- Chenthamara, Dhriya, Sadhasivam Subramaniam, Sankar Ganesh Ramakrishnan, Swaminathan Krishnaswamy, Musthafa Mohamed Essa, Feng Huei Lin, and M. Walid Qoronfleh. 2019. "Therapeutic Efficacy of Nanoparticles and Routes of Administration." *Biomaterials Research*. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0166-x>.
- Dias, Ana S., Catarina R. Almeida, Luisa A. Helguero, and Iola F. Duarte. 2019. "Metabolic Crosstalk in the Breast Cancer Microenvironment." *European Journal of Cancer* 121: 154–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.09.002>.
- DuPré, Sally A., Doug Redelman, and Kenneth W. Hunter. 2007. "The Mouse Mammary Carcinoma 4T1: Characterization of the Cellular Landscape of Primary Tumours and Metastatic Tumour Foci." *International Journal of Experimental Pathology* 88 (5): 351–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x>.
- Fadli, Mohammed El, Khaldoun Kerrou, Hasnae Alaoui Mhamdi, Sandrine Richard, Ahmed Khalil, Jean Pierre Lotz, Rhizlane Belbaraka, and Joseph Gligorov. 2017. "Breast Cancer Metastasis to the Spleen: A Case Report and Literature Review." *Oxford Medical Case Reports* 2017 (12): 250–52. <https://doi.org/10.1093/omcr/omx069>.
- Guaita-Esteruelas, Sandra, Alba Bosquet, Paula Saavedra, Josep Gumà, Josefa Girona, Eric W.F. Lam, Kepa Amillano, Joan Borràs, and Lluís Masana. 2017. "Exogenous FABP4 Increases Breast Cancer Cell Proliferation and Activates the Expression of Fatty Acid Transport Proteins." *Molecular Carcinogenesis* 56 (1): 208–17. <https://doi.org/10.1002/mc.22485>.
- Guaita-Esteruelas, Sandra, Paula Saavedra-García, Alba Bosquet, Joan Borràs, Josefa Girona, Kepa Amiliano, Marta Rodríguez-Balada, Mercedes Heras, Luís Masana, and Josep Gumà. 2017. "Adipose-Derived Fatty Acid-Binding Proteins Plasma Concentrations Are Increased in Breast Cancer Patients." *The Oncologist* 22 (11): 1309–15. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0483>.
- Hsieh, Chia Chien, Blanca Hernández-Ledesma, and Ben O. de Lumen. 2011. "Cell Proliferation Inhibitory and Apoptosis-Inducing Properties of Anacardic Acid and Lunasin in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells." *Food Chemistry* 125 (2): 630–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.051>.
- "Jhan 2017 Triple Negative.Pdf." n.d.

- Jung, Audrey Y., Xinting Cai, Kathrin Thoene, Nadia Obi, Stefanie Jaskulski, Sabine Behrens, Dieter Flesch-Janys, and Jenny Chang-Claude. 2019. "Antioxidant Supplementation and Breast Cancer Prognosis in Postmenopausal Women Undergoing Chemotherapy and Radiation Therapy." *American Journal of Clinical Nutrition* 109 (1): 69–78. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy223>.
- Koundouros, Nikos, and George Poulogiannis. 2020. "Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer." *British Journal of Cancer*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>.
- Kushwah, Varun, Devesh Kumar Jain, Ashish Kumar Agrawal, and Sanyog Jain. 2018. "Improved Antitumor Efficacy and Reduced Toxicity of Docetaxel Using Anacardic Acid Functionalized Stealth Liposomes." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172 (December): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.047>.
- Kushwah, Varun, Sameer S. Katiyar, Chander Parkash Dora, Ashish Kumar Agrawal, Dimitrios A. Lamprou, Ramesh C. Gupta, and Sanyog Jain. 2018. "Co-Delivery of Docetaxel and Gemcitabine by Anacardic Acid Modified Self-Assembled Albumin Nanoparticles for Effective Breast Cancer Management." *Acta Biomaterialia* 73: 424–36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.057>.
- Li, Zhenhua, Pengzhi Dong, Meijing Ren, Yawen Song, Xiaolong Qian, Yiling Yang, Shuai Li, Xinmin Zhang, and Fangfang Liu. 2016. "PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3+regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient." *Journal of Cancer* 7 (7): 784–93. <https://doi.org/10.7150/jca.14549>.
- Liraz Levi¹, Glenn Lobo¹, Mary Kathryn Doud², Johannes von Lintig¹, Darcie Seachrist¹, Gregory P. Tochtrop², and Noa Noy. 2015. "Genetic Ablation of the Fatty Acid-Binding Protein FABP5 Suppresses HER2-Induced Mammary Tumorigenesis."
- Liu, Rong Zong, Kathryn Graham, Darryl D. Glubrecht, Devon R. Germain, John R. Mackey, and Roseline Godbout. 2011. "Association of FABP5 Expression with Poor Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Implication for Retinoic Acid Therapy." *American Journal of Pathology* 178 (3): 997–1008. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.075>.
- Liu, Wenjie, Yi Cui, Wen Ren, and Joseph Irudayaraj. 2019. "Epigenetic Biomarker Screening by FLIM-FRET for Combination Therapy in ER+ Breast Cancer." *Clinical Epigenetics* 11 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0620-6>.
- Makhov, P., Golovine, K., Canter, D., Kutikov, A., Simhan, J., & Corlew, M. M., et al. (2012). Co-administration of piperine and docetaxel results in improved anti-tumor efficacy via inhibition of cyp3a4 activity. *Prostate*, 72(6), 661-7.
- McKenzie, Campbell V., Chanukya K. Colonne, Jia Hao Yeo, and Stuart T. Fraser. 2018. "Splenomegaly: Pathophysiological Bases and Therapeutic Options." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 94: 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.11.011>.
- Michelle Longmire, Peter L. Choyke, M.D., and Hisataka Kobayashi, M.D., Ph.D. 2012. "Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imagination Agents:

- Consideration and Caveats” 3 (5): 703–17.
<https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>. Clearance.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Cesar K. Grisolia, João Paulo F. Longo, Raphael C.A. Peixoto, Marcos Célio de Almeida, Lilian Carla P. Barbosa, Mariana M. Roll, et al. 2014. “Oil Rich in Carotenoids Instead of Vitamins C and E as a Better Option to Reduce Doxorubicin-Induced Damage to Normal Cells of Ehrlich Tumor-Bearing Mice: Hematological, Toxicological and Histopathological Evaluations.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (11): 1161–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Flávia A. Portilho, Vitor G.B. De Araujo, Luciana L.C. Estevanato, Bélin P. Mezzomo, Maria de Fátima M. De Almeida Santos, and Zulmira G.M. Lacava. 2011. “The Protective Effects of Nutritional Antioxidant Therapy on Ehrlich Solid Tumor-Bearing Mice Depend on the Type of Antioxidant Therapy Chosen: Histology, Genotoxicity and Hematology Evaluations.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (11): 1091–98.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.09.009>.
- Monaco, Marie E. 2017. “Fatty Acid Metabolism in Breast Cancer Subtypes.” *Oncotarget* 8 (17): 29487–500. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15494>.
- Park, M.; Upton, D.; Blackmon.; Dixon, V.; Craver, S.; Neal, D. and Perkins, D. n.d. “Park et Al., 2018 AA Pancreatic Cancer.Pdf.”
- Paschall, Amy V., and Kebin Liu. 2016. “An Orthotopic Mouse Model of Spontaneous Breast Cancer Metastasis.” *Journal of Visualized Experiments* 2016 (114): 1–7.
<https://doi.org/10.3791/54040>.
- Pascual, Gloria, Alexandra Avgustinova, Stefania Mejetta, Mercè Martín, Andrés Castellanos, Camille Stephan Otto Attolini, Antoni Berenguer, et al. 2017. “Targeting Metastasis-Initiating Cells through the Fatty Acid Receptor CD36.” *Nature* 541 (7635): 41–45. <https://doi.org/10.1038/nature20791>.
- Radde, Brandie N, Negin Alizadeh-Rad, Stephanie M Price, David J Schultz, and Carolyn M Klinge. 2016. “Anacardic Acid, Salicylic Acid, and Oleic Acid Differentially Alter Cellular Bioenergetic Function in Breast Cancer Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 117 (11): 2521–32. <https://doi.org/10.1002/jcb.25544>.
- Rubio-Gonzalez, Belen, Margit Juhász, Jamie Fortman, and Natasha Atanaskova Mesinkovska. 2018. “Pathogenesis and Treatment Options for Chemotherapy-Induced Alopecia: A Systematic Review.” *International Journal of Dermatology* 57 (12): 1417–24. <https://doi.org/10.1111/ijd.13906>.
- Savas D Soysal, Alexandar Tzankov, Simone E Muenst. 2015. “Soyal et Al., 2015.PdfRole of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer.”
- Tan, Jing, Jiang Xianzhen, Guangming Yin, Leye He, Jianye Liu, Long Zhi, Jiang Zhiqiang, and Kun Yao. 2017. “Anacardic Acid Induces Cell Apoptosis of Prostatic Cancer through Autophagy by ER Stress/DAPK3/Akt Signaling Pathway.” *Oncology Reports* 38 (3): 1373–82. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5841>.

To, Herapeutic, and Pproaches Graziella A Joanitti. n.d. "O LEIC A CID AND C AN CER : A GENTS IN A NTICANCER A PPROACHES," 1–21.

Xiang, Fan, Ke Wu, Yulin Liu, Liang Shi, Di Wang, Gang Li, Kaixiong Tao, and Guobin Wang. 2017. "Omental Adipocytes Enhance the Invasiveness of Gastric Cancer Cells by Oleic Acid-Induced Activation of the PI3K-Akt Signaling Pathway." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 84: 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.12.002>.

Xu, Shuo, Tingting Chen, Lihua Dong, Tao Li, Hui Xue, Bo Gao, Xiaodong Ding, Hui Wang, and Hua Li. 2021. "Fatty Acid Synthase Promotes Breast Cancer Metastasis by Mediating Changes in Fatty Acid Metabolism." *Oncology Letters* 21 (1): 1–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12288>.

Zhao, Jing, Zheng Zhi, Chao Wang, Hanying Xing, Guangyao Song, Xian Yu, Yajun Zhu, Xing Wang, Xuemei Zhang, and Yan Di. 2017. "Exogenous Lipids Promote the Growth of Breast Cancer Cells via CD36." *Oncology Reports* 38 (4): 2105–15. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5864>.

Zhao, Qing, Xiaofeng Zhang, Haifeng Cai, Pei Zhang, Dong Kong, Xiaosong Ge, Min Du, Rong Liang, and Wenxia Dong. 2018. "Anticancer Effects of Plant Derived Anacardic Acid on Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells." *American Journal of Translational Research* 10 (8): 2424–34.

CONCLUSÃO GERAL

Concluimos deste estudo que:

- Nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE) foi obtida com sucesso por método de ultrasonicação.
- As características de PeNE corroboram com dados da literatura ($120,3 \pm 2,0$ nm – $PdI=0,238$ e potencial Zeta = $-15,03$ mV).
- PeNE apresentou estabilidade ao longo do tempo (200 dias, aproximadamente 6 meses) em termo de diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial Zeta em diferentes temperaturas de armazenamento.
- PeNE apresentou atividade dose e tempo dependente em células de câncer de mama 4T1, *in vitro*. Em paralelo, o óleo de pequi apresentou atividade dose-dependente.
- Na concentração de $180 \mu\text{g/mL}$ em tempos de incubação de 24 e 48 horas, PeNE apresenta efeito antitumoral maior quando comparado com o óleo de pequi livre, com várias alterações como: mudança na morfologia celular, diminuição da proliferação celular, alteração da permeabilidade da membrana lisossomal, despolarização da membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, alteração no nível de cálcio intracelular e exposição de fosfatidilserina.
 - A associação da biomolécula ácido anacárdico (AA) e do quimioterápico docetaxel (DTX) a PeNE foi realizada com sucesso.
- As características das formulações corroboram com as de nanoemulsão citadas na literatura (PeNE: $164,8 \pm 6,1$ nm, $PdI= 0,269 \pm 0,015$, potencial zeta: $-19,2 \pm 0,9$ / PAA: $164,8 \pm 0,7$ nm, $PdI= 0,272 \pm 0,019$, potencial zeta= $-23,7 \pm 0,4$ / PDTX: $146,6 \pm 3,4$, $PdI= 0,257 \pm 0,030$, potencial zeta= $-20,3 \pm 1,6$). As 3 formulações apresentaram pH neutro.
- As formulações apresentaram estabilidade quando armazenadas a 4°C , protegidas da luz, por até 60 dias (tempo máximo avaliado).
- PDTX demonstrou sinergismo quando comparado com DTX e PeNE livres; PAA apresentou efeito aditivo quando comparado com AA e PeNE livres, em células de câncer de mama 4T1, *in vitro*.
- A combinação AA+DTX apresentou efeito antagônico, *in vitro*
- PAA+PDTX foi o tratamento mais promissor com efeito aditivo, *in vitro*. Apresentou alteração da morfologia celular e níveis de cálcio intracelular, induziu permeabilidade da membrana lisossomal, despolarização da membrana mitocondrial, exposição de fosfatidilserina, ativação de caspases, produção de ROS, fragmentação de DNA e diminuiu a proliferação celular.

- Nos experimentos em modelo *in vivo* de câncer de mama de camundongo ortotópico com metástase espontânea (4T1):

- apenas os grupos contendo DTX apresentaram redução significativa do volume tumoral associados a um restabelecimento dos parâmetros sanguíneos, particularmente o leucograma, atingindo valores semelhantes aos de animais sadios;
- Nenhum dos tratamentos induziu toxicidade expressivas nos rins e no fígado;
- O tratamento considerado mais promissor, ou seja, que apresentou maior redução no volume tumoral e nenhuma metástase, foi a associação do DTX e AA livres

Por fim, este estudo demonstra a importância na valorização da biodiversidade brasileira através o uso sustentável dos biomas como na bioeconomia.

Referência da introdução

AL-HAZZANI, A., PERIYASAMY, V., SUBASH-BABU, P. and ALSHATWI, A.A. Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Medicinal Chemistry Research*, 21(7), pp.1384–1388, 2012.

AL-LAZIKANI, B., BANERJI, U. and WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*, 30(7), pp.679–692, 2012.

ANUCHAPREEDA, S., FUKUMORI, Y., OKONOJI, S., and ICHIKAWA, H., 2011. Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy. *J. Nanotechnol.*, article ID 270383, 11 pages, 2012.

BARREIRO, E.J. and FRAGA, C.A.M. Química medicinal, as bases moleculares da ação dos fármacos. 3^o edição. Artmed Editora S.A, 2015.

COLOMBO, N.B.R.; PARRA, E.R.; GRISOLIA, C.K.; GELAIN, D.P.; HAGE, M.; SCHNORR, C.E.; KOLLING, E.; BARBEIRO, D.F. and CAPELOZZI, V.L. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb) pulp oil, a natural source of antioxidants, reduce the oxidative stress status and DNA damage in experimental lung cancer. *Journal of thoracic oncology*, v.7, n.7, p.S113-S113, 2012.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil) disponível em: <http://www.inca.gov.br>, acessado em dezembro de 2020.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 5, 161–171, 2005.

GANTA, S., SINGH, A., RAWAL, Y., CACACCIO, J., PATEL, N.R., KULKARNI, P., FERRIS, C.F., AMIJI, M.M. and COLEMAN, T.P. Formulation development of a novel targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Drug delivery*, 7544, pp.1–13, 2014.

HEJAZI, E., NASROLLAHZADEH, J., FATEMI, R., MOHAMADI, L.B.Y., SALIMINEJAD, K., AMIRI, Z., KIMIAGAR, M., HOUSHYARI, M., TAVAKOLI, M. and IDALI, F. Effects of Combined Soy Isoflavone Extract and Docetaxel Treatment on Murine 4T1 Breast Tumor Model. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 7(1), 2015.

HEMSHEKHAR, M., SANTHOSH, M.S., KEMPARAJU, K. and GIRISH, K.S. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110(2), pp.122–132, 2011.

KANG, J., PARK, J.H., LEE, H.J., JO, U., PARK, J.K., SEO, J.H., KIM, Y.H. and PARK, K.H. Caveolin-1 Modulates Docetaxel-Induced Cell Death in Breast Cancer Cell Subtypes through Different Mechanisms. *Cancer Res Treat*, pp.1–12, 2015.

LI, J., YOU, J., SI, W., ZHU, Y., CHEN, Y., YANG, B., HAN, C., LINGHU, R., ZHANG, X., JIAO, S. and YANG, J. Docetaxel/S-1 Versus Docetaxel/Capecitabine as First-Line Treatment for Advanced Breast Cancer. *Medicine*, 94(41), p.e1340, 2015.

MATEUSZ, L.; LIPKA, D., FILIPCZAK, N., PIWONI, A. and ARKADIUSZ KOZUBEK, J.G. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines – in vitro studies. *International journal of Nanomedicine*, 9, pp.653–668, 2014.

MLOWE, S.S., PULLABHOTLA, R.R., MUBOFU, E.E., NGASSAPA, F.F. and REVAPRASADU, N.N. Low temperature synthesis of anacardic-acid-capped cadmium chalcogenide nanoparticles. *International Nano Letters*, pp.DOI 10.1007/s40089-014-0106-7, 2014.

NIH (Nacional Institutes Health) disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032676/> acessado em dezembro de 2020.

PARVEEN, S., MISRA, R., and SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 147-166, 2012.

ROCHA, C. O., ARAUJO, V. H. S., SILVA, L. R. A., SILVA, L. P., AZEVEDO, R. B., JOANITTI, G. A. Efeitos de óleos de frutos do Cerrado, na forma livre ou nanoestruturada, em células de câncer de mama, *in vitro*. In: 20º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 11º Congresso de Iniciação Científica do DF, 03 a 06 de novembro de 2014, Brasília, DF, Brasil. 2014

SANCHEZ-BARCELO, E.J., MEDIAVILLA, M.D., ALONSO-GONZALEZ, C. and REITER, R.J. Melatonin uses in oncology: breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. *Expert opinion on investigational drugs*, 21(6), pp.819-31, 2012.

SCHULTZ, D.J., WICKRAMASINGHE, N.S., IVANOVA, M.M., ISAACS, S.M., DOUGHERTY, S.M., IMBERT-FERNANDEZ, Y., CUNNINGHAM, A.R., CHEN, C. and KLINGE, C.M. Anacardic Acid Inhibits Estrogen Receptor -DNA Binding and Reduces Target Gene Transcription and Breast Cancer Cell Proliferation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(3), pp.594-605, 2010.

SEONG, Y.-A., SHIN, P.-G. and KIM, G.-D. Anacardic acid induces mitochondrial-mediated apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma cells. *International journal of oncology*, 42(3), pp.1045-51, 2013.

SILVA, L.R.A.; ARAÚJO, V.H.S.; COSTA, P.L.; CÂMARA, A.L.S.; SAMPAIO, M.C.; AZEVEDO, R.B. and JOANITTI, G.A. Effects of Pequi oil nanoemulsions on the morphology and proliferation pattern of breast cancer cells. In: Goiania Breast Cancer Symposium, 14 a 16 de maio de 2015, Goiania, GO, Brasil. 2015.

TAN, Q., LIU, X., FU, X., LI, Q., DOU, J. and ZHAI, G. Current development in nanoformulations of docetaxel. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(8), pp.975-990, 2012.

XIU, Y.-L., ZHAO, Y., GOU, W.F., CHEN, S., TAKANO, Y. and ZHENG, H.C. Anacardic Acid Enhances the Proliferation of Human Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(6), p.e99361, 2014.

WILLI, P., SHELMAN, R. and SHARMA, C.P. Alginate Encapsulated Anacardic acid-Chitosana self aggregated nanoparticles for intestinal delivery of protein drugs. *Journal of Nanopharmaceutics and Drugs Delivery*, volume 1, number 1, pp.82-91 (10), 2013.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. *World Health Organization*, p.176, 2014.

Referência do referencial teórico

- Amaral, L. F.; Moriel, P.; Foglio, M. A.; Mazzola, P. G. Caryocar brasiliense supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. *BMC complementary and alternative medicine*, v.14, n.1, p.73, 2014.
- Afzal, Syed Muzammil, Mohammad Zubair Shareef, and Veerabrahma Kishan. 2016. "Transferrin Tagged Lipid Nanoemulsion of Docetaxel for Enhanced Tumor Targeting." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 36: 175–82. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.008>.
- Al-Hazzani, Amal, Vaiyapuri Periyasamy, Pandurangan Subash-Babu, and Ali A. Alshatwi. 2012. "Formulation of Cashew Nut Shell Liquid (CSNL) Nanoemulsion, a Potent Inhibitor of Human MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation." *Medicinal Chemistry Research* 21 (7): 1384–88. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9657-6>.
- "Al Lazikani Combinatorial Drug.Pdf." n.d.
- Amaral, Ricardo Guimarães, Sara Albuquerque dos Santos, Luciana Nalone Andrade, Patrícia Severino, and Adriana Andrade Carvalho. 2019. "Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision." *Clinics in Oncology* 4 (1562): 1–5.
- Ankur Gupta, H. Burak Eral, T. Alan Hatton and Patrick S. Doyle. 2016. "Nanoemulsions: Formation, Properties and Applications."
- Antonio Luiz Gomes Júnior, Muhammad Torequl Islam, Lucas Antonio Duarte Nicolau, Luan Kevin Miranda de Souza, Tiago de Souza Lopes Araújo, Guilherme Antônio Lopes de Oliveira, Kerolayne de Melo Nogueira, Luciano da Silva Lopes, Jand-Venes Rolim Medeiros, Mohammad S Mubarak and Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante. 2020. "Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Properties of Anacardic Acid in Experimental Models."
- Bayda, Samer, Muhammad Adeel, Tiziano Tuccinardi, Marco Cordani, and Flavio Rizzolio. 2020. "The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine." *Molecules* 25 (1): 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.
- Bhatia, Karanpreet, Bhumika, and Asmita Das. 2020. "Combinatorial Drug Therapy in Cancer - New Insights." *Life Sciences* 258 (July): 118134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118134>.
- Conab, B. Sociobiodiversidade, v. 3, n. 4, p. 1-66, ut. / nov. / dez. 2019
- Colombo, N. B.R., M. P. Rangel, V. Martins, M. Hage, D. P. Gelain, D. F. Barbeiro, C. K. Grisolia, E. R. Parra, and V. L. Capelozzi. 2015. "Caryocar Brasiliense Camb Protects against Genomic and Oxidative Damage in Urethane-Induced Lung Carcinogenesis." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 48 (9): 852–62. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20154467>.
- Drexler, K Eric. 1981. "Molecular Engineering: An Approach to the Development of General Capabilities for Molecular Manipulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (9): 5275–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5275>.
- Harbeck, Nadia, Frédérique Penault-Llorca, Javier Cortes, Michael Gnant, Nehmat Houssami, Philip Poortmans, Kathryn Ruddy, Janice Tsang, and Fatima Cardoso. 2019. *Breast Cancer*.

Nature Reviews Disease Primers. Vol. 5. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>.

- Harwansh, Ranjit K., Rohitas Deshmukh, and Md Akhlaquer Rahman. 2019. "Nanoemulsion: Promising Nanocarrier System for Delivery of Herbal Bioactives." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51 (January): 224–33. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.006>.
- Herbst, Roy S., and Fadlo R. Khuri. 2003. "Mode of Action of Docetaxel - A Basis for Combination with Novel Anticancer Agents." *Cancer Treatment Reviews* 29 (5): 407–15. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00097-5).
- Jain, Vikas, Hitesh Kumar, Haritha V. Anod, Pallavi Chand, N. Vishal Gupta, Surajit Dey, and Siddharth S. Kesharwani. 2020. "A Review of Nanotechnology-Based Approaches for Breast Cancer and Triple-Negative Breast Cancer." *Journal of Controlled Release* 326 (July): 628–47. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.003>.
- Jorge, Armando, Maicon Matos Leitao, Laura Priscila Toledo Bernal, Elisangela dos Santos, Angela Midori Kuraoka-Oliveira, Priscila Justi, Eliana Argandona, and Candida Aparecida Leite Kassuya. 2019. "Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Caryocar Brasiliense." *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* 18 (April). <https://doi.org/10.2174/1871523018666190408144320>.
- Juríková, Miroslava, Ľudovít Danihel, Štefan Polák, and Ivan Varga. 2016. "Ki67, PCNA, and MCM Proteins: Markers of Proliferation in the Diagnosis of Breast Cancer." *Acta Histochemica* 118 (5): 544–52. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>.
- Kapoor, Pooja Middha, Sara Lindström, Sabine Behrens, Xiaoliang Wang, Kyriaki Michailidou, Manjeet K. Bolla, Qin Wang, et al. 2020. "Assessment of Interactions between 205 Breast Cancer Susceptibility Loci and 13 Established Risk Factors in Relation to Breast Cancer Risk, in the Breast Cancer Association Consortium." *International Journal of Epidemiology* 49 (1): 216–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz193>.
- Klang, V., and C. Valenta. 2011. "Lecithin-Based Nanoemulsions." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 21 (1): 55–76. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1).
- Kumar, Manish, Ram Singh Bishnoi, Ajay Kumar Shukla, and Chandra Prakash Jain. 2019. "Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review." *Preventive Nutrition and Food Science* 24 (3): 225–34. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>.
- Kushwah, Varun, Devesh Kumar Jain, Ashish Kumar Agrawal, and Sanyog Jain. 2018. "Improved Antitumor Efficacy and Reduced Toxicity of Docetaxel Using Anacardic Acid Functionalized Stealth Liposomes." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 172 (December): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.047>.
- Kushwah, Varun, Sameer S. Katiyar, Chander Parkash Dora, Ashish Kumar Agrawal, Dimitrios A. Lamprou, Ramesh C. Gupta, and Sanyog Jain. 2018. "Co-Delivery of Docetaxel and Gemcitabine by Anacardic Acid Modified Self-Assembled Albumin Nanoparticles for Effective Breast Cancer Management." *Acta Biomaterialia* 73: 424–36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.057>.
- McClements, David Julian, and Seid Mahdi Jafari. 2018. *General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>.
- Meulendijks, Didier, Laurens V. Beerepoot, Henk Boot, Jan Willem B. De Groot, Maartje Los,

- James E. Boers, Steven A.L.W. Vanhoutvin, et al. 2016. "Trastuzumab and Bevacizumab Combined with Docetaxel, Oxaliplatin and Capecitabine as First-Line Treatment of Advanced HER2-Positive Gastric Cancer: A Multicenter Phase II Study." *Investigational New Drugs* 34 (1): 119–28. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0309-4>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Cesar K. Grisolia, João Paulo F. Longo, Raphael C.A. Peixoto, Marcos Célio de Almeida, Lilian Carla P. Barbosa, Mariana M. Roll, et al. 2014. "Oil Rich in Carotenoids Instead of Vitamins C and E as a Better Option to Reduce Doxorubicin-Induced Damage to Normal Cells of Ehrlich Tumor-Bearing Mice: Hematological, Toxicological and Histopathological Evaluations." *Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (11): 1161–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005>.
- Miranda-Vilela, Ana Luisa, Flávia A. Portilho, Vitor G.B. De Araujo, Luciana L.C. Estevanato, Bélin P. Mezzomo, Maria de Fátima M. De Almeida Santos, and Zulmira G.M. Lacava. 2011. "The Protective Effects of Nutritional Antioxidant Therapy on Ehrlich Solid Tumor-Bearing Mice Depend on the Type of Antioxidant Therapy Chosen: Histology, Genotoxicity and Hematology Evaluations." *Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (11): 1091–98. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.09.009>.
- Moghimi, S. M., and D. Simberg. 2018. "Nanoparticle Transport Pathways into Tumors." *Journal of Nanoparticle Research* 20 (6): 18–21. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4273-8>.
- Mokhtari, Reza Bayat, Tina S Homayouni, Narges Baluch, Evgeniya Morgatskaya, Sushil Kumar, Bikul Das, and Herman Yeger. 2017. "Combination Therapy in Combating Cancer SYSTEMATIC REVIEW: COMBINATION THERAPY IN COMBATING CANCER BACKGROUND." *Oncotarget* 8 (23): 38022–43. www.impactjournals.com/oncotarget.
- Monge-Fuentes, Victoria, Luis Alexandre Muehlmann, João Paulo Figueiró Longo, Jaqueline Rodrigues Silva, Maria Luiza Fascineli, Ricardo Bentes Azevedo, Paulo de Souza, et al. 2017. "Photodynamic Therapy Mediated by Acai Oil (Euterpe Oleracea Martius) in Nanoemulsion: A Potential Treatment for Melanoma." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 166: 301–10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.002>.
- Morais, Selene M., Katherine A. Silva, Halisson Araujo, Icaro G.P. Vieira, Daniela R. Alves, Raquel O.S. Fontenelle, and Artur M.S. Silva. 2017. "Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities." *Pharmaceuticals* 10 (1): 1–10. <https://doi.org/10.3390/ph10010031>.
- Mubofu, Fatma B. Hamad 1 and Egid B. 2015. "Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives." <https://doi.org/10.3390/ijms16048569>.
- na C. Garrido-Castro , Nancy U. Lin, and Kornelia Polyak. 2019. "Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment." <https://doi.org/158/2159-8290.CD-1>.
- Nascimento-Silva, Nara Rubia Rodrigues Do, and Maria Margareth Veloso Naves. 2019. "Potential of Whole Pequi (Caryocar Spp.) Fruit-Pulp, Almond, Oil, and Shell-as a Medicinal Food." *Journal of Medicinal Food* 22 (9): 952–62. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0149>.
- Oliveira, Paula a., Aura Colaço, Raquel Chaves, Henrique Guedes-Pinto, Luis F. De-La-Cruz P., and Carlos Lopes. 2007. "Chemical Carcinogenesis." *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 79 (4): 593–616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>.
- Palmeira, Simone M., Paula R.P. Silva, Juliana S.P. Ferrão, Aliny A.B.L. Ladd, Maria L.Z. Dagli,

- Cesar K. Grisolia, and Francisco J. Hernandez-Blazquez. 2016. "Chemopreventive Effects of Pequi Oil (*Caryocar Brasiliense* Camb.) on Preneoplastic Lesions in a Mouse Model of Hepatocarcinogenesis." *European Journal of Cancer Prevention* 25 (4): 299–305. <https://doi.org/10.1097/CEJ.000000000000187>.
- Park, M.; Upton, D.; Blackmon.; Dixon, V.; Craver, S.; Neal, D. and Perkins, D. n.d. "Park et Al., 2018 AA Pancreatic Cancer.Pdf."
- Praveen Kumar, Gannu. 2015. "Nanoemulsion Based Targeting in Cancer Therapeutics." *Medicinal Chemistry* 5 (6): 272–84. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000275>.
- Roll, Mariana Matos, Ana Luisa Miranda-Vilela, João Paulo Figueiró Longo, Tania da Silveira Agostini-Costa, and Cesar Koppe Grisolia. 2018. "The Pequi Pulp Oil (*Caryocar Brasiliense* Camb.) Provides Protection against Aging-Related Anemia, Inflammation and Oxidative Stress in Swiss Mice, Especially in Females." *Genetics and Molecular Biology* 41 (4): 858–69. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>.
- Rudolph, Anja, Minsun Song, Mark N. Brook, Roger L. Milne, Nasim Mavaddat, Kyriaki Michailidou, Manjeet K. Bolla, et al. 2018. "Joint Associations of a Polygenic Risk Score and Environmental Risk Factors for Breast Cancer in the Breast Cancer Association Consortium." *International Journal of Epidemiology* 47 (2): 526–36. <https://doi.org/10.1093/IJE/DYX242>.
- Sánchez-López, Elena, Mariana Guerra, João Dias-Ferreira, Ana Lopez-Machado, Miren Ettcheto, Amanda Cano, Marta Espina, Antoni Camins, Maria Luisa Garcia, and Eliana B. Souto. 2019. "Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics." *Nanomaterials* 9 (6). <https://doi.org/10.3390/nano9060821>.
- Seong, Yeong Ae, Pyung Gyun Shin, Jin Soo Yoon, Anandam Kasin Yadunandam, and Gun Do Kim. 2014. "Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Human Lung Carcinoma A549 Cells by Anacardic Acid." *Cell Biochemistry and Biophysics* 68 (2): 369–77. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9717-2>.
- Silva, Gabriela Torres, Carolina Di, Pietro Fernandes, Priscila Aiko Hiane, Karine De C, Priscila Silva Figueiredo, Aline Carla Inada, et al. 2020. "LDL-c , and Non-HDL-c in Animals."
- Sindhvani, Shrey, Abdullah Muhammad Syed, Jessica Ngai, Benjamin R. Kingston, Laura Maiorino, Jeremy Rothschild, Presley MacMillan, et al. 2020. "The Entry of Nanoparticles into Solid Tumours." *Nature Materials* 19 (5): 566–75. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- Tan, Jing, Jiang Xianzhen, Guangming Yin, Leye He, Jianye Liu, Long Zhi, Jiang Zhiqiang, and Kun Yao. 2017. "Anacardic Acid Induces Cell Apoptosis of Prostatic Cancer through Autophagy by ER Stress/DAPK3/Akt Signaling Pathway." *Oncology Reports* 38 (3): 1373–82. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5841>.
- Tayeb, Hossam H., and Frank Sainsbury. 2018. "Nanoemulsions in Drug Delivery: Formulation to Medical Application." *Nanomedicine* 13 (19): 2507–25. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0088>.
- Traesel, Giseli Karenina, Flavio Henrique Souza De Araújo, Luis Henrique Almeida Castro, Fernando Freitas De Lima, Sara Emilia Lima Tolouei Menegati, Priscilla Narciso Justi, Candida Aparecida Leite Kassuya, Claudia Andrea Lima Cardoso, Eliana Janet Sanjinez Argandoña, and Silvia Aparecida Oesterreich. 2017. "Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects." *Journal of Medicinal Food* 20 (8): 804–11.

<https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0021>.

- Ullah, Rahat, Junaid Wazir, Farhan Ullah Khan, Maladho Tanta Diallo, Awais Ullah Ihsan, Reyaj Mikrani, Md Aquib, and Xiaohui Zhou. 2020. "Factors Influencing the Delivery Efficiency of Cancer Nanomedicines." *AAPS PharmSciTech* 21 (4). <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01691-3>.
- Vale, A. F., H. H. Ferreira, E. J. Benetti, A. C.S. Rebelo, A. C.R. Figueiredo, E. C. Barbosa, and K. Simões. 2019. "Antioxidant Effect of the Pequi Oil (*Caryocar Brasiliense*) on the Hepatic Tissue of Rats Trained by Exhaustive Swimming Exercises." *Brazilian Journal of Biology* 79 (2): 257–62. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.180015>.
- Verma, Prerna, Jaya Gopal Meher, Shalini Asthana, Vivek K. Pawar, Mohini Chaurasia, and Manish K. Chourasia. 2016. "Perspectives of Nanoemulsion Assisted Oral Delivery of Docetaxel for Improved Chemotherapy of Cancer." *Drug Delivery* 23 (2): 479–88. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.920430>.
- Wang, Lulu. 2017. "Early Diagnosis of Breast Cancer." *Sensors (Switzerland)* 17 (7). <https://doi.org/10.3390/s17071572>.
- Weinberg, Douglas, Hanahan. 2017. "Biology Hallmarks of Cancer." *Holland-Frei Cancer Medicine* 01 (June): 1–4. <https://doi.org/10.1002/9781119000822.hfcm002>.
- Wilhelm, Stefan, Anthony J Tavares, Qin Dai, Seiichi Ohta, Julie Audet, Harold F Dvorak, and Warren C W Chan. n.d. "Analysis of Nanoparticle Delivery to Tumours." Vol. 1, *Nature Reviews Materials*. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Jan 12]. p. 16014. Available from: <http://www.nature.com/articles/natrevmats201614>
- Zhao, Qing, Xiaofeng Zhang, Haifeng Cai, Pei Zhang, Dong Kong, Xiaosong Ge, Min Du, Rong Liang, and Wenxia Dong. 2018. "Anticancer Effects of Plant Derived Anacardic Acid on Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells." *American Journal of Translational Research* 10 (8): 2424–34.

ANEXO I. Declaração de aprovação do comitê de ética.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 16 de abril de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO E DOCETAXEL EM NANOEMULSÃO À BASE DE ÓLEO DE PEQUI COMO TERAPIA COMBINATÓRIA CONTRA O CÂNCER DE MAMA IN VITRO E IN VIVO." Protocolo n.º 88/2018, sob responsabilidade da Professora GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (72 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de: 10/03/2018 a 20/12/2021.

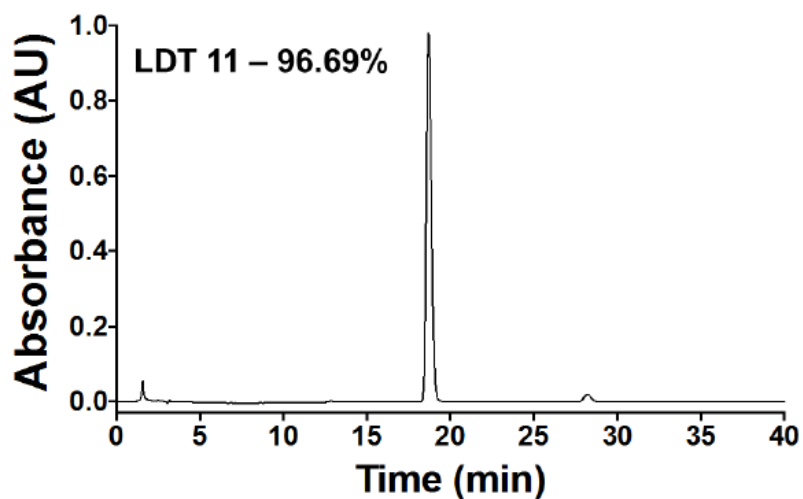
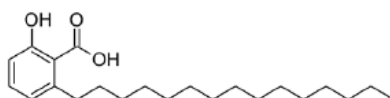
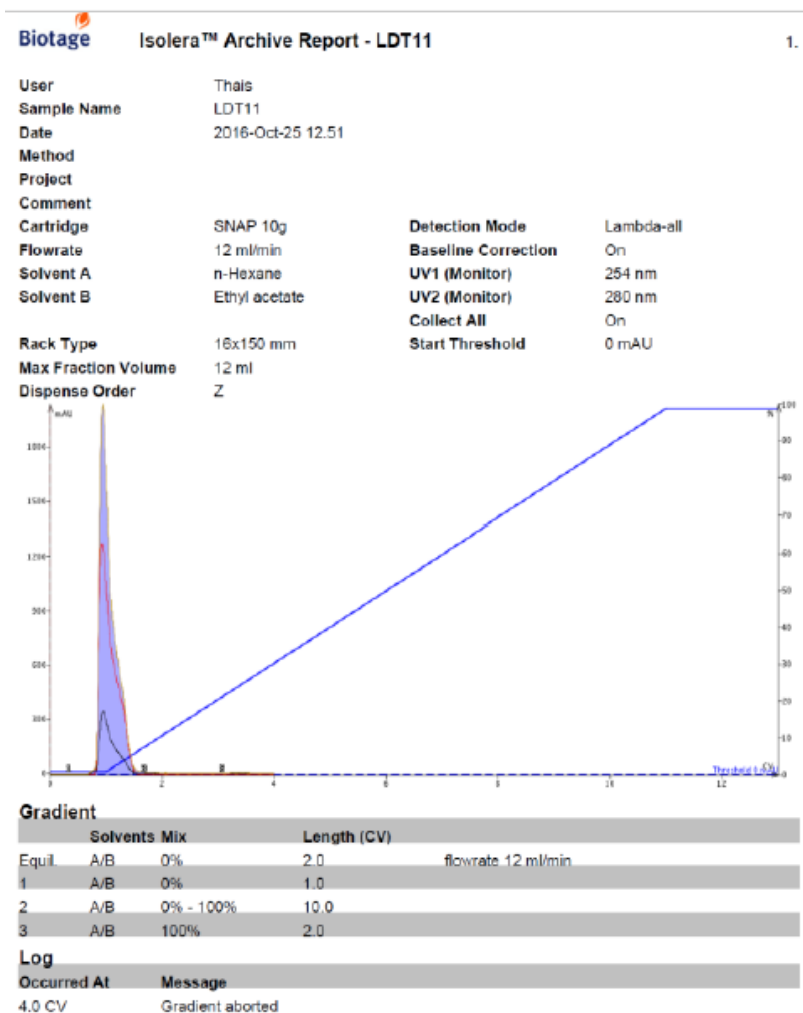


Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO II. Característica do ácido anacárdico sintetizado.



ANEXO III. Produção científica durante o doutorado (2016-2020)

- 1- **Ombredane, Alicia S.**, Victor H.S. Araujo, Clarissa O. Borges, Patrícia L. Costa, Marcela G. Landim, Andréia C. Pinheiro, Ísis O. Szlachetka, et al. 2020. “Nanoemulsion-Based Systems as a Promising Approach for Enhancing the Antitumoral Activity of Pequi Oil (*Caryocar Brasilense* Cambess.) in Breast Cancer Cells.” *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 58 (May): 101819. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101819>.
- 2- Elida C. G. da Mata, **Alicia Ombredane, Graziella A. Joanitti**, L. I. B. Kanzaki, Elisabeth F. Schwartz. Antiretroviral and cytotoxic activities of *Tityus obscurus* synthetic peptide. *Arch Pharm.* 2020;e2000151. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000151>
- 3- Janaina Moreira Coelho, Nichollas Serafim Camargo, Rayane Ganassin, Márcia Cristina Oliveira Rocha, Carolin Merker, Julia Böttner, Irina Estrela-Lopis, Karen Rapp Py-Daniel, Katiúscia Vieira Jardim, Marcelo Henrique Sousa, **Alicia Simalie Ombredane, Graziella Anselmo Joanitti**, Renata Carvalho Silva, Ricardo Bentes Azevedo², João Paulo Figueiró Longo², Luis Alexandre Muehlmann. **Oily core/amphiphilic polymer shell nanocapsules change the intracellular fate of doxorubicin in breast cancer cells.** *J Mater Chem B* **2019** Oct 23;7(41):6390-6398.
- 4- Eder Alves Barbosa, Ana Oliveira, Alexandra Plácido, Renato Socodato, Camila C. Portugal, Ana Carolina Mafud, **Alicia S. Ombredane**, Daniel C. Moreira, Nuno Vale, Lucinda J. Bessak, **Graziella A. Joanitti**, Cláudia Alves, Paula Gomes, Cristina Delerue-Matos, Yvonne Primerano Mascarenhas, Mariela M. Marani, João B. Relvas, Manuela Pintado, José Roberto S.A. Leite. **Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs.** *Free Radical Biology and Medicine* 115 (2018) 68–79.
- 5- Raimunda C. dos Santos, **Alicia S. Ombredane**, Jéssica Maria T. Souza, Andreanne G. Vasconcelos, Alexandra Plácido, Adriany das G.N. Amorim, Eder Alves Barbosa, Filipe C.D.A. Lima, Cristina D. Ropke, Michel M.M. Alves, Daniel D.R. Arcanjoh, Fernando A.A. Carvalhoh, Cristina Delerue-Matosc, **Graziella A. Joanitti**, José Roberto de S.A. Leite. Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway. *Food Research International* 105 (2018) 184–196.
- 6- B. C. P. Coelho, E. R. Siqueira, **A. S. Ombredane, G. A. Joanitti**, S. B. Chaves, S. W. da Silva, J. A. Chaker, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo, P. C. Morais and M. H. Sousa. **Maghemite–gold core–shell nanostructures (g-Fe₂O₃@Au) surface-functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy.** *RSC Adv.*, **2017**, 7, 11223–11232.
- 7- Rayane Ganassin, Carolin Merker, Mosar Corrêa Rodrigues, Nayara Felipe Guimarães, Carine Sampaio Cerqueira Sodré, Queila da Silva Ferreira, Sebastião William

da Silva, **Alicia Simalie Ombredane, Graziella Anselmo Joanitti**, Karen Rapp Py-Daniel, Juan Zhang, Cheng-Shi Jiang, Paulo César de Moraes, Ewa Mosiniewicz-Szablewska, Piotr Suchocki, João Paulo Figueiró Longo, Jan Meijer, Irina Estrela-Lopis, Ricardo Bentes de Azevedo & Luis Alexandre Muehlmann (2017): **Nanocapsules for the co-delivery of selol and doxorubicin to breast adenocarcinoma 4T1 cells in vitro**, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, DOI:10.1080/21691401.2017.1408020

8- Patrick V. Quelemes, Alyne R. de Araújo, Alexandra Plácido, Cristina Delerue-Matos, Jeanny S. Maciel, Lucinda J. Bessa, **Alicia S. Ombredane, Graziella A. Joanitti**, Maria José dos S. Soares, Peter Eatona, Durcilen, A. da Silva, José Roberto S.A. Leite. **Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications**. *Carbohydrate Polymers* 157 (2017) 567–575

9- Yuri Campelo, **Alicia Ombredane**, Andreanne G. Vasconcelos, Lucas Albuquerque, Daniel C. Moreira, Alexandra Plácido, Jefferson Rocha, Harold Hilarion Fokoue 8, Lydia Yamaguchi, Ana Mafud, Yvonne P. Mascarenhas, Cristina Delerue-Matos, Tatiana Borges, **Graziella A. Joanitti**, Daniel D. R. Arcanjo, Massuo J. Kato, Selma A. S. Kuckelhaus, Marcos P. N. Silva, Josué de Moraes and José Roberto S. A. Leite. **Structure–Activity Relationship of Piplartine and Synthetic Analogues against Schistosoma mansoni and Cytotoxicity to Mammalian Cells**. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1802; doi:10.3390/ijms19061802.

Capítulo de livro aceito para publicação:

Pelo presente instrumento, a EDITORA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 00.038.174/0004-96, com sede no SCS, Quadra 2, bloco C, no 78, Edifício OK, em Brasília-DF, representada por sua diretora, GERMANA HENRIQUES PEREIRA, no uso de sua competência delegada por meio do AR nº 00691/2016 e doravante denominada simplesmente EDITORA lavra o presente termo de publicação da obra **“NANOTECNOLOGIA: CONSIDERAÇÕES EM MATERIAIS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE”** doravante denominada simplesmente OBRA.

Declara-se, para os devidos fins, que a publicação da OBRA foi aprovada pelo Conselho Editorial da Editora Universidade de Brasília, em reunião realizada no dia 7 de novembro de 2018.

PARTE II: APLICAÇÕES EM SAÚDE - *Aplicações da nanotecnologia em câncer* Marcela Landim, **Alicia S. Ombredane, Graziella A. Joanitti**

Artigo aceito para publicação

Alicia S. Ombredane, Laise Rodrigues de Andrade, Raphael Severino Bonadio, Willie Oliveira Pinheiro, Ricardo Bentes de Azevedo, Graziella Anselmo Joanitti. **Melittin sensitizes non-melanoma skin cancer cells to 5-fluorouracil by affecting cell proliferation and survival**, *Experimental Dermatology*.

Artigo submetido

Alicia S. Ombredane, Vitória R. P. Silva, Laise Rodrigues de Andrade, Willie Oliveira Pinheiro, Mayara Simonelly, Jaqueline Vaz de Oliveira, Andréia C. Pinheiro, Gabriel Fernandes Gonçalves, Gisela de Jesus Felice, Mônica Pereira Garcia, Patrícia Mazureki Campos, Glécia Virgolino da Silva Luz, Graziella A. Joanitti: **Efficacy and toxicity of curcumin nanoparticles on breast cancer treatment, *in vivo*: a systematic review.**

Submetido na revista *Frontiers in Oncology*, section Cancer Molecular Targets and Therapeutics.