



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DA CEILÂNDIA**

ANÁLISE DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E EFEITOS ANTITUMORAIS DE  
NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE  
BRASILEIRA ASSOCIADAS AO RESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
PELE NÃO MELANOMA

**LUCAS CAMPOS DA SILVA**

CEILÂNDIA-DF  
MAR/2020

LUCAS CAMPOS DA SILVA

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E EFEITOS ANTITUMORAIS DE  
NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE  
BRASILEIRA ASSOCIADAS AO RESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
PELE NÃO MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziella Anselmo Joanitti

CELÂNDIA-DF

MAR/2020

LUCAS CAMPOS DA SILVA

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E EFEITOS ANTITUMORAIS DE  
NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE  
BRASILEIRA ASSOCIADAS AO RESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE  
PELE NÃO MELANOMA**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziella Anselmo Joanitti**

Presidente

**Prof Dr. Diêgo Madureira de Oliveira**

Examinador

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laise Rodrigues de Andrade**

Examinadora

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilia de Freitas Calmon**

Examinadora Suplente

Silva, Lucas Campos da

SS586a

ANÁLISE DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E EFEITOS ANTITUMORAIS DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA ASSOCIADAS AO RESVERATROL EM CÉLULAS DE CÂNCER DE

PELE NÃO MELANOMA / Lucas Campos da Silva; orientador Graziella Anselmo Joanitti. -- Brasília, 2020.

71 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Nanoemulsão. 2. Oxidação. 3. Óleos naturais. 4. Câncer de pele não melanoma. 5. Resveratrol. I. Joanitti,

Graziella Anselmo , orient. II. Título.



## RESUMO

O câncer de pele é o tipo de câncer mais prevalente no Brasil, correspondendo a 25% das neoplasias em território nacional. Seu subtipo não melanoma é mais frequente e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país. As nanoemulsões são nanocarreadores promissores no tratamento de doenças como o câncer, devido as suas características transportadoras de compostos, permitindo o nanoencapsulamento de moléculas bioativas, reduzindo sua toxicidade e aumentando sua biodisponibilidade. Porém, assim como todo lipídio, a fase oleosa das nanoemulsões pode sofrer oxidações se exposta à luz ou a variações muito altas de temperatura. Desse modo, seu processo de armazenamento adequado (luz e temperatura) é fundamental para a sua qualidade. Muitos produtos naturais, como óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) e andiroba (*Carapa guianensis*) são utilizados como agentes quimioprotetores de combate aos cânceres devido seus componentes bioativos. O resveratrol (RES) é um polifenol proveniente da casca de uvas que demonstra efeitos biológicos antitumorais bem descritos. A nanoencapsulação e combinação de compostos é uma alternativa plausível para potencializar seus efeitos biológicos. O objetivo deste trabalho é monitorar o processo oxidativo de nanoemulsões à base de óleo de buriti (BuNE) expostas à diferentes condições de armazenamento (exposição à luz e de temperatura) ao longo do tempo e avaliar os efeitos da associação do RES e do óleo de andiroba nanoestruturado (AnNE) em células de câncer de pele não melanoma A431. A nanoemulsão de buriti exposta à luz (BuNE Luz 25°C) foi a amostra que mais oxidou e alterou parâmetros como potencial zeta e pH. Amostra armazenada a 4°C no escuro se mostrou mais estável ao longo de 60 dias de análise, preservando melhor sua estabilidade coloidal e oxidativa. A AnNE e o RES demonstraram efeitos citotóxicos em células A431 de forma dose dependente. A combinação AnNE + RES apresentou o mesmo perfil de citotoxicidade em células A431 quando comparada aos tratamentos separados. Porém, a AnNE + RES protege células de queratinócitos não tumorais (HaCat) da citotoxicidade do RES. O presente estudo sugere que a combinação de AnNE e RES é uma promissora ferramenta de terapia adjuvante a ser melhor investigada visando sua aplicação futura em células de câncer de pele não-melanoma.

**Palavras-chave:** nanoemulsão, oxidação, óleo de buriti, câncer de pele não melanoma, resveratrol, óleo de andiroba.

## ABSTRACT

Skin cancer is the most prevalent type of cancer in Brazil, corresponding to 25% of cancers in the national territory. Its non-melanoma subtype is more frequent and corresponds to 30% of all malignant tumors registered in the country. Nanoemulsions are promising nanocarriers in the treatment of diseases such as cancer, due to their transporting characteristics of compounds, allowing the nanoencapsulation of bioactive molecules, reducing their toxicity, and increasing their bioavailability. However, like all lipids, the oil phase of nanoemulsions can undergo oxidation if exposed to light or very high temperature variations. Thus, its adequate storage process (light and temperature) is essential for its quality. Many natural products, such as buriti oil (*Mauritia flexuosa*) and andiroba (*Carapa guianensis*) are used as chemoprotective agents against cancer due to their bioactive components. Resveratrol (RES) is a polyphenol from grape skins that demonstrates well-described anti-tumor biological effects. Nanoencapsulation and combination of compounds is a plausible alternative to enhance its biological effects. The objective of this work is to monitor the oxidative process of nanoemulsions based on buriti oil (BuNE) exposed to different storage conditions (exposure to light and temperature) over time and to evaluate the effects of the combination of RES and nanostructured andiroba oil (AnNE) in A431 non-melanoma skin cancer cells. The buriti nanoemulsion exposed to light (BuNE Luz 25°C) was the sample that most oxidized and altered parameters such as zeta potential and pH. Sample stored at 4°C in the dark proved to be more stable over 60 days of analysis, better preserving its colloidal and oxidative stability. AnNE and RES demonstrated dose-dependent cytotoxic effects on A431 cells. Its AnNE + RES combination showed the same cytotoxicity in A431 cells profile when compared to separate treatments. However, AnNE + RES protects non-tumor keratinocyte (HaCat) cells from the cytotoxicity of RES. The present study suggests that the combination of AnNE and RES is a promising adjuvant therapeutic tool to be further investigated with a view to its future application in non-melanoma skin cancer cells.

**Keywords:** nanoemulsion, oxidation, buriti oil, non-melanoma skin cancer, resveratrol, andiroba oil.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A431** - Linhagem celular de câncer de pele não melanoma espinocelular humano

**AçNE** – Nanoemulsão com base de óleo de açaí

**AnNE** – Nanoemulsão com base de óleo de andiroba

**AnNE + RES** – Nanoemulsão com base de óleo de andiroba associada ao resveratrol

**ANOVA** – Análise de variância

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**B-** – Nanoemulsão “vazia” contendo apenas solvente aquoso e surfactante

**Br** – Nanoemulsão “vazia” contendo apenas solvente aquoso e surfactante

**BuNE** – nanoemulsão a base de óleo de Buriti

**CPNM** – Câncer de pele não melanoma

**CV** – Cristal violeta

**DLS** – Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

**EtOH** – Etanol

**EPR** – Efeito de permeabilidade e retenção

**FACS** – Citometria de fluxo

**Fe<sup>2+</sup>** – Ferro ferroso

**Fe<sup>3+</sup>** – Ferro férrico

**FOX** – Método xilenol orange

**HaCaT** – Queratinócitos humanos imortalizados

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer

**LA** – Laranja de acridina

**LED** – Diodo emissor de luz

**MTT** – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

**OL Aç** – óleo de açaí

**OL An** – óleo de andiroba

**OL Bu** – óleo de buriti

**PdI** – Índice de polidispersão

**PI** – Iodeto de propídeo

**pH** – Atividade do íon hidroxônio

**PV** – Valor de peróxido

**PZ** – Potencial zeta

**RES** – Resveratrol

**RNase** – Ribonuclease

**ROS** – “reactive oxygen species” – espécies reativas de oxigênio

**UnB** – Universidade de Brasília

**W** – Watts

**WHO** – World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados da variação do valor de pH de BuNE e B- armazenados em 3 condições diferentes (4°C, 25°C e Luz 25°C) .....	29
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Comparação do tamanho, forma, estabilidade, método de preparação e polidispersão de macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões ..... 4
- Figura 2. (A)** Palmeira do buriti (*Mauritia flexuosa*). **(B)** Fruto do buriti ..... 8
- Figura 3. (A)** Árvore da andiroba (*Carapa guianensis*). **(B)** Semente da andiroba. Fonte: Monografia da espécie *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba) ..... 9
- Figura 4.** Estrutura química do resveratrol ..... 11
- Figura 5.** Esquema experimental ..... 15
- Figura 6.** Avaliação da estabilidade de nanoformulações com (BuNE) ou sem (B-) óleo de buriti ao longo do tempo, armazenamento a 4°C, temperatura ambiente (25°C) e exposição à luz (25°C). Diâmetro hidrodinâmico **(A)**, índice de polidispersão **(B)** e potencial zeta **(C)** ..... 27
- Figura 7.** Perfil de oxidação (meq/Kg) de nanoemulsões de óleo de Buriti (BuNE) **(A)** e nanoestruturas em branco (sem fase oleosa) **(B)** armazenadas a 4°C, temperatura ambiente (25°C) e exposição à luz (Luz 25°C) ao longo do tempo ..... 30
- Figura 8.** Aspectos macroscópicos de nanoemulsões à base de óleo de Buriti (BuNE) armazenadas a 4°C, temperatura ambiente (25°C) e exposição à luz (Luz 25°C) ao longo de 60 dias ..... 33
- Figura 9.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de óleos naturais de açaí, andiroba e buriti e suas respectivas nanoemulsões e controles nos tempos de 24 e 48 horas ..... 35
- Figura 10.** Determinação do nível de oxidação (meq/Kg) das nanoemulsões (AçNE, BuNE, PeNE, AnNE), nanoestruturas em branco (sem fase oleosa) e seus óleos livres ..... 37
- Figura 11.** Efeito citotóxico do resveratrol em células A431. **(A)** Ensaio MTT de células A431 tratadas com resveratrol em diferentes concentrações durante 24 e 48h. **(B)** Ensaio de Cristal Violeta de células A431 tratadas com resveratrol em diferentes concentrações durante 24 e 48h ..... 39
- Figura 12.** Avaliação da estabilidade de nanoformulações a base de óleo de andiroba, com ou sem resveratrol (AnNE) ou sem óleo de andiroba (Branco) ao longo de 60 dias com armazenamento a 4°C. Foram avaliados parâmetros como diâmetro hidrodinâmico **(A)**, índice de polidispersão **(B)**, potencial zeta **(C)** e pH **(D)** ..... 41
- Figura 13.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (15 µM) por 24 e 48 h ..... 43
- Figura 14.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat) submetidas a tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (15 µM) por 24 e 48h ..... 45
- Figura 15.** Avaliação por Azul de tripan do número total de células de carcinoma epidermóide (A431) após exposição por 48 horas à nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol e os controles ..... 46

<b>Figura 16.</b> Avaliação da integridade da membrana plasmática de células de carcinoma epidermóide (A431) após exposição por 48 horas à nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol e os controles .....	47
<b>Figura 17.</b> Análise morfológica de células de carcinoma epidermóide não melanoma (A431). As células foram expostas aos tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	48
<b>Figura 18.</b> Representação da alteração de parâmetros de tamanho (FCS) e granularidade (SSC) a partir de dot plot e média geométrica das células A431 após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	50
<b>Figura 19.</b> Avaliação e representação do Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) a partir da média geométrica após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	51
<b>Figura 20.</b> Dot plot da avaliação de morte celular de células carcinoma epidermóide A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 48 horas de exposição a nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	53
<b>Figura 21.</b> Avaliação da morte celular em linhagem de carcinoma epidermóide A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo após exposição a AnNE, AnNE + RES e RES nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	54
<b>Figura 22.</b> Avaliação e representação da acidez de lisossomos a partir do aprisionamento de laranja de acridina por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	55
<b>Figura 23.</b> Avaliação e representação do nível de $Ca^{2+}$ intracelular, a partir da marcação com Fluo-4/AM por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol por 48 horas .....	57
<b>Figura 24.</b> Avaliação e representação de fragmentação de DNA, a partir da marcação com iodeto de propídeo por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	58
<b>Figura 25.</b> Avaliação do ciclo celular das células A431 por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com AnNE, AnNE + RES e RES nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol .....	59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.2 NANOTECNOLOGIA .....	1
1.2 NANOEMULSÕES .....	3
1.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	5
1.4 ÓLEOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA .....	7
<b>1.4.1 Buriti</b> .....	7
<b>1.4.2 Andiroba</b> .....	8
1.5 CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA .....	10
1.6 RESVERATROL .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA DERIVADOS AO RESVERATROL .....	16
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA .....	17
3.3 MONITORAMENTO DA OXIDAÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI .....	18
3.4 CULTIVO CELULAR .....	19
<b>3.4.1 Tripsinização das células</b> .....	19
<b>3.4.2 Plaqueamento das células</b> .....	20
3.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	20
<b>3.5.1 Ensaio de MTT</b> .....	20
<b>3.5.2 Ensaio de Cristal violeta (CV)</b> .....	21

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO (FACS) .....	21
<b>3.6.1 Avaliação da morte celular por marcação de Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI) .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6.2 Potencial da membrana mitocondrial e aspectos morfológicos das células .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6.3 Ensaio de fragmentação de DNA e ciclo celular .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6.4 Permeabilidade da membrana de lisossomos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6.5 Determinação do nível intracelular de Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>24</b>
3.7 AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	24
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
4.1 CARATERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI AO LONGO DO TEMPO .....	26
4.2 OXIDAÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI AO LONGO DO TEMPO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO .....	29
4.3 SCREENING DA CITOTOXICIDADE DE ÓLEOS NATURAIS E SUAS RESPECTIVAS NANOEMULSÕES EM CÉLULAS A431 .....	34
4.4 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE OXIDAÇÃO DE ÓLEOS NATURAIS E SUAS NANOEMULSÕES .....	37
4.5 DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DO RESVERATROL EM CÉLULAS A431 .....	38
4.6 ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE ANDIROBA ASSOCIADAS AO RESVERATROL NO TRATAMENTO DE CÉLULAS A431.....	40
4.7 CITOTOXICIDADE DA COMBINAÇÃO AnNE + RES EM A431 .....	42
4.8 CITOTOXICIDADE DA COMBINAÇÃO AnNE + RES EM HaCat .....	44
4.9 AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS A431 .....	46
4.10 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS A431 APÓS EXPOSIÇÃO A AnNE, AnNE + RES e RES .....	47
4.11 ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS) .....	49

4.11.1 Potencial De Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	50
4.11.2 Morfologia celular (tamanho e granularidade) .....	51
4.11.3 Análise da morte celular a partir da exposição da fosfatidilserina...52	
4.11.4 Permeabilidade da Membrana do Lisossomo .....	55
4.11.5 Níveis de $Ca^{2+}$ intracelular.....	56
4.11.6 Fragmentação de DNA .....	57
4.11.7 Ciclo celular .....	58
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma tecnologia conduzida e manipulada em escala nanométrica (1 a 100 nanômetros) aplicada em todos os campos da ciência. Por se tratar de tecnologia multidisciplinar, que consiste na área da física, química, biologia e medicina, o campo de aplicação da nanotecnologia é vasto, porém os grandes destaques estão na nanoeletrônica, nanobiotecnologia e nanomateriais (Cadioli & Salla, 2015).

A nanociência e a nanotecnologia surgiram como uma inovação industrial ao representar uma alternativa para o estudo dos fenômenos e manipulação de materiais na escala atômica e molecular, pois as propriedades são significativamente diferentes daquelas observadas em escalas maiores (ABDI, 2010). Segundo Leary (2010), nanoestruturas são fundamentalmente formas diferentes de matérias e mais que estruturas químicas simples. Diferenciam-se das estruturas convencionais não só pelo tamanho, mas também pela organização e ordem da mecânica quântica. A nanotecnologia está relacionada com materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem novas propriedades, fenômenos e processos físicos, químicos e biológicos significativamente aprimorados devido ao seu tamanho em nanoescala (Cappy, Stievenard & Vuillaume, 2002).

O crescente interesse nas aplicações médicas da Nanotecnologia levou ao aparecimento de uma área conhecida como nanomedicina (Figueiras, Coimbra & Veiga, 2014). É uma área de grande destaque e tem promovido várias mudanças na medicina tradicional. A nanomedicina vem desenvolvendo e transformando uma grande variedade de produtos e serviços com potencial de melhorias para a prática clínica e a saúde pública. Dispositivos de diagnóstico *in vitro*, nanobiossensores, imagiologia ótica e liberação controlada de fármacos através de nanocarreadores são algumas das atuais contribuições da nanotecnologia aplicada às ciências biomédicas (Figueiras, Coimbra & Veiga, 2014).

Os nanocarreadores são materiais nanométricos capazes de realizar transporte de múltiplos fármacos e agentes de imagem e biomoléculas. Eles possuem uma

elevada área de superfície e são utilizados para aumentar a concentração de fármacos em determinado local e promover a liberação sustentada dos mesmos e impedindo a sua degradação (Peer et al., 2007). Dentre os nanocarreadores mais estudados pode-se citar nanopartículas poliméricas, nanocarreadores baseados em lipídeos tais como lipossomas e micelas, nanoemulsões, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro (Peer et al., 2007; Figueiras, Coimbra & Veiga, 2014).

A união da possibilidade de diagnóstico associado com a terapia, a redução de dose mínima para atingir efeito esperado e o direcionamento de medicamentos convencionais para o alvo a ser tratado (diminuindo efeitos adversos) são resultados da nanociência médica (Key & Leary, 2014). Muitos tratamentos são desafiadores, pois alvos específicos casualmente não conseguem ser alcançadas. Adicionalmente, também há dificuldade de transposição de barreiras biológicas, como a hematoencefálica. Por trabalhar na escala nanométrica, a nanomedicina apresenta a capacidade de atingir tais alvos e transpor mais facilmente essas barreiras biológicas (Tatar et al., 2016).

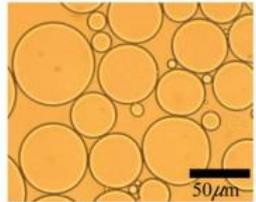
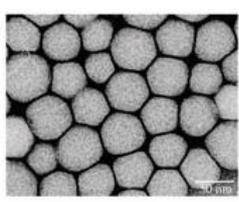
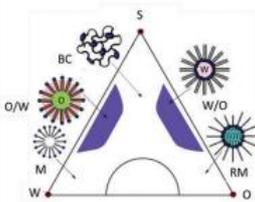
O desenvolvimento de formulações nanotecnológicas objetivando o tratamento do câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e ao combate da AIDS tem sido o foco da nanociência. Existem muitos estudos clínicos com nanomedicamentos em andamento no tratamento do câncer de pulmão, ovário, hepatocarcinoma e, principalmente relacionados ao câncer de mama (Lollo et al., 2011; Dimer et al., 2013).

As aplicações da nanotecnologia na medicina podem criar novas oportunidades de desenvolvimento de técnicas e aparelhos que permitem melhorar a qualidade de vida das populações, gerando muitas possibilidades em torno do seu estudo. Com avanço de seu desenvolvimento, acarretará um papel preponderante nos avanços direcionados a uma medicina personalizada, melhorando a sensibilidade e especificidade de técnicas já existentes, assim como possibilitando o desenvolvimento de novos instrumentos de diagnóstico, culminando em terapias mais precoces e específicas que poderão melhorar a eficácia dos tratamentos e reduzir os efeitos adversos (Figueiras, Coimbra & Veiga, 2014).

## 1.2 NANOEMULSÕES

As nanoemulsões são sistemas coloidais e, assim como as emulsões convencionais, são formadas por duas fases imiscíveis, uma aquosa e outra oleosa, estabilizadas por um tensoativo, formando gotículas em escala nanométrica, geralmente com tamanho entre 20 e 500 nm (Figura 1). Estas gotículas podem ser formadas por óleo disperso em fase aquosa (O/A) ou gotículas de água em fase oleosa (A/O) (McClements, 2012). A adição de um agente emulsificante é necessária para a criação destas gotículas, uma vez que diminui a tensão interfacial, isto é, a energia superficial por unidade de área, entre as fases de óleo e água da emulsão. Além disso, desempenha um papel estabilizante para as nanoemulsões através de interações eletrostáticas repulsivas (Gupta et al., 2016). O menor tamanho das gotículas nanométricas previne o sistema dos fenômenos de floculação e coalescência, além de torná-los visualmente transparentes e com baixa viscosidade. Estas características promovem às nanoemulsões um uso crescente em aplicações variadas (Sadurni et al., 2005). Em estudos anteriores, nanoemulsões contendo curcumina aumentaram a biodisponibilidade oral e aumentaram a atividade anticâncer deste composto (Shukla et al., 2017). Outro estudo demonstrou que a primaquina nanoemulsificada demonstrou atividade antimalárica eficaz contra a infecção por *Plasmodium bergheii* em camundongos albinos suíços com doses 25% menores em comparação com a dose oral convencional (Singh & Vingkar, 2008).

As características de estabilidade de suas gotículas diferenciam as nanoemulsões das micro e macroemulsões. Macroemulsões e nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, ao contrário das microemulsões, o que leva à separação de fases depois de um determinado tempo. Porém, as nanoemulsões são cineticamente estáveis e relativamente menos sensíveis a alterações físicas e químicas quando comparadas com as microemulsões (Gupta et al., 2016).

	macroemulsões	nanoemulsões	microemulsões
			
Tamanho	1-100 μm	20-500 nm	10-100 nm
Forma	esférica	esférica	esférica e lamelar
Estabilidade	termodinamicamente instável, levemente cineticamente estável	termodinamicamente instável, cineticamente estável	termodinamicamente estável
Método de preparação	alta e baixa energia	alta e baixa energia	baixa energia
Polidispersão	frequentemente (>40%)	frequentemente (<10-20%)	frequentemente (<10%)

**Figura 1.** Comparação do tamanho, forma, estabilidade, método de preparação e polidispersão de macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões. Adaptada de GUPTA et al., 2016.

Além de cineticamente estáveis, as nanoemulsões são translúcidas, possuem maior área de superfície em relação ao seu volume e carregam alta energia livre. Então, são alternativas relevantes para a administração e transporte de fármacos, pois possuem capacidade de dissolução de grande quantidade de compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, além de sua capacidade de proteger seu conteúdo de hidrólises e degradações enzimáticas (Figueiras, Coimbra & Veiga, 2014). Desse modo, o uso de nanoemulsões pode ser administrado por diferentes vias, tais como tópica, ocular, oral e intravenosa (Sadurni et al., 2005).

Estudos relatam o potencial da utilização desses sistemas na entrega de fármacos elencando vantagens como redução de toxicidade, aumento na atividade farmacológica, mais segurança na janela terapêutica e aumento da biodisponibilidade (Bruxel et al., 2012). Nesse sentido, as nanoemulsões são alternativas promissoras no tratamento de doenças como o câncer. Estudos utilizando nanoemulsões à base de óleo de caroço de cereja azeda demonstraram eficiência na progressão de câncer de mama em ensaio com células MCF-7 e em modelo de câncer de mama murino através da indução de morte apoptótica (Maragheh et al., 2019). Outros estudos,

nanoemulsões contendo o polifenol epigallocatequina-3-galato demonstraram efeitos inibitórios no crescimento de células de câncer de pulmão H1299, além da supressão da formação, migração e invasão dessas células de maneira dose-dependente através da ativação das vias de sinalização da AMPK, sendo este efeito não observado no tratamento do composto não nanoestruturado (Chen et al., 2020).

Segundo a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (ANVISA, 2005), a estabilidade de potenciais produtos farmacêuticos deve ser determinada a partir de fatores que causam alterações em suas estruturas, como temperatura, luz, propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes do próprio produto e outros. A oxidação é um dos fatores que mais ocasiona a instabilidade de uma emulsão, independentemente de sua escala, resultando em alterações do odor e principalmente aparência do produto, muitas vezes causada pelo oxigênio atmosférico, principalmente na fase oleosa (Zanon, 2010). Assim, a avaliação da oxidação lipídica em nanoemulsões é de grande importância, tendo em vista as alterações que reações do tipo auto-oxidação e foto-oxidação causam nos compostos lipídicos que as compõem, eventualmente trazendo instabilidades a seus produtos. Desse modo, seu processo de armazenamento adequado, levando em consideração tais modificações ao longo do tempo, é fundamental para a manutenção de sua qualidade (Guimarães et al., 2008).

### 1.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Assim como todo lipídio, a fase oleosa das nanoemulsões pode sofrer oxidações se expostas à luz ou variações muito altas de temperatura. Geralmente, os óleos na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação e modificações de sua composição química, o que dificulta a sua conservação (Guimarães et al., 2008). A oxidação dos lipídios de nanoemulsões está relacionada com a interação e formação de radicais livres e espécie reativas de oxigênio (EROS) que desencadeiam um conjunto de reações químicas em cadeia, alterando sua composição, sendo este fenômeno conhecido como peroxidação lipídica (Ferreira & Matsubara, 1997).

Os radicais livres são espécies químicas que contêm elétrons não emparelhados, o que aumenta a reatividade de átomos ou moléculas. Desse modo, são instáveis e reativos. Os mesmos reagem com outras moléculas, aceitando ou doando elétrons, para se tornarem mais estáveis. A reação entre um radical e um composto não radical conduz geralmente à propagação de uma reação em cadeia e a uma geração crescente de novos radicais livres (Repetto, Boveris & Semprine, 2012). Quando em excesso, os radicais livres e ROS, podem se tornar altamente tóxicos, pois são altamente reativos e podem interagir com compostos e moléculas do organismo e, desse modo, estar associadas ao desencadeamento de doenças, incluindo câncer, processos inflamatórios e envelhecimento (Muraina, Suleiman & Eloff, 2009).

No organismo, a peroxidação lipídica está relacionada com a destruição a partir da oxidação de membranas biológicas e outras estruturas contendo lipídios e proteínas. Como a peroxidação lipídica é um processo em cascata desencadeado por uma série de ROS, resulta em uma abundância de vários produtos. Muitas vezes, estes produtos são altamente instáveis num ambiente biológico e reagem facilmente com proteínas (Grintzalis et al., 2012). Nesse processo, as ROS formadas desintegram os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidos das membranas de células normais, liberando a entrada dessas espécies reativas nas estruturas intracelulares, causando danos expressivos em sua estrutura e função (Lima & Abdalla, 2001).

Em sua aplicação em alimentos e em outras áreas, uma das principais causas de deterioração de óleos é a auto-oxidação. O ranço é o resultado dessa oxidação e é responsável pelas alterações sensoriais dos óleos. Nesse processo, verifica-se a reação do oxigênio atmosférico com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, produzindo peróxidos e hidroperóxidos que através de outras reações em paralelo, resultam em compostos como aldeídos, cetonas e álcoois que são responsáveis por características de ranço nos produtos. O ranço também destrói vitaminas, ácidos graxos essenciais e proteínas do meio que está presente. (Melo Filho & Vasconcelos, 2016).

A foto-oxidação é outro mecanismo causado pela ação da incidência de luz sob o óleo. Apresenta diferenças da auto-oxidação, como: não apresentar período de

indução e o oxigênio age direto nas duplas ligações dos lipídios, sem formar radicais livres, havendo formação imediata de hidroperóxidos (Melo Filho & Vasconcelos, 2016).

Para a monitorização da oxidação lipídica de nanoemulsões, métodos espectrofotométricos, cromatográficos e imunoquímicos podem ser utilizados. A análise em si pode ser baseada na análise dos produtos primários de oxidação lipídica como dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos, ou produtos secundários, como malondialdeído, alcanos ou isoprostanos (Repetto, Boveris & Semprine, 2012). Os métodos espectrofotométricos para a análise da oxidação lipídica são bem reprodutíveis e de baixo custo. Os hidroperóxidos totais podem ser determinados utilizando a oxidação de íons de ferro no teste com xilenol *orange* (FOX). O princípio do método FOX é baseado na oxidação de íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) a férrico ( $Fe^{3+}$ ) pela atividade de hidroperóxido no ambiente ácido.

#### 1.4 ÓLEOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Muitos produtos naturais, como óleos e extratos, estão sendo utilizados como agentes quimioprotetores de combate aos cânceres devido seus componentes bioativos. Dentre essas moléculas podem-se citar os compostos fenólicos, que representam um dos grupos mais estudados até o momento, os antioxidantes e os grupos reativos que conferem propriedades de citoproteção (Reddy et al., 2003). A biocompatibilidade desses óleos de origem natural torna este sistema uma alternativa promissora para a administração de diversos tipos de moléculas no organismo (Bruxel et al., 2012).

##### 1.4.1 Buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa*) (Figura 2) pertence à família Arecaceae e é comumente encontrado na Amazônia e no Cerrado (Gurgel-Gonçalves et al., 2006; Gilmore et al., 2013). O óleo de buriti extraído da polpa do fruto é amplamente utilizado na medicina popular brasileira. Na literatura, os autores descreveram que este óleo possui propriedades antimicrobianas e antiplaquetárias e vermífugas (Fuentes et al.,

2013; Koolen et al., 2013; Oliveira et al., 2013). Da mesma forma, também já foi descrito o poder antioxidante do buriti, sendo fonte de compostos como ácido fenólico, flavonoides, tocoferóis, vitamina E e  $\beta$ -caroteno (Aquino et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Outros estudos constataram o poder antioxidante da polpa do buriti a partir dos carotenóides e polifenóis totais, onde 100g de polpa contém 23 mg de carotenóides totais, e o conteúdo de  $\beta$ -caroteno foi de 13,71 mg/100g. Os polifenóis encontrados foram 9,47 mg de polifenóis/100g de polpa e foi mais elevado que em outros frutos analisados (Manhães, 2007). Estes resultados indicam que a presença abundante de compostos com atividade antioxidante nos extratos de buriti proporciona uma atividade potente de eliminação de radicais livres.



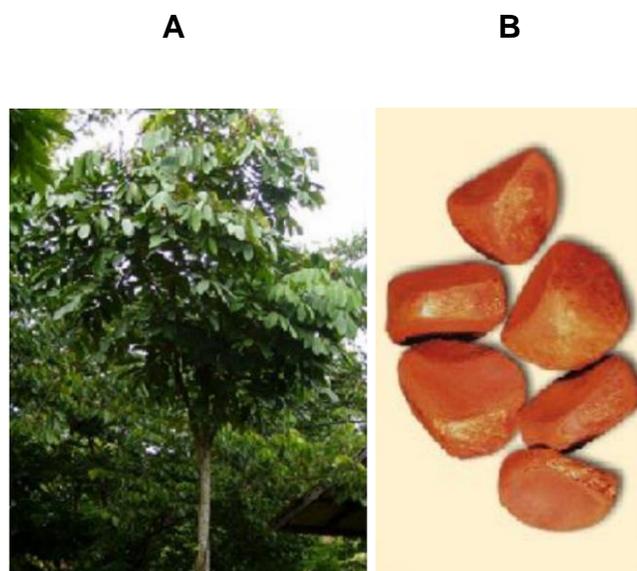
**Figura 2. (A)** Palmeira do buriti (*Mauritia flexuosa*). **(B)** Fruto do buriti. Fonte: Sampaio, 2017.

Recentes estudos *in vitro*, em teste de viabilidade celular, nanoemulsão de óleo de buriti apresentaram uma significativa citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 (Sampaio, 2017). Também já foi demonstrado o potencial do óleo na aplicação para trombose (Martins et al., 2012) e funções cicatrizantes (Batista et al., 2012).

#### 1.4.2 Andiroba

A andiroba (*Carapa guianensis*) (Figura 3) é uma árvore de grande porte, pertencente à família *Meliaceae* e é encontrada predominantemente no Amazônia. O óleo de andiroba é proveniente de suas sementes, que possui variadas atividades biológicas já descritas, como atividade antibacteriana, anticâncer, antifúngicos,

repelentes de insetos, analgésicos, antimaláricos, anti-inflamatórios, antialérgicos e antioxidante (ANVISA, 2015). Por conta destas características, o óleo de andiroba é utilizado na indústria de cosmético e como fitoterápico (Kenfack, 2011).



**Figura 3. (A)** Árvore da andiroba (*Carapa guianensis*). **(B)** Semente da andiroba. Fonte: Monografia da espécie *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba). Ministério da Saúde e ANVISA, 2015.

Em sua composição, o óleo de andiroba possui uma variedade de ácidos graxos como palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico e araquídico. Sendo os ácidos oleico e palmítico os mais predominantes, com cerca de 52 e 28%, respectivamente (Carvalho, 2004).

Em estudos anteriores, o óleo de andiroba demonstrou uma alta capacidade antioxidante (Milhomem-Paixão et al., 2017). Compostos isolados do óleo de andiroba, andirolídeo S e andirolídeo T mostraram atividade citotóxica significativa contra a linha celular P388 de leucemia murina e a linha de células de leucemia HL-60 humana (Sakamoto et al., 2013). Outro estudo avaliou a atividade do óleo em células de câncer de orofaringe FaDu e observou-se a redução da viabilidade celular para todas as concentrações testadas e os efeitos foram observados até 72 horas após o tratamento realizado (Chicaro, 2009). Ensaio *in vivo* de toxicidade aguda indicaram que o óleo de andiroba por via oral de dose única de 2,0 g/kg não produziu nenhum sinal de efeito tóxico ou morte em camundongos albinos suíços fêmeas

durante 14 dias de observação. Além disso, não foram detectadas alterações em seus parâmetros hematológicos e bioquímicos, como pode ser observado (Miranda Júnior et al., 2012).

## 1.5 CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA

O conceito básico sobre o câncer é que o mesmo não pode ser classificado com uma única doença (ACS, 2019). É considerado um conjunto de centenas de doenças que partilham do crescimento desordenado de células, podendo espalhar-se por metástase para outras áreas do organismo (INCA, 2019). Nesta condição, são células heterogêneas com mutações e desregulações epigenéticas que causam alterações morfológicas, funcionais, moleculares e interagem com o microambiente em que estão inseridas (Hanahan & Weinberg, 2011). Ao longo dos estudos foram determinados os que os principais marcadores tumorais, que são características presentes em todos os tipos de câncer, como a vantagem proliferativa seletiva, resposta ao estresse alterada, vascularização, invasão e metástase, religação metabólica, modulação imune e um microambiente favorável (Fouad & Aanei, 2017).

O câncer de pele é o tipo de câncer mais prevalente no Brasil, correspondendo a 25% das neoplasias em território nacional. Seu subtipo não melanoma é mais frequente e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Para cada ano do triênio 2020-2022, estima-se 176.930 de novos casos, sendo 83.770 homens e 93.160 mulheres (INCA, 2020). Segundo a OMS (2020), entre 2 e 3 milhões de casos deste subtipo de câncer de pele ocorrem globalmente a cada ano.

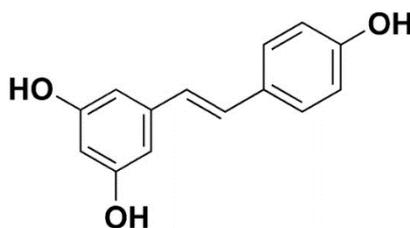
O carcinoma epidermoide não melanona (CPNM) pode ser classificado em dois tipos, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular. O primeiro possui um baixo índice de crescimento, apresenta um tumor local invasivo na epiderme e tem baixo índice metastático. O segundo desenvolve-se a partir de queratinócitos epidermais displásicos e apresenta um maior índice de metástase se comparado com o carcinoma basocelular (Bhandari & Pai, 2014). Os CPNM são mais frequentes em partes do corpo que são comumente expostas ao sol, como orelhas, rosto, pescoço e antebraços. Isso implica que a exposição repetida e prolongada à radiação UV é um fator causal importante. Dentre os tratamentos convencionais para CPNM encontram-se os procedimentos cirúrgicos (como curetagem, eletrodissecação, excisão),

quimioterapia, radioterapia, crioterapia e laserterapia, que são dolorosos e muitas vezes desfigurante (Bhandari & Pai, 2014; OMS, 2020). Devido a essas questões de tratamentos invasivos, a busca por métodos mais evasivos e preventivos são uma questão atual.

Como forma de viabilizar novos tratamentos mais eficazes e seguros, surge a terapia combinatória. Esta metodologia consiste na administração de doses menores de agentes anticancerígenos combinados, buscando a sinergia ou soma de mecanismos de ação, elevando a eficácia acima dos níveis alcançáveis com terapias únicas e potencializando as chances de destruição ou retardo do tumor e reduzindo a incidência de efeitos colaterais (Mignani et al., 2015; O'Collins et al., 2012).

## 1.6 RESVERATROL

O resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (RES), um polifenólico não flavonóide abundante em uvas (*Vitis vinifera*), amendoim (*Arachis hypogaea*) e outros alimentos que são comumente consumidos como parte da dieta humana, pode representar um bom agente em terapias combinatórias (Amri et al., 2012). Sua estrutura é apresentada na Figura 4. Há algum tempo, foi demonstrado que o resveratrol inibe eventos celulares associados com as fases de iniciação, promoção e progressão tumoral, devido sua ação antiinflamatória, inibição da transcrição e atividade da ciclooxygenase no organismo (Jang et al., 1997). Resultados de estudos mais recentes mostraram que este composto induz a apoptose de células tumorais de câncer de pele não melanoma A431 e inibe a sua proliferação (Chen & Yang, 2014). Essa ação de inibição proliferativa já foi anteriormente descrita como ação mediada por WAF-1/p21, modulação das vias de sinalização MEK1 e AP-1 e inibição da telomerase de forma dose dependente (Zhai et al., 2016; Kim et al., 2006; Ahmad et al., 2001).



**Figura 4.** Estrutura química do resveratrol.

Em células A549, o resveratrol inibiu a proliferação celular de maneira dependente da concentração e tempo de exposição em células A549 induzindo a interrupção do ciclo celular na fase G1 via regulação positiva de p21 e ativação da p53 (Yuan et al., 2015). Em outro estudo, o resveratrol inibiu a propriedade migratória da linha celular de melanoma B16F10 altamente invasiva quando comparado com o tratamento controle sem o composto (Bhattacharya et al., 2011). Em células HCT-116wt, análogos de resveratrol testados apenas induziram parada do ciclo celular na concentração de  $\geq 40 \mu\text{M}$  e após 24 horas de tratamento (Wang et al., 2017).

Estudos de terapia combinatória determinaram que o resveratrol e etoposido demonstraram efeitos inibitórios de células de carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC) de forma dose-dependente e, quando em combinação de tratamento, apresentaram efeitos sinérgicos e tempo dependente. (Heiduschka et al., 2014). Os tratamentos combinados de resveratrol e 5-Fluorouracil aumentam as atividades anticâncer dos compostos inibindo simultaneamente as vias de sinalização STAT3 e Akt, induzindo a paragem do ciclo celular específico da fase S e, aumentando a apoptose das células cancerosas colorretais (Chung et al., 2018).

Apesar de o potencial antitumoral de nanoemulsões à base de óleos naturais e resveratrol de forma independente serem claros, os efeitos da associação de tal nanoformulações com o resveratrol ainda não foram elucidados. Diante do exposto, este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira tem o objetivo de realizar o monitoramento do processo oxidativo de nanoemulsões à base de óleo de buriti expostas a diferentes condições de armazenamento (variações na exposição de luz e temperatura) ao longo do tempo e comparar com sua estabilidade físico-química. A segunda parte do trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da associação do resveratrol e do óleo de andiroba nanoestruturado em células de câncer de pele não melanoma A341, *in vitro*. A avaliação da combinação desses dois biocompostos presentes na biodiversidade brasileira pode instaurar-se como uma nova terapia adjuvante para o câncer de pele não melanoma e auxiliar na otimização da terapêutica antineoplásica com utilização de nanopartículas e produtos naturais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Monitorar e analisar o processo oxidativo de nanoemulsões à base de óleo de buriti expostas à diferentes condições de armazenamento ao longo do tempo e avaliar os efeitos de nanoemulsões à base de óleo de andiroba em associação ao resveratrol em células de câncer pele não melanoma.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **PARTE I**

- Monitorar e comparar os níveis de oxidação da nanoemulsão à base de óleo de buriti armazenadas em diferentes temperaturas e exposição à luz ao longo de 60 dias;
- Monitorar as características físico-químicas (tamanho, carga e pH) da nanoemulsão de buriti armazenada em diferentes temperaturas e exposição à luz ao longo de 60 dias;
- Determinar a melhor condição de armazenamento para nanoemulsões à base de óleo de buriti.

#### **PARTE II**

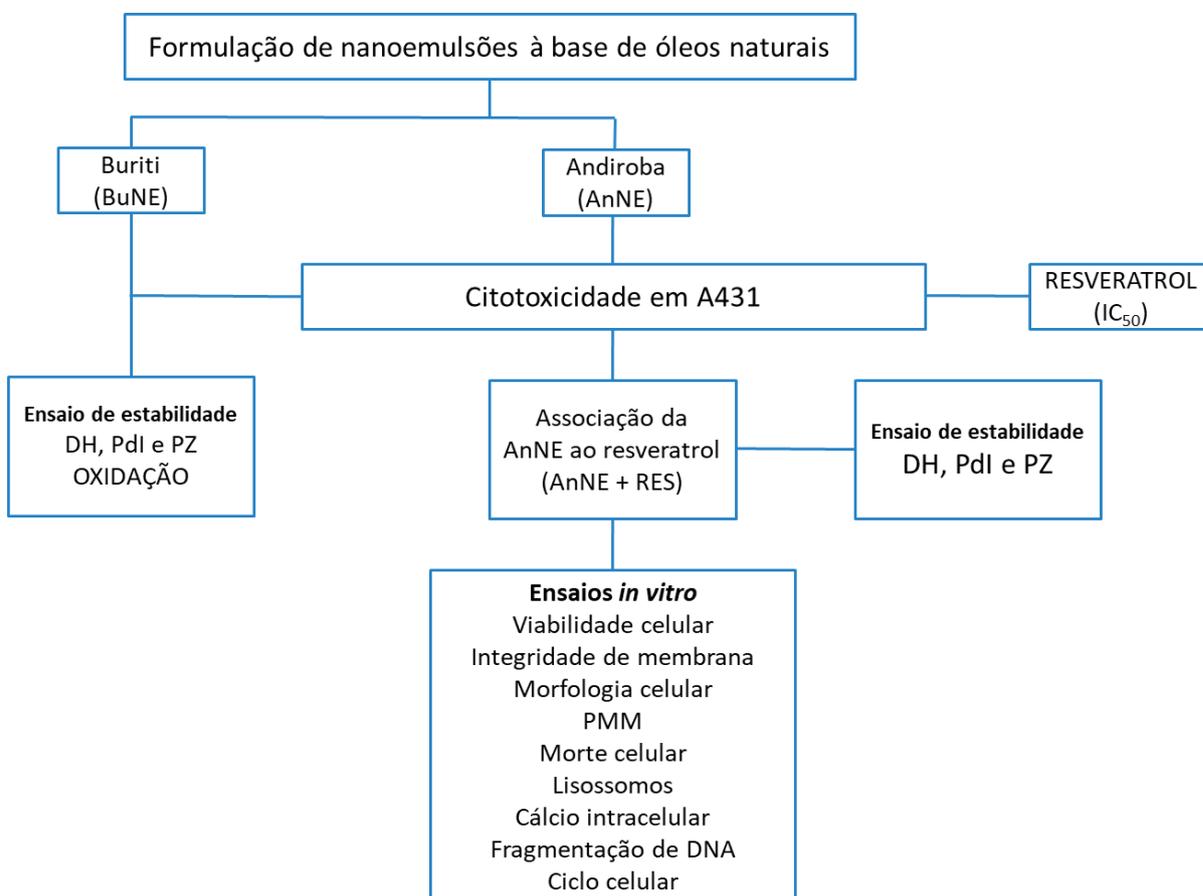
- Desenvolver nanoemulsões à base de óleos naturais e avaliar a citotoxicidade em células A431 comparadas com seus respectivos óleos livres nos tempos de 24 e 48 horas;
- Determinar o nível de oxidação dos óleos naturais antes e depois do processo de nanoformulação.
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos (diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, carga de superfície e pH) das nanoemulsões à base de óleo de andiroba e acompanhar a estabilidade ao longo de 60 dias;
- Determinar o IC<sub>50</sub> do resveratrol em células A431 em 24 e 48 horas de

exposição por ensaio de MTT e cristal violeta;

- Analisar os efeitos da associação entre o resveratrol e nanoemulsão à base de óleo de andiroba na viabilidade de células A431 e queratinócitos não tumorais HaCaT;
- Avaliar a morfologia de células A431 após tratamento com associação de nanomulsões à base de andiroba e resveratrol;
- Avaliar os efeitos da associação entre o resveratrol e nanoemulsão à base de óleo de andiroba na integridade de membrana e proliferação de células A431 por coloração de azul de tripan;
- Avaliar os efeitos da associação entre o resveratrol e nanoemulsão à base de óleo de andiroba, na integridade do DNA, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial, permeabilização da membrana do lisossomo e nível de cálcio intracelular de células A431, utilizando citometria de fluxo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foi desenvolvido o esquema experimental apresentado na figura 5 a seguir:



**Figura 5.** Esquema experimental. DH: Diâmetro Hidrodinâmico. Pdl: Índice de Polidispersão. PZ: Potencial Zeta. RES: Resveratrol. PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial.

Este trabalho foi dividido em duas partes para melhor compreensão. Na primeira parte deste trabalho (PARTE I) foram avaliados os parâmetros de estabilidade estrutural e oxidativa de nanoemulsões em diferentes condições de armazenamento ao longo do tempo. Utilizou-se uma nanoemulsão à base de óleo de buriti (BuNE) como modelo para esses estudos devido à sua grande proporção de componentes antioxidantes, principalmente o  $\beta$ -caroteno (Schiassi et al., 2018).

A segunda parte deste trabalho (PARTE II) teve como foco a avaliação dos efeitos antitumorais de óleos derivados da biodiversidade brasileira, e suas respectivas nanoemulsões, em células de câncer de pele não melanoma (A431).

Inicialmente foi feito um ensaio de *screening* para selecionar a nanoemulsão com melhor atividade citotóxica. Em seguida, moléculas de resveratrol foram incorporadas à essa nanoemulsão e o estudo prosseguiu com a caracterização dessa nova formulação e com a avaliação dos efeitos antitumorais combinatórios entre o resveratrol e a nanoemulsão nas células A431 e também em células de queratinócitos não tumorais (HaCat).

### 3.1 OBTENÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA ASSOCIADOS AO RESVERATROL

Os óleos naturais utilizados foram adquiridos comercialmente (buriti e andiroba: FERQUIMA LDTA e açai: Farmacotécnica). Prezou-se por óleos extraídos por prensagem a frio. Cada formulação foi produzida na proporção de 2:1 para surfactante (lecitina de ovo) e óleo (m/m). Para formulação das nanoemulsões à base de óleos da biodiversidade brasileira associadas ao resveratrol (BioVision) foi utilizado método de ultrassonicação. O processo foi dividido em duas etapas.

Na primeira etapa, as amostras de óleos foram pesadas, o resveratrol (solução de 15 mg/mL em DMSO – Dimetilsulfóxido P.A., Dinâmica, Brasil) foi adicionado e depois os componentes foram solubilizados em etanol absoluto (J.T. Baker, México). Em balão de rotaevaporação, o etanol foi retirado da solução com auxílio de rotaevaporador em banho a 45°C por 10 minutos. A lecitina de ovo (LIPOID E 80, Alemanha) foi diluída em PBS 1X (Tampão PBS pH 7,2 Laborclin, Brasil) aquecido a 45°C e com esta solução o filme de óleo e resveratrol formado após a retirada do etanol foi desfeito na proporção de 1:2 (óleo:lecitina) com auxílio de vortexador e banho de ultrassom quando necessário. A solução foi transferida para um tubo falcon de 50 mL e a amostra foi submetida a ultrasonicação (Branson Sonifier 450 Sonicator, Fisher Scientific, USA) durante 3 minutos com pulsos alternados e 40% de amplitude. A sonicação foi realizada em banho de gelo e ambiente com pouca luz.

Após a primeira sonicação, a amostra foi diluída na proporção de 1:12,5 com PBS 1X em temperatura ambiente. Dessa forma, todas as amostras atingiram a concentração de 1,44 mg/mL de óleo no sistema. Uma nova sonicação durante 3

minutos com pulsos alternados e 40% de amplitude em banho de gelo e ambiente com pouca luz foi realizada.

Após retirar o filme da parede do balão dissolvendo-o com auxílio de vórtex e banho de ultrassom, transferiu-se o conteúdo do balão para um tubo falcon de 50 mL. A amostra foi submetida a ultrasonicação (Branson Sonifier 450 Sonicator, Fisher Scientific, USA) por 3 minutos em banho de gelo, 40% de amplitude e pulso alternado, obtendo nesse processo a amostra concentrada. As nanoestruturas em branco que eram apenas lecitina e PBS 1X, assim como as formulações sem resveratrol foram formuladas da mesma maneira.

As formulações foram armazenadas em abrigo de luz e umidade, e conservadas a temperatura de 4°C, exceto a nanoemulsão à base de óleo de buriti seu respectivo branco que foram utilizados para ensaios da primeira parte deste estudo (características físico-química e oxidação ao longo do tempo em diferentes condições de armazenamento).

As nanoemulsões à base de óleo de buriti foram aliqüotadas e armazenadas em 3 grupos: armazenadas a 4°C no escuro, temperatura ambiente (25°C) no escuro e armazenadas à temperatura ambiente com exposição à luz direta e constante em uma câmara de luz (Luz 25°C). Para esta câmara, foi utilizada uma lâmpada de luz branca (LED) 9W e 850 lúmens na caixa de madeira branca. A temperatura e a iluminação da câmara de luz foram medidas e mantêm-se disponíveis ao longo da experiência, sendo 24°C e média de 500 lux, respectivamente.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETOS FÍSICO-QUÍMICOS DAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

O diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta (PZ) das nanoemulsões foram determinados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico utilizando o equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Reino Unido). O pH das nanoemulsões foi analisado por meio de uma fita indicadora de pH (Macherey-Nagel, Alemanha). Os aspectos macroscópicos das formulações foram analisados visualmente para a observação da presença de

precipitados e turbidez. Para ensaio de estabilidade ao longo do tempo as amostras foram analisadas em períodos de 1, 7, 15, 30 e 60 dias.

### 3.3 MONITORAMENTO DA OXIDAÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI

A metodologia é uma adaptação do método FOX (*ferrous oxidation-xylenol orange*) descrito e modificado por Shanta & Decker (1994) e Grintzalis et al. (2012). Baseia-se na detecção de ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), resultante da oxidação de ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a partir da ação dos produtos da oxidação dos componentes oleosos da nanoemulsão. Essa detecção se dá com uma solução de tiocianato de amônio que, quando em contato com ferro oxidado, apresenta na solução uma cor avermelhada gradual dependendo da quantidade desse ferro. Essa coloração não é observada com o ferro ferroso, permanecendo uma solução incolor. Essas colorações foram medidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm e posteriormente comparados com uma curva padrão de  $\text{Fe}^{3+}$  junto ao tiocianato de amônio em diferentes concentrações para análise dos resultados.

As soluções de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  foram preparadas pesando 0,05 g de ferro e diluindo em 5 mL de ácido clorídrico 10 N e mais 15 mL de água destilada. A solução de tiocianato de amônio foi preparada diluindo 30 g do reagente em 100 mL de água.

Em microtubo, pipetou-se 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra de nanoemulsão e 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-metanol e em seguida as soluções foram vortexadas por 3 minutos no escuro. Em seguida, foram centrifugadas a 32870 g a 4°C durante 20 minutos para separação de fases. A fase aquosa superior foi supostamente retirada de cada amostra, que logo depois foram expostas a gás nitrogênio durante 10 minutos para que secasse todo o clorofórmio e restassem apenas lipídios nos microtubos. Depois, as amostras foram ressuspensas com 500  $\mu\text{L}$  de metanol (J.T. Baker, México). Em outros microtubos, passaram-se 470  $\mu\text{L}$  das amostras e foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Fe}^{2+}$  e 5  $\mu\text{L}$  de tiocianato de amônio. Em seguida, as amostras foram

pipetadas em placa de 96 poços em triplicata com volume de 100  $\mu\text{L}$  e lidas em espectrofotômetro a 450 nm depois de 30 minutos de incubação no escuro.

Para realizar a análise da oxidação nas formulações, foi estabelecida e utilizada a curva padrão de  $\text{Fe}^{3+}$ . A curva foi realizada pipetando-se 500  $\mu\text{L}$  de metanol em 10 microtubos e 500  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{Fe}^{3+}$  foi adicionado ao primeiro tubo e passado aos outros em uma diluição seriada com fator 2 de diluição. A curva foi realizada a partir das concentrações de  $\text{Fe}^{3+}$  (1000 a 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de metanol) realizada por diluição seriada em volume de 1 mL.

O valor de peróxidos, expressos como miliequivalente peróxidos/kg de amostra foi calculado segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Valor de peróxido (miliequivalente peróxidos/kg)} = \frac{(A_s - A_b) \times m}{55.84 \times m_0 \times 2}$$

Onde,  $A_s$  = absorvância da amostra;  $A_b$  = absorvância do controle;  $m$  = coeficiente angular da curva padrão de  $\text{Fe}^{3+}$ ;  $m_0$  = massa em gramas da nanoemulsão; 55.82 = peso atômico do ferro. A divisão por 2 é necessária para converter a unidade de medida para miliequivalentes de peróxido/kg de amostra.

### **3.4 CULTIVO CELULAR**

Células A431 e HaCat foram cultivadas em meio DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium – (Life, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico penicilina (Gibco, EUA) e estreptomicina (Gibco, EUA) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram semeadas e aderidas por 24 horas antes do início do tratamento.

#### **3.4.1 Tripsinização das células**

Devido a aderência das células A431 e HaCat a tripsina, uma enzima que hidrolisa as ligações peptídicas, foi utilizada para soltar as células da superfície de cultivo celular. Primeiramente, o meio de cultura foi descartado e a garrafa de cultivo foi lavada duas vezes com PBS 1X e 5 mL de tripsina (Tripsina 0,25%, Life, EUA)

foram 6 adicionados. As células foram incubadas por 6 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após observar por microscopia de luz que todas as células estavam soltas, 5 mL de meio de cultivo foram adicionados para neutralizar o efeito da tripsina. O conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo falcon de 15 mL e centrifugado a 1341 g por 3 minutos em temperatura ambiente. Após observação da formação de pellet celular, o meio sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo para posterior passagem de garrafa e/ou experimentos. O meio de cultivo foi renovado a cada 2 dias.

### **3.4.2 Plaqueamento das células**

Antes do plaqueamento pré-tratamento, as células foram contadas em câmara de Neubauer. Para isso, 10 µL das células ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo foram separados em um microtubo e 90 µL de azul de tripan (0,4% em PBS) foram adicionados. Após homogeneização, 10 µL da solução foram pipetados em câmara de Neubauer e as células foram contadas em microscópio de luz invertido. Após a contagem, as quantidades de células por poço adequada para cada experimento foram calculadas e então as células foram semeadas em placas específicas. Os plaqueamentos foram realizados 24 horas antes dos tratamentos e as placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

## **3.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR**

### **3.5.1 Ensaio de MTT**

Para este ensaio foram semeadas  $5 \times 10^3$  células por poço em placa de cultivo de 96 poços. Após 24 horas de incubação, as células foram expostas às nanoemulsões à base de óleo de óleos da diversidade brasileira por um período de 24 e 48 horas. As concentrações de nanoemulsões e seus respectivos brancos foram 90, 180 e 360 µg/mL diluídas em PBS. Para o tratamento com óleo livre, foi feita uma solução de cada óleo em etanol absoluto (EtOH) e posteriormente as concentrações de 90, 180 e 360 µg/mL foram preparadas em PBS. Utilizou-se o PBS como controle em todos os experimentos. O resveratrol foi diluído em DMSO (Dimetilsulfóxido P.A.,

Dinâmica, Brasil) e as concentrações de cada experimento (10 – 150 µg/mL) foi realizada respeitando a proporção máxima de 1% de DMSO em cada poço.

A viabilidade celular foi avaliada por método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazol). Após o tempo de exposição adequado, os tratamentos foram retirados da placa e as células incubadas com o MTT (15 µL de MTT 5 mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM em cada poço) durante 2 horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o MTT foi retirado e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan formados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.5.2 Ensaio de cristal violeta (CV)**

No ensaio de viabilidade celular a partir do corante cristal violeta, as células foram plaqueadas e tratadas da mesma forma que o item 3.5.1. Após o tempo de exposição adequado, os tratamentos foram retirados da placa e os poços foram lavados duas vezes com PBS gelado. As células foram então fixadas com 100 µL por poço de metanol gelado durante 5 minutos em temperatura ambiente. O metanol foi então retirado e foram adicionados 50 µL da solução de cristal violeta (0,1%) durante 10 minutos em temperatura ambiente para corar o núcleo das células. Os poços foram lavados com água destilada para retirar o excesso de CV e a placa secou ao ar livre. Para solubilização do corante ligado às células foi adicionado 100 µL de ácido acético 10% em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

### **3.6 CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)**

Para os ensaios de citometria de fluxo foram semeadas  $2,5 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após período de incubação, as células foram tratadas com as concentrações previamente determinadas de IC<sub>50</sub> de nanomulsão de andiroba (AnNE), nanoemulsão de andiroba associada ao resveratrol (AnNE + RES) e RES por 48 horas. O tampão PBS 1x foi utilizado como controle negativo, enquanto o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como controle positivo. Cada grupo foi analisado em triplicata.

### **3.6.1 Avaliação da morte celular por marcação de Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI)**

A marcação de Anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) foi utilizada para diferenciar células apoptóticas e necróticas. Após 48 horas de incubação de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo e 400µL de tripsina (Gibco, EUA) foram adicionadas para desaderir as células em cada poço. A placa foi então incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A solução de tripsina com células foi transferida para o microtubo correspondente com o meio de cultivo e foi centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de tampão de ligação (0,1 M de HEPES (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl<sub>2</sub>) foi adicionado ao microtubo de cada tratamento. Depois 5 µL de solução de Anexina V conjugada ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD, EUA) e 10 µL de solução de Iodeto de Propídeo (IP) (50 µg/mL) (Probes – Thermo Fisher, EUA) foram adicionados nos tubos e foram incubados por 15 minutos protegidos da luz em temperatura ambiente. Por fim, 200 µL de tampão de ligação foram adicionados e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACSVerse TM, EUA). Média de 10.000 eventos foram analisados por amostra.

### **3.6.2 Potencial da membrana mitocondrial e aspectos morfológicos das células**

A análise do potencial da membrana mitocondrial foi realizada para avaliar o mecanismo associado a morte celular por apoptose. Este ensaio é baseado na Rodamina 123, uma sonda fluorescente catiônica capaz de se acumular especificamente nas mitocôndrias devido ao potencial transmembranar negativo dessa organela nas células vivas (Garner et al., 1997). Após 48 horas de incubação de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo e 400µL de tripsina foram adicionadas para desaderir as células em cada poço. A placa foi então incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A solução de tripsina com células foi transferida para o microtubo correspondente com o meio de cultivo e foi centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. As células foram então lavadas duas vezes em PBS 1x e 300 µL de Rodamina 123 (5 µg/mL em PBS 1x, Thermo Fisher, EUA) foram adicionados a cada amostra e incubadas por 15 minutos à temperatura

ambiente e no escuro. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e analisadas por citômetro de fluxo. Média de 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os aspectos de tamanho e granularidade das células foram obtidos por citometria de fluxo utilizando os canais FSC e SSC, respectivamente.

### **3.6.3 Ensaio de fragmentação de DNA e ciclo celular**

Após 48 horas de incubação de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo e 400 µL de tripsina foram adicionadas para desaderir as células em cada poço. A placa foi então incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A solução de tripsina com células foi transferida para o microtubo correspondente com o meio de cultivo e foi centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. O meio de cultivo foi retirado até a marca dos 100 uL dos tubos e 400 uL de PBS 1x foram adicionados e os tubos foram centrifugados novamente. Após retirada do PBS 1X, os pellets de células foram ressuspensos em 1 mL de etanol 70% gelado. Todos os tubos foram armazenados a -20°C por 24 horas. Após o tempo de fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e 100 µL de RNase (50 µg / mL) foram adicionados e os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C e no escuro. Em seguida, 100 µL de iodeto de propídio (PI - 20 µg / mL, Probes, Thermo Fisher, EUA) em PBS 1x foram adicionados e as amostras foram novamente incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. A fragmentação do DNA e o ciclo celular foram analisados usando um citômetro de fluxo. Média de 10.000 eventos foram coletados por amostra.

### **3.6.4 Permeabilidade da membrana de lisossomos**

Laranja de acridina (LA) é um fluorocromo metacromático com tropismo ao lisossoma. O LA emite fluorescência vermelha em altas concentrações quando presente nos lisossomos e excitado com luz azul (Boya & Kroemer, 2008). Após 48 horas de incubação de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo e 400 µL de tripsina foram adicionadas para desaderir as células em cada poço. A placa foi então incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A solução de tripsina com células foi transferida para o microtubo correspondente com o meio de cultivo e foi centrifugado a 3.083 g a 4°C por 5 minutos. Após duas lavagens de PBS 1X, as células foram expostas a 50 µM de LA por 30 minutos protegidos da luz à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, a permeabilização da membrana lisossômica foi analisada por citometria de fluxo. Um total de 10.000 eventos foram analisados por amostra.

### **3.6.5 Determinação do nível intracelular de Ca<sup>2+</sup>**

Foi utilizado o Fluo-4 verde fluorescente ligado ao éster acetoximetílico (Fluo-4/AM) para determinar o nível intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Neste ensaio, a parte AM do composto não fluorescente é clivado pela esterase, liberando o Fluo-4 para ligar-se ao Ca<sup>2+</sup> dentro das células e emitir um sinal fluorescente (Gee et al., 2000). Após 48 horas de incubação de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi transferido para um microtubo e 400 µL de tripsina foram adicionadas para desaderir as células em cada poço. A placa foi então incubada por 5 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A solução de tripsina com células foi transferida para o microtubo correspondente com o meio de cultivo e foi centrifugado a 3.083 g a 4°C durante 5 minutos. Após duas lavagens de PBS 1X, as células foram expostas a 2 µL de Fluo-4/AM por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. O nível de Ca<sup>2+</sup> intracelular foi analisado por citômetro de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos por amostra.

## **3.7 AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR**

O plaqueamento para o teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular foi realizado da mesma maneira que os ensaios de citometria (item 3.6). Após 48 horas de exposição aos tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o pellet foi ressuspendido em meio de cultivo. As células foram coradas com uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA). Para isso, 10 µL das células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultivo foram separados em um microtubo e 40 µL de azul de tripan (0,4% em PBS) foram adicionados. Após homogeneização, 10 µL da solução foram pipetados em câmara de Neubauer e as células foram contadas em microscópio de luz invertido. O número de células totais

foi determinado contando-se células coradas ou não coradas. Foi considerado como células com membrana intacta, aquelas não coradas; e as coradas de azul, como células com membrana plasmática lesionada.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

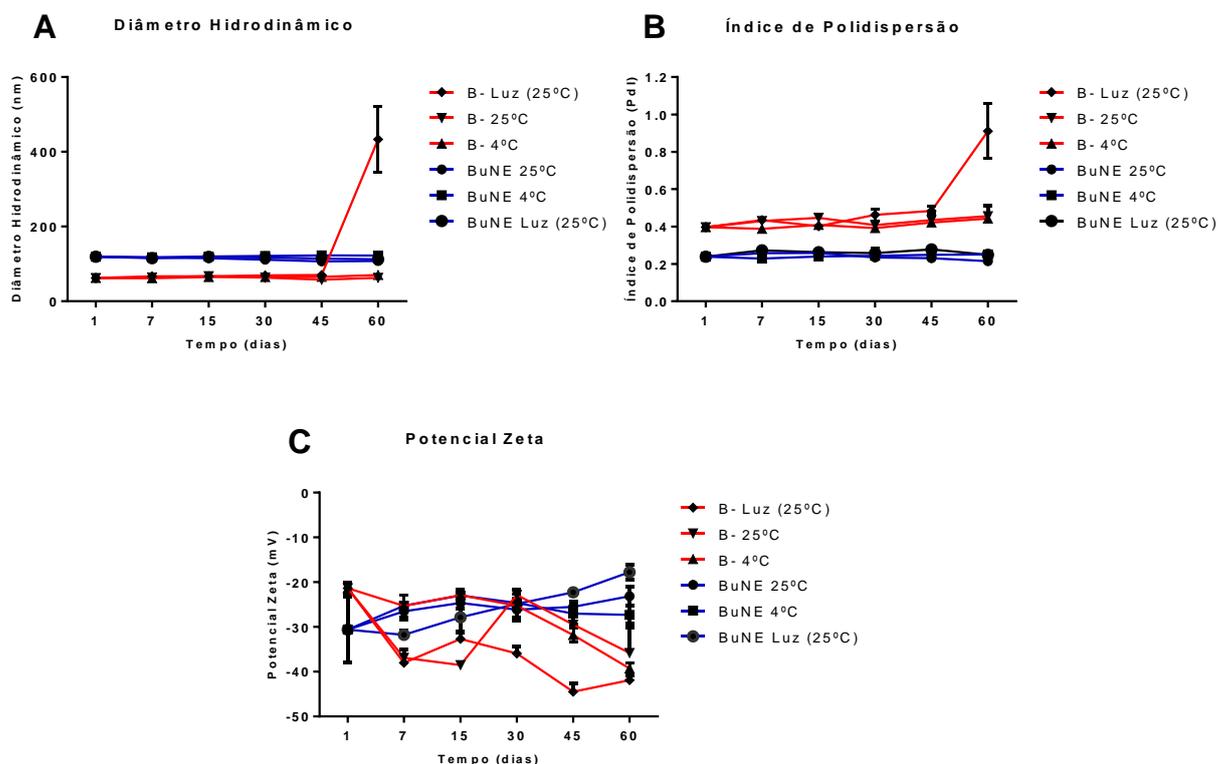
Os experimentos foram realizados e analisados em triplicatas em três repetições. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio-padrão. Os testes estatísticos foram feitos pelo software GraphPad Prism 6. Teste ANOVA e os pós-teste Tukey foram utilizados. Os valores considerados estatisticamente significativos foram aqueles que apresentaram  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### PARTE I

#### 4.1 CARATERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI AO LONGO DO TEMPO

Primeiramente, as características físico-químicas das nanofomulações foram determinadas antes da submissão das amostras em cada temperatura de armazenamento. O diâmetro hidrodinâmico médio (DH) obtido para BuNE e Branco (B-) foi de 119,1 nm e 62,0 nm, respectivamente. A BuNE manteve seus parâmetros de DH estáveis em todas as condições de armazenamento. Foi observado um aumento de aproximadamente 400 nm em B- após 60 dias em condições de Luz (25°C) (Figura 6A). Essa variação é devida à condição de visível agregação macroscópica observada nessas formulações (dado não mostrado). O tamanho das gotículas de BuNE permaneceu estável durante todo o experimento e apresentou uma DH média de 116 nm em todas as condições de armazenamento.



**Figura 6.** Avaliação da estabilidade de nanoformulações com (BuNE) ou sem (B-) óleo de buriti ao longo do tempo, armazenamento a 4°C, temperatura ambiente (25°C) e exposição à luz (25°C). Segundo diâmetro hidrodinâmico (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C). Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

O Pdl médio das nanoformulações (Figura 6B) foi de 0,2 para BuNE e 0,3 para B-, indicando uma formulação monodispersa no primeiro dia de análise. O valor de Pdl é um indicador da distribuição do tamanho das gotículas no sistema de nanoemulsão. Valores próximos a 0 indicam monodispersidade, enquanto valores acima de 0,7 indicam uma grande variedade de tamanhos de gotículas (Agrawal et al., 2018). As formulações se mostraram estáveis, exceto B- na condição de luz que aumentou o valor de Pdl para 0,911 em 60 dias. O valor de Pdl dessas formulações corrobora com a agregação observada macroscopicamente e estas formulações eram polidispersas neste momento.

O DH e o Pdl encontrados no presente trabalho estão na faixa esperada para nanoemulsões à base óleos naturais descritas anteriormente, como óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Martius), óleo de folhas de gengibre (*Zingiber officinale*) e óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*), descritas como monodispersas e com

aproximadamente 100 a 150 nm de DH (Monge-Fuentes et al., 2017; Mostafa, 2018; Kheawfu et al, 2018).

Em relação ao parâmetro de potencial zeta (PZ), B- e BuNE demonstraram variações dos valores ao longo do tempo (Figura 6C). Sabe-se que o potencial zeta é um indicador da estabilidade dos sistemas coloidais (Wongsagonsup et al., 2005). É bem descrito na literatura que uma boa estabilidade é garantida com valor potencial zeta próximo a  $\pm 30$  mV (RAI et al., 2018). Algumas nanoemulsões de óleo em água têm baixos valores de PZ e apresentam alta estabilidade (Bhattacharjee, 2016). O potencial zeta é influenciado pela interação da nanogotícula e do dispersante, e essa interação é influenciada pela temperatura, pH e exposição à luz (Uner, 2006). O B- apresentou variação brusca de PZ em todas condições de armazenamento. A condição de luz para B- foi a mais instável quando comparada com as outras. A formulação de BuNE apresentou variação de -30,60 mV (dia 1) a -17,96 mV (BuNE 25°C dia 60) no PZ. Esse fenômeno pode ser explicado porque o aumento da temperatura causa o aumento da energia cinética, alterando a cristalinidade das partículas e até fazendo com que elas se agreguem. Essa recristalização pode resultar em variação da carga superficial e, conseqüentemente, modificar o potencial zeta das partículas, podendo ser, inclusive, um indicador de instabilidade (Uner, 2006).

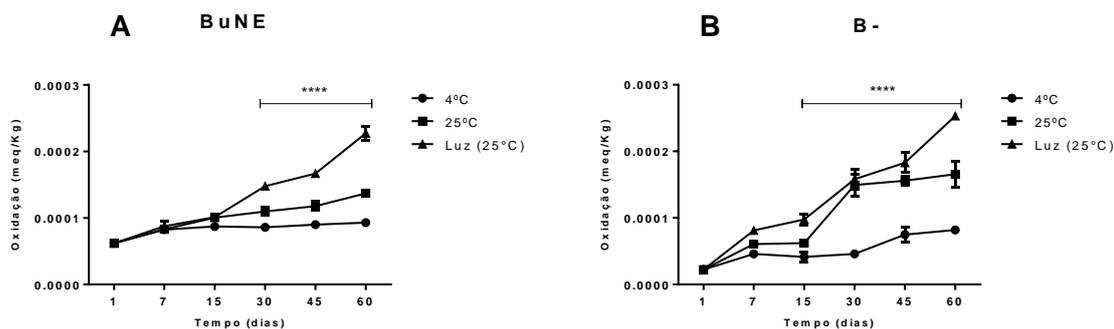
**Tabela 1:** Resultados da variação do valor de pH de BuNE e B- armazenados em 3 condições diferentes (4°C, 25°C e Luz 25°C).

Tempo (dias)	pH					
	BuNE 25°C	BuNE 4°C	BuNE Luz	B- 4°C	B- 25°C	B- Luz 25°C
1	7	7	7	7	7	7
7	6	6	6	6	6	6
15	5	6	5	7	6	6
30	5	7	6	7	5	6
45	5	6	5	7	5	5
60	5	6	5	6	5	5

A variação de potencial zeta descrita no presente trabalho também está relacionada à valores de pH do meio. É possível perceber que as tanto BuNE e B- diminuem seus valores de pH nas condições de 25°C e Luz (25°C) e passam de soluções neutras (pH 7) a ácidas (pH 5) ao logo dos 60 dias de monitoramento (Tabela 1). Em contrapartida, a variação de pH das nanofomulações armazenadas a 4°C foi menor. Alteração de pH nas amostras está correlacionado à formação de ácidos orgânicos que aumentam a acidez do meio, indicando aumento de oxidação do óleo presente no sistema e alterando as cargas superficiais das nanogotículas de óleo. (Fialho, 2007).

#### 4.2 OXIDAÇÃO DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE BURITI AO LONGO DO TEMPO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A oxidação de óleos é fortemente influenciada pelas condições de armazenamento. Como muitos óleos vegetais têm insaturações em sua estrutura carbônica, eles podem ser suscetíveis a várias vias de oxidação (Choe & Min, 2006), incluindo foto-oxidação e oxidação térmica. A Figura 7 apresenta dados do perfil de oxidação da nanoemulsão de buriti armazenada em diferentes condições ao longo de 60 dias.



**Figura 7.** Perfil de oxidação (meq/Kg) de nanoemulsões de óleo de Buriti (BuNE) **(A)** e nanoestruturas em branco (sem fase oleosa) **(B)** armazenadas a 4°C, temperatura ambiente (25°C) e exposição à luz (Luz 25°C) ao longo do tempo. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. One way ANOVA: diferença significativa entre os grupos  $p < 0,05$  (pós-teste Tukey). \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs grupo de 4°C.

As nanoemulsões de Buriti mostraram uma diferença significativa no perfil de oxidação dos grupos armazenados à temperatura ambiente e a 4°C (Figura 7A). Após 30 dias de armazenamento, os grupos de temperatura ambiente (expostos ou não à luz) apresentaram aumento da oxidação, e o exposto à luz atingiu o dobro da oxidação das amostras a 4°C após 60 dias. Por outro lado, o BuNE armazenado a 4°C manteve um perfil de oxidação quase constante ao longo do tempo (Figura 7A). Como um todo, observou-se que os grupos armazenados a temperatura ambiente apresentaram um perfil de oxidação superior ao BuNE 4°C, considerando os 60 dias de análise. Além disso, a luz foi o fator mais importante na indução da oxidação. Esses dados são reforçados pela literatura que relata baixas temperaturas podem encurtar a oxidação térmica (McClements & Decker, 2000).

Em relação ao grupo B-, é possível notar que existe um perfil de oxidação relativo semelhante ao BuNE (Figura 7B). Como estas formulações não contêm óleo, infere-se que o surfactante utilizado nas formulações de nanoemulsão também pode sofrer oxidação sob condições de armazenamento que foram condicionadas. De fato, os surfactantes utilizados nas presentes nanoemulsões foram a lecitina (composta principalmente por fosfatidilcolina), suscetível à foto-oxidação e/ou oxidação térmica em suas ligações duplas (Al-Orf, 2011).

As temperaturas mais baixas de armazenamento do BuNE minimizaram as suas taxas de oxidação, o que pode contribuir para sua estabilidade química e

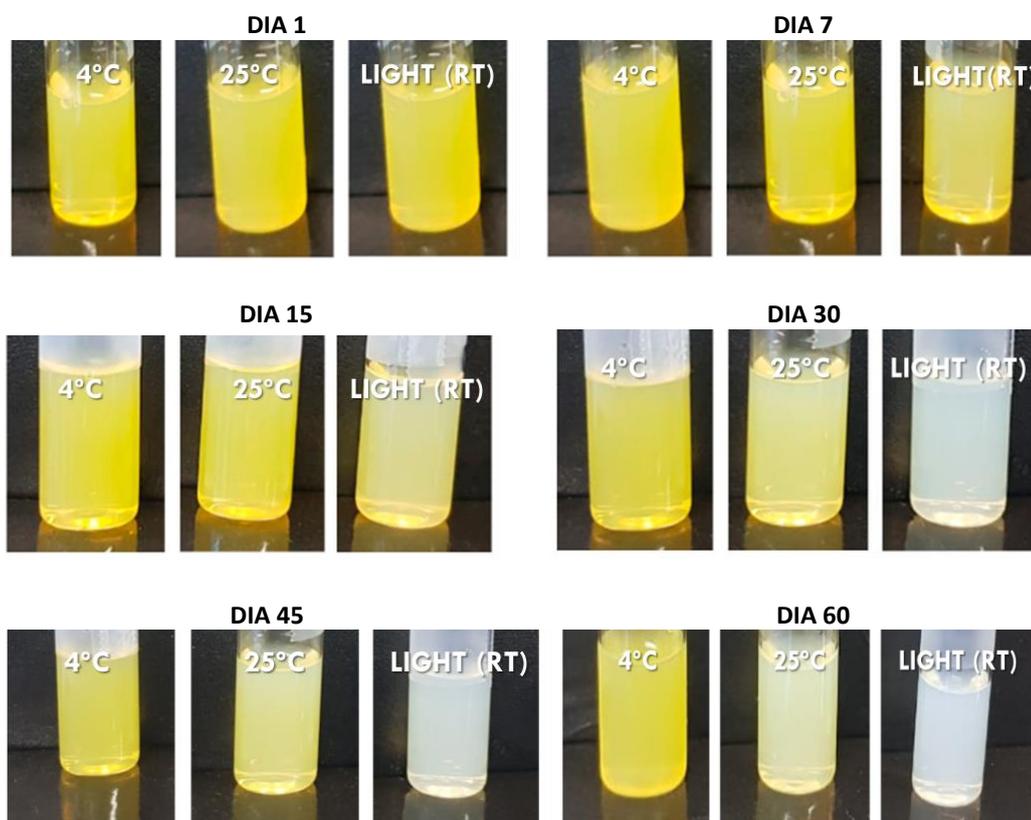
estrutural ao longo do tempo. No entanto, o armazenamento a 25°C com exposição à luz aumentou a oxidação o potencial zeta das nanoemulsões no final do período de armazenamento. Temperaturas mais altas, assim como exposição a luz e oxigênio tornam os óleos muito instáveis e podem sofrer inúmeras reações de degradação, o que dificulta a sua conservação (Guimarães et al., 2008; Kargar, Spyropoulos & Norton, 2011). A oxidação desses lipídios está relacionada com a formação de radicais livres e estresse oxidativo, que podem causar a formação de produtos que desencadeiam uma série de eventos bioquímicos característicos da oxidação lipídica (Ferreira & Matsubara, 1997).

É interessante observar que o DH e o Pdl das formulações sofrem poucas variações mesmo quando a oxidação aumenta, como é o caso dos grupos a 25°C com ou sem exposição à luz. Esses dados indicam que a oxidação não afeta diretamente os parâmetros estruturais de tamanho e polidispersão das BuNEs avaliadas, mas pode estar relacionada ao potencial zeta. Muitos dos componentes da superfície das nanoemulsões são eletricamente carregados (fosfolipídios e surfactantes). Esses compostos carregados têm maior capacidade de atrair contra-íons carregados de maneira oposta. Portanto, é possível observar a oxidação lipídica nas emulsões, manipulando o sinal e a magnitude da carga nas superfícies das gotículas (McClements & Decker, 2000). Em um estudo anterior, gotículas de uma emulsão de milho (O/A) foram carregadas negativamente, carregadas positivamente ou não carregadas pelo uso de surfactantes aniônicos, catiônicos ou não iônicos. A oxidação lipídica catalisada pelo ferro foi maior em gotículas carregadas negativamente e semelhante em gotículas carregadas ou não carregadas positivamente (Mei et al., 1998). Este resultado foi atribuído à oxidação lipídica promovida quando o pró-oxidante foi atraído eletrostaticamente para a superfície de gotículas de emulsão carregadas negativamente.

Curiosamente, o maior valor de índice de peróxido obtido no presente trabalho foi 0,0002 meq peróxido/kg. Esse valor de oxidação é considerado baixo quando comparado aos perfis de oxidação para emulsões obtidas por diferentes óleos vegetais. De fato, as nanoemulsões contêm concentrações maiores de gotículas do que as emulsões, e estudos têm mostrado aumento da oxidação da emulsão à medida que a concentração diminui (McClements & Decker, 2000). Diz-se que as emulsões

feitas com óleo de peixe estabilizado com caseinato de sódio e fosfatidilcolina têm estabilidade oxidativa e têm um valor de peróxido (PV) de 5,07 meq peróxido/kg de óleo após 12 dias de armazenamento à temperatura ambiente e escuridão total (Yesiltas et al., 2019). A estabilidade oxidativa de muitos tipos de óleos vegetais (colza, girassol, nozes, milho e palma) e seu PV calculado estão acima de 0,1 meq de peróxido/kg de óleo durante qualquer período de armazenamento à temperatura ambiente e a 40°C (Judde et al., 2003; Zeb; Murkovic, 2013). Além disso, Yesiltas e colaboradores (2019) usaram um método semelhante ao usado neste estudo (diferindo apenas método de extração), enquanto Zeb e Murkovic (2013) fizeram uso do método oficial da AOCS (método Cd 8b-90). Comparando os dados obtidos por este trabalho com os encontrados na literatura, pode-se notar que, embora exista uma diferença entre todas as condições de armazenamento, todo o grupo BuNE armazenado a 4°C no escuro foi mais estável aos processos de oxidação, embora todos os valores de oxidação sejam baixos.

O efeito da oxidação nas formulações de BuNE podem ser observados macroscopicamente, como apresentado a seguir (Figura 8).



**Figura 8.** Aspectos macroscópicos de nanoemulsões à base de óleo de Buriti (BuNE) armazenadas a 4°C, temperatura ambiente (25°C) e exposição à luz (Luz 25°C) ao longo de 60 dias.

A BuNE exposta à luz perdeu sua cor amarela ao longo das análises, sugerindo a degradação do  $\beta$ -caroteno presente no óleo de buriti (Figura 8). Outros estudos corroboram esses dados, conforme relatado que nanoemulsões à base de óleo de laranja degradam o  $\beta$ -caroteno e perdem sua coloração característica ao longo de 16 dias armazenados a 55°C (Quian et al., 2012). Esses dados indicam que os componentes do óleo vegetal estão sendo degradados ao longo do processo de oxidação. Como o óleo de buriti é conhecido por sua alta composição de carotenos e tocoferóis (Darnet et al., 2011; Ferreira et al., 2011), é possível que essas moléculas estejam desempenhando um papel antioxidante e sendo degradadas durante o processo de oxidação. Em estudos anteriores, foi levantada a hipótese de que os tocoferóis na emulsão de óleo de peixe podem formar surfactantes co-micelares, que atuam como um reservatório para os antioxidantes e podem ser liberados conforme

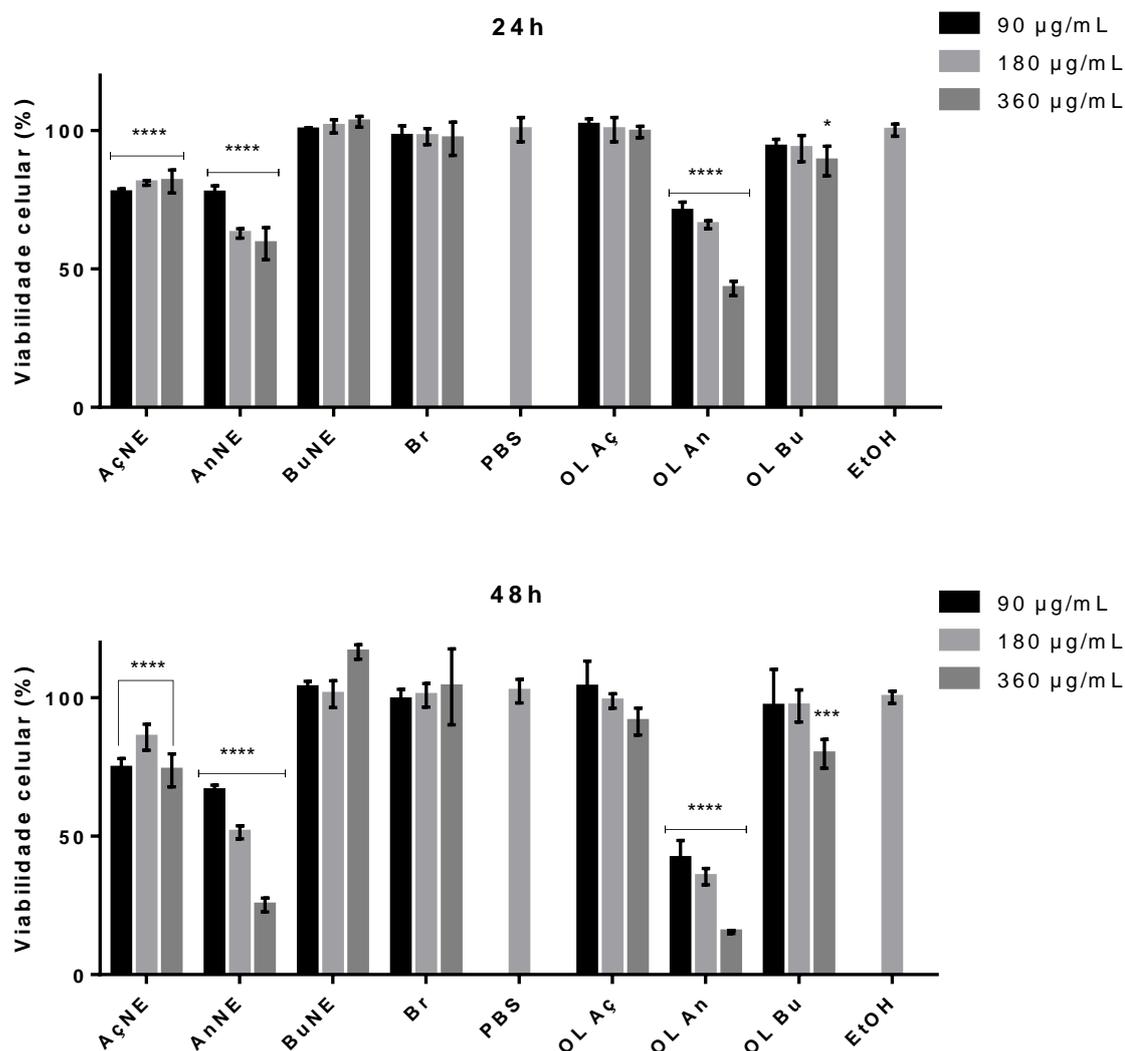
necessário para prolongar o período de latência do processo de oxidação (Kiralan et al. 2014).

## PARTE II

### 4.3 SCREENING DA CITOTOXICIDADE DE ÓLEO NATURAIS E SUAS RESPECTIVAS NANOEMULSÕES EM CÉLULAS A431

Para os ensaios *in vitro* visando o tratamento da linhagem celular de carcinoma epidermoide A431 foi realizado um *screening* de óleos naturais derivados da biodiversidade brasileira, e suas respectivas nanoemulsões. Este ensaio tem como objetivo principal a determinação da nanoformulação e concentração mais adequada de tratamento da linhagem celular em questão para prosseguir com os posteriores ensaios. Dessa forma, ensaios de MTT para determinação da citotoxicidade celular após tratamentos foram realizados utilizando os óleos livres e nanoemulsões de açaí (*Euterpe oleracea*), andiroba (*Carapa guianensis*) e buriti (*Mauritia flexuosa*). Todas as amostras foram formuladas em ambiente com pouca luz e armazenadas à 4°C para realização dos ensaios *in vitro*.

As células da linhagem A431 foram tratadas com todos os óleos e nanoemulsões supracitadas e seus respectivos controles nas concentrações de 180, 90 e 45 µg/mL nos tempos de 24 e 48 horas. Foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS) como controle das nanoemulsões e etanol (EtOH) como controle dos óleos livres, ambos representando 100% de viabilidade celular.



**Figura 9.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de óleos naturais de açaí, andiroba e buriti e suas respectivas nanoemulsões e controles nos tempos de 24 e 48 horas. Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão. Two-way ANOVA diferença significativa entre os grupos  $p < 0,05$  (pós-teste Tukey). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

É possível observar na Figura 9 que os tratamentos com óleos de buriti e açaí e suas respectivas nanoemulsões (BuNE e AçNE) apresentaram baixa atividade nos tempos de 24 e 48 horas. O óleo livre de açaí (OL Aç) não apresentou atividade significativa durante todo o tratamento em todas as concentrações testadas. Porém, quando encapsulado (AçNE) diminuiu em média 25% da viabilidade celular no último tempo de tratamento nas três concentrações testadas. O óleo livre de buriti (OL Bu) apresentou pouca atividade significativa, onde apenas a concentração de 360  $\mu\text{g/mL}$

diminuiu cerca de 20% da viabilidade celular em 48h. Já sua forma nanoestruturada (BuNE) não apresentou atividade significativa em relação ao controle em todas as condições de tratamento. Em contrapartida, o óleo livre de andiroba (OL An) demonstrou atividade significativa com tempo e dose dependência nos tratamentos e reduzindo mais de 50% de viabilidade celular na concentração de 90 µg/mL no tempo de 48h. Da mesma forma, a nanoemulsão à base de andiroba (AnNE) demonstrou atividade significativa com dose e tempo dependência nos dois tempos. A AnNE apresenta um perfil menos citotóxico quando comparada a sua forma livre. Na concentração de tratamento intermediária de 180 µg/mL no tempo de 48h, a AnNE reduziu cerca de 50% da viabilidade celular enquanto sua forma livre reduziu 65% em média. Em estudos anteriores com tratamentos baseados em óleos naturais nanoestruturados em células A431, uma nanoemulsão à base de óleo de açaí foi utilizada como fotossensibilizante para terapia fotodinâmica (TFD) e o tratamento de 24 horas com 100 µg/mL reduziu significativamente a viabilidade destas células (Ramos, 2013). Outra nanoemulsão de açaí demonstrou efeitos citotóxicos A431 em 24 horas, porém diminui o potencial citotóxico do ácido anacárdico quando foram associados (Araújo, 2017). Outro estudo utilizou nanoemulsões à base de óleo de Kalonji associada ao fármaco Tacrolimus que apresentou maior porcentagem de inibição em comparação com a droga livre, que pode ser atribuída a um efeito de penetração aumentada pela nanoformulação (Sahu et al., 2018).

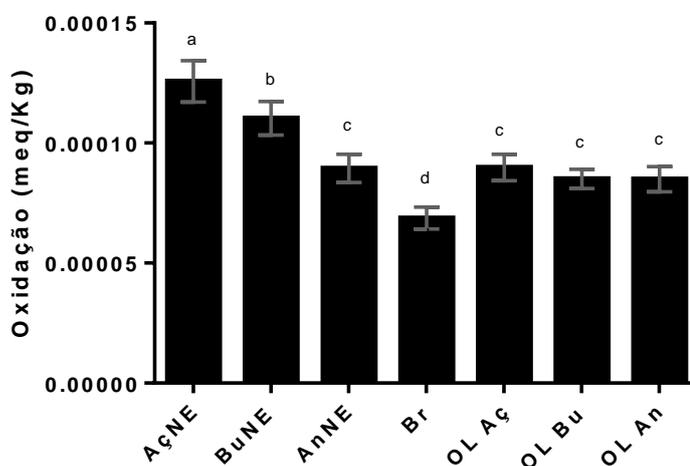
Estudos prévios com nanoemulsões à base de óleos naturais também foram previamente realizados. Células de câncer de mama MCF-7 apresentaram citotoxicidade significativa quando tratadas por 24 horas com nanoemulsão de óleo de buriti na dose de 360 µg/mL (Sampaio, 2017). Nanoemulsões à base de óleo de andiroba também foram formuladas e tiveram sua citotoxicidade testada em células de fibroblasto murinho NIH-3T3 e atividade antiparasitária contra *Trypanosoma evansi* (Milhomem-Paixão et al., 2017; Baldissera et al., 2013).

Para prosseguir com os ensaios de encapsulamento e combinação de compostos naturais, prezou-se por determinar uma condição de tratamento que reduzisse próximo a metade da viabilidade das células expostas. Dessa forma, BuNE e AçNE foram descartadas por não apresentarem atividade biologicamente significativa. Então foi determinado que a melhor condição de tratamento seria utilizar a AnNE na concentração de 180 µg/mL em 48h de exposição.

Com esses resultados, surgiu a dúvida acerca do nível de oxidação das nanoemulsões e a sua influência nos resultados de citotoxicidade. Dessa forma, para fins de confirmação da estabilidade oxidativa das amostras de óleos utilizadas para os ensaios e formulação das nanoemulsões, foram realizados novos ensaios de oxidação.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE OXIDAÇÃO DE ÓLEOS NATURAIS E SUAS NANOEMULSÕES

A determinação do nível de oxidação das amostras de óleo e nanoemulsões foi determinada da mesma forma que o primeiro ensaio de oxidação realizado com as BuNE, como determinado no item 3.3. A análise dos óleos foi realizada no dia anterior à formulação das nanoemulsões e estas foram analisadas no dia posterior. As amostras foram armazenadas em 4°C no escuro tendo em vista os resultados da primeira análise ao longo do tempo com a BuNE.



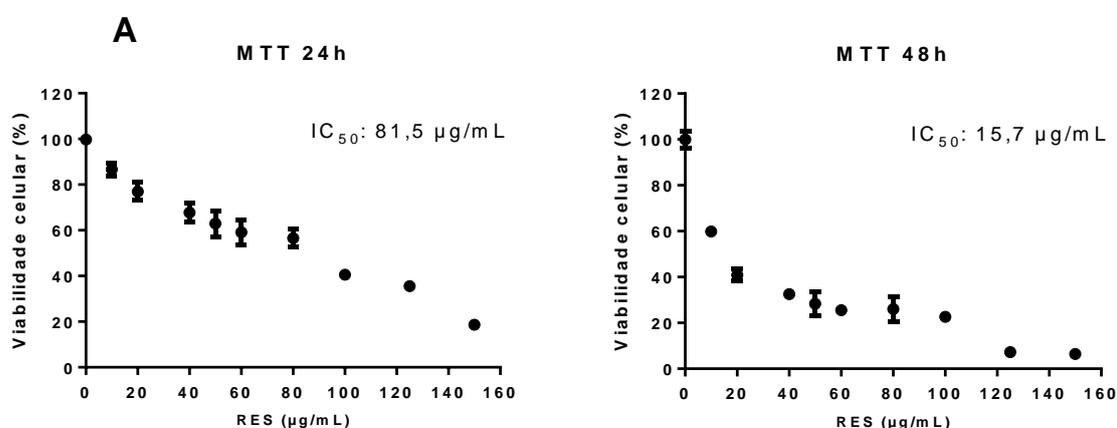
**Figura 10.** Determinação do nível de oxidação (meq/Kg) das nanoemulsões (AçNE, BuNE, PeNE, AnNE), nanoestruturas em branco (sem fase oleosa) e seus óleos livres. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos  $p < 0,05$  estão representadas por letras diferentes.

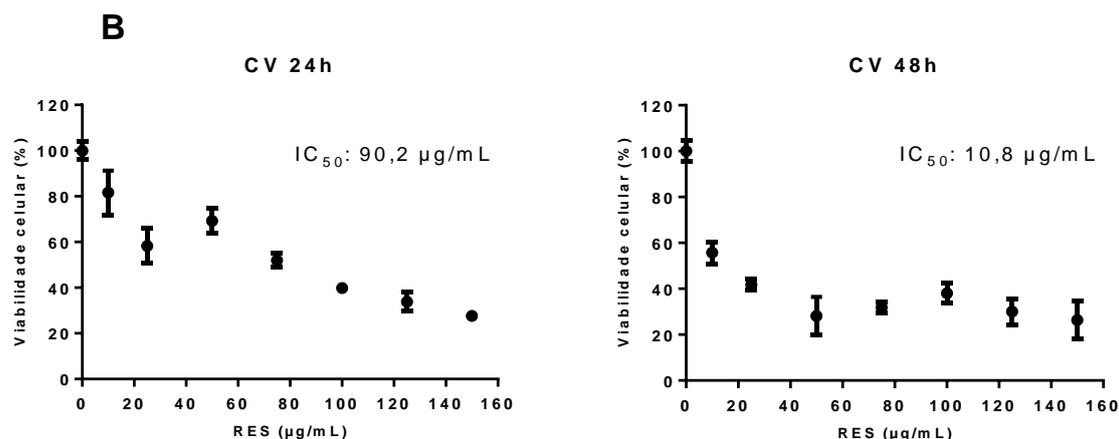
É possível inferir a partir da Figura 10 que o nível de oxidação das nanoemulsões AçNE, BuNE e PeNE foi superior ao de seus óleos livres. Os resultados da um dia das novas formulações de BuNE corroboram com as análises do primeiro

ensaio de oxidação ao longo do tempo. Apenas o óleo de AnNE não demonstrou alterações significativas de oxidação de seus óleos livres. Porém é possível observar que as nanoestruturas do branco também têm um grau de oxidação, podendo estar influenciando o resultado das nanoemulsões. Este resultado legitimou o seguimento do estudo utilizando AnNE na concentração de 180 µg/mL em 48 horas de exposição nos ensaios *in vitro*.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO IC<sub>50</sub> DO RESVERATROL EM CÉLULAS A431

Para avaliar a citotoxicidade do resveratrol (RES) nas células A431, foi realizado o ensaio de MTT. As células expostas ao tratamento com RES por 24 e 48 horas com concentrações entre 10 e 150 µg/mL de RES mostraram uma redução significativa da viabilidade celular dependente da dose e do tempo (Figura 11A). Foi possível perceber que o valor de IC<sub>50</sub> do RES foi de 81,5 µg/mL em 24 horas e IC<sub>50</sub> 15,7 µg/mL em 48 horas. Cichocki e colaboradores (2014) encontraram IC<sub>50</sub> 85,23 µM do resveratrol em no tempo de 72h em A431. Porém, estes resultados não corroboram com os achados de Zhang e colaboradores (2018), o qual determinou o valor de IC<sub>50</sub> do RES como 57,5 µg/mL em 24 horas quando tratadas na mesma linhagem celular deste estudo. Outros estudos demonstraram a dose dependência do tratamento com resveratrol com diferentes concentrações na inibição da proliferação de células A431 (Zhai et al., 2016; Kim et al., 2006; Ahmad et al., 2001).





**Figura 11.** Efeito citotóxico do resveratrol em células A431. **(A)** Ensaio MTT de células A431 tratadas com resveratrol em diferentes concentrações durante 24 e 48h. **(B)** Ensaio de Cristal Violeta de células A431 tratadas com resveratrol em diferentes concentrações durante 24 e 48h. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), pós-teste Tukey. Valor de IC<sub>50</sub> calculado a partir de regressão não linear.

O ensaio MTT é um dos testes mais populares para avaliar a atividade de potenciais compostos anticâncer, e também é o ensaio mais popular para examinar interações de compostos. Porém, segundo Bruggisser (2002), o RES pode interferir nesta técnica, reduzindo o MTT a cristais de formazan de forma independente (mesmo na ausência de células), podendo levar a resultados falso positivos para viabilidade celular. Dessa forma, existem metodologias alternativas para determinação de viabilidade celular para estes compostos (Sliwka L et al., 2016). O ensaio CV não possui as limitações que comprometem a precisão do MTT e de outros ensaios baseados em reações enzimáticas. É um ensaio simples, não enzimático, para a análise rápida da quantidade de células e colônias aderentes viáveis (Chiba, Kawakami & Tohyama, 1998). O ensaio tira proveito da afinidade entre o corante e a superfície externa da dupla hélice do DNA. A quantidade de corante absorvido depende do total do conteúdo de DNA na cultura e permite a estimativa do número de células viáveis na cultura (Sliwka L et al., 2016).

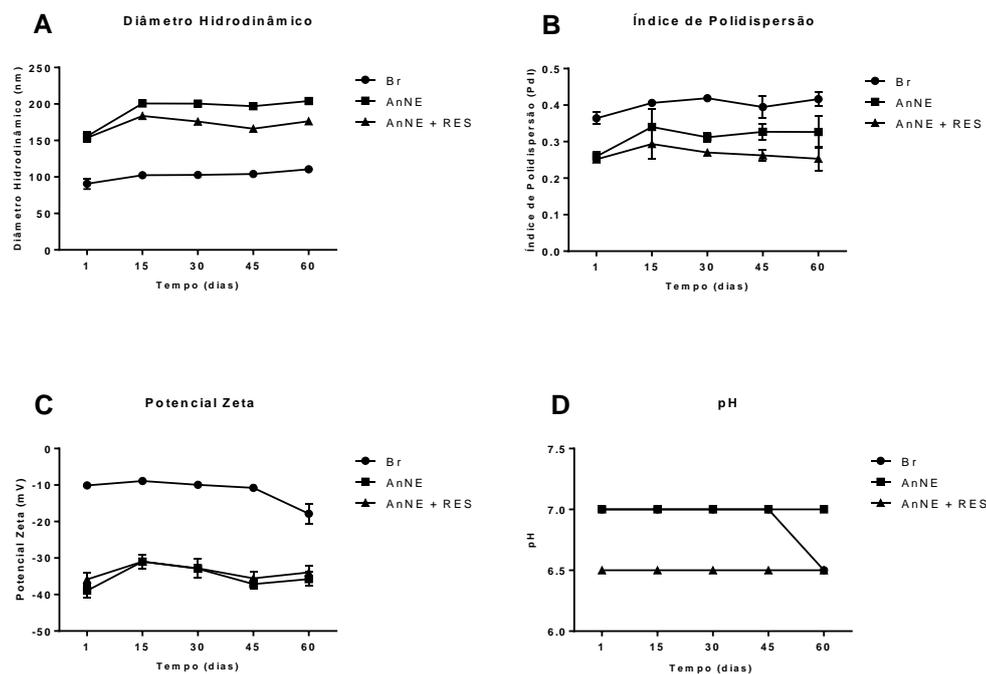
Os resultados dos testes com esta metodologia não demonstraram grandes diferenças com o ensaio de MTT no presente trabalho (Figura 11B). As células A431 foram tratadas com uma faixa de concentrações de RES entre 10 e 150 µg/mL e o IC<sub>50</sub> do tratamento de 24 horas foi de 90,2 µg/mL e 10,8 µg/mL para 48 horas. Blanquer-Rosselló e colaboradores (2017) utilizaram o ensaio CV para avaliar a

citotoxicidade do resveratrol em células de câncer colorretal SW62 e foi demonstrada uma redução de 20% da viabilidade celular com a dose mínima de 10  $\mu$ M após 48h de exposição.

A partir dos resultados encontrados, foi determinado que apenas o MTT seria utilizado para os ensaios seguintes. Assim, a concentração de 15,1  $\mu$ g/mL no tempo de 48 horas foi escolhida para ser testada no tratamento da A431 quando o RES fosse incorporado às AnNE. Portanto, novas nanoformulações foram preparadas, incluindo a nanoemulsão à base de resveratrol associada ao resveratrol (AnNE + RES), nas concentrações de 180  $\mu$ g/mL e 15  $\mu$ g/mL, respectivamente.

#### 4.6 ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE ANDIROBA ASSOCIADAS AO RESVERATROL NO TRATAMENTO DE CÉLULAS A431

Para o preparo das AnNE + RES foi utilizada a metodologia descrita no item 3.1. As nanoformulações foram então preparadas pelo mesmo método utilizando rotaevaporação para facilitar a incorporação do resveratrol, um composto hidrofóbico, nas nanogotículas da AnNE. Depois de formuladas, todas as formulações (incluindo a nanoestrutura em branco) foram armazenadas por 60 dias ao abrigo de luz em temperatura a 4°C e foi mensurado o seu diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, potencial zeta, potencial hidrogeniônico a cada 15 dias (Figura 12).



**Figura 12.** Avaliação da estabilidade de nanoformulações a base de óleo de andiroba, com ou sem resveratrol (AnNE) ou sem óleo de andiroba (Branco) ao longo de 60 dias com armazenamento a 4°C. Foram avaliados parâmetros como diâmetro hidrodinâmico (A), índice de polidispersão (B), potencial zeta (C) e pH (D). Valores representados pela média  $\pm$  desvio-padrão.

A AnNE apresentou DH de 150 nm e variou até 200 nm ao longo da análise. A AnNE + RES apresentou o DH de 150 nm ao início do ensaio e teve uma variação até 170 nm em média. A nanoestrutura em branco apresentou menor DH e ficou na média de 100 nm durante a análise. O menor tamanho dessa formulação se dá pela falta de gotículas de óleo no sistema fazendo com que a lecitina forme pequenas estruturas lipossomais. Oliveira (2008) produziu uma nanoemulsão baseada em óleo de andiroba visando o combate do mosquito *Aedes aegypti*, usando método de baixa energia e o DH obtido foi 236 nm. Baldissera e colaboradores (2013) desenvolveram uma nanoemulsão à base de óleo de andiroba com DH entre 129,3 nm a 240,3 nm.

A variação de Pdl das amostras AnNE foi entre a média de 0,25 a 0,32 ao longo dos 60 dias de análise. A nanoemulsão associada ao resveratrol demonstrou um índice de polidispersão com médias de 0,25 até o último dia de análise. As duas amostras indicam um padrão de monodispersão de suas gotículas. É relatado na literatura que valores de polidispersão acima de 0,5 indicam ampla distribuição do

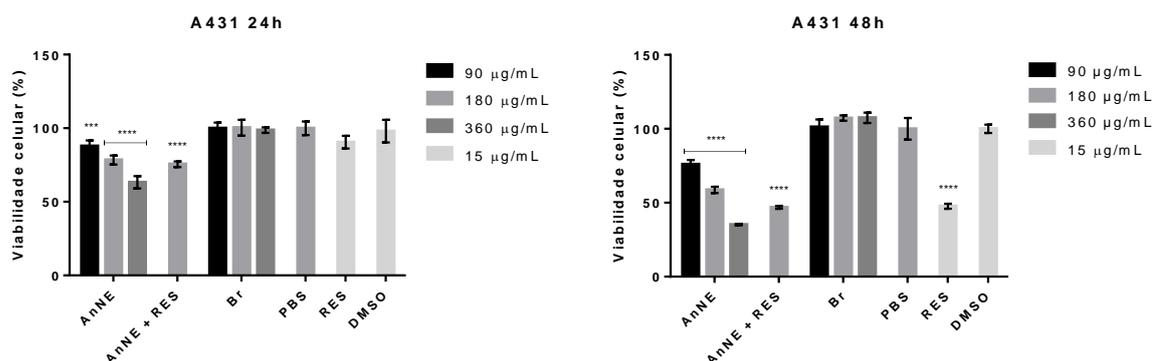
tamanho das gotículas no sistema, podendo resultar em agregação, caracterizando instabilidade (Nayak et al., 2015).

Em relação a análise do potencial zeta das amostras, tanto AnNE quanto AnNE+RES, apresentaram pouca variação, tendo média de -35 mV durante as análises, demonstrando assim a estabilidade coloidal da formulação. As gotículas que apresentam altas cargas negativas se repulsam, evitando agregação e também podem interagir melhor com células uma vez que possuem carga positiva em sua membrana plasmática (Freitas & Müller, 1998).

O pH das formulações se manteve estável durante todo o experimento. A AnNE se manteve com pH neutro enquanto a AnNE + RES apresentou pH 6,5. Este último valor por ser advindo da própria solução de resveratrol (diluído em DMSO) para a formulação da nanoemulsão associada a este composto.

#### 4.7 CITOTOXICIDADE DA COMBINAÇÃO AnNE + RES EM A431

O ensaio de MTT foi realizado a partir do tratamento de células A431 com as nanoformulações de andiroba com e sem associação ao resveratrol. Desse modo, as células foram tratadas com os grupos AnNE, AnNE + RES, Br e RES livre. As concentrações de AnNE testadas foram de 360, 180 e 90 µg/mL, enquanto o tratamento de AnNE + RES apenas 180 µg/mL de óleo associado a 15 µg/mL de resveratrol. Da mesma forma, o RES livre apenas foi testado na concentração de 15 µg/mL. Foram utilizados os controles PBS e DMSO representando 100% de viabilidade celular.



**Figura 13.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (15 µM) por 24 e 48 h. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), pós-teste Tukey.

Na Figura 13 é possível perceber que no tratamento de 24 horas, AnNE nas três concentrações testadas apresentaram diferenças significativas quando comparado ao controle. A citotoxicidade destas amostras são dose dependentes, tendo uma redução de 40% de viabilidade celular na maior concentração de tratamento. A formulação AnNE + RES, na qual possui concentração de 180 µg/mL de óleo de andiroba e 15 µg/mL de resveratrol, teve a mesma citotoxicidade que a formulação sem resveratrol na mesma concentração de óleo, reduzindo apenas 20% de viabilidade celular.

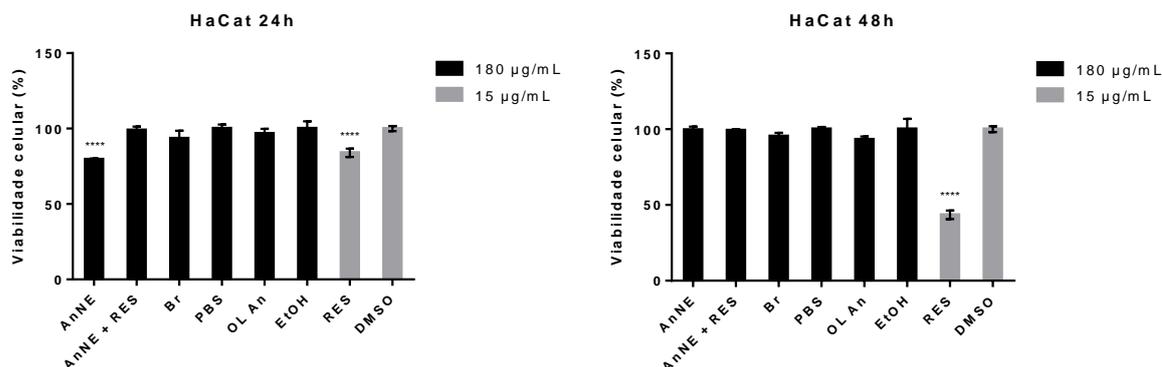
Em 48 horas de tratamento a concentração de 180 µg/mL de AnNE foi suficiente para reduzir 45% da viabilidade celular, corroborando com o primeiro teste realizado para o screening de óleos do item 4.3. O RES livre reduziu 50% da viabilidade celular, estando de acordo com os experimentos para determinação do  $IC_{50}$  do composto nas células. A amostra de AnNE + RES demonstrou uma redução de aproximadamente 10% a mais da viabilidade quando comparada a nanoformulação sem o resveratrol. Apesar de não ter sido um aumento biologicamente significativo, espera-se que a melhora do desempenho da nanoemulsão de andiroba associada ao resveratrol seja advinda da combinação dos tratamentos, uma vez que quando encapsulado, um composto pode ter sua atividade citotóxica potencializada devido a melhor entrega e interação com as células, características advindas das nanoestruturas (Figueiras, Coimbra & Veiga, 2014). Este fato pode ser observado no estudo de Carletto et al. (2016), no qual nanocápsulas carregadas com resveratrol

reduziram significativamente a viabilidade das células de câncer de pele melanoma B16F10 em todos os tempos de tratamento estudados em comparação com o controle sem resveratrol e o resveratrol livre. Outro estudo concluiu que células de câncer de próstata LNCaP tratadas com nanopartículas de resveratrol sofreram mais efeitos citotóxicos em comparação com o resveratrol livre em todas as concentrações testadas (Nassir et al., 2018)

Diante dos achados ainda se faz necessário a realização de experimentos relacionados a avaliação da taxa de encapsulamento do RES na AnNE e posteriores testes de combinação para determinar se há relações de adição, sinergismo ou até mesmo antagonismo entre os efeitos da AnNE e o RES quando associados.

#### 4.8 CITOTOXICIDADE DA COMBINAÇÃO AnNE + RES EM HaCat

As células HaCat são queratinócitos humanos imortalizados que são utilizados em ensaios como modelo de células não cancerosas. O ensaio de MTT foi realizado a partir do tratamento de células HaCat com as nanoformulações de andiroba com e sem associação ao resveratrol. Desse modo, as células foram tratadas com os grupos AnNE, AnNE + RES, Br e RES livre. As concentrações de AnNE testadas foram de 180 µg/mL, o tratamento de AnNE + RES com 180 µg/mL de óleo associado a 15 µg/mL de resveratrol. Da mesma forma, o RES livre apenas foi testado na concentração de 15 µg/mL. Foram utilizados os controles PBS e DMSO representando 100% de viabilidade celular.

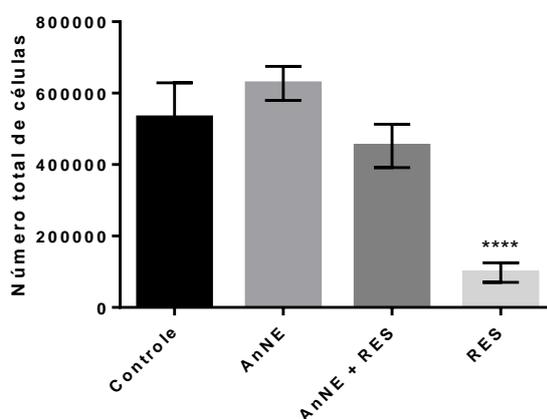


**Figura 14.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat) submetidas a tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (15 µM) por 24 e 48h. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), pós-teste Tukey.

Com exceção dos tratamentos com resveratrol livre, os mesmos tratamentos que demonstraram citotoxicidade nas células A431, não se mostraram tão significativos nas células HaCat (Figura 14). O RES reduziu cerca de 60% de viabilidade celular das células normais no tempo de 48 horas. Estudos anteriores realizaram tratamentos do resveratrol livre em células HaCat determinando o valor de  $IC_{50}$  de 70,8 µg/mL para estas células em 24 horas de tratamento (Zhang et al., 2018). No presente trabalho, os demais tratamentos nanoestruturados com ou sem associação ao resveratrol (AnNE e AnNE + RES) não foram estatisticamente significativos quando comparados ao controle. Nesta análise foi incluída o tratamento com OL An que também não demonstrou citotoxicidade em nenhuma das condições de tratamento realizadas. Esses dados inferem que os tratamentos nanoestruturados podem se tornar mais específicos às células cancerosas, uma vez que não se observa efeito em células normais. Desse modo, sugere-se que em um tratamento usual no organismo humano, células normais não seriam agredidas pelos tratamentos que nas mesmas concentrações demonstram efeitos apenas com células cancerosas. Sendo assim, pode-se hipotetizar que o tratamento poderia conferir maior segurança de tratamento e menos efeitos colaterais, sendo este último muito comum nos tratamentos atuais de quimioterápicos que agredem células normais ao mesmo tempo que tratam as células cancerosas.

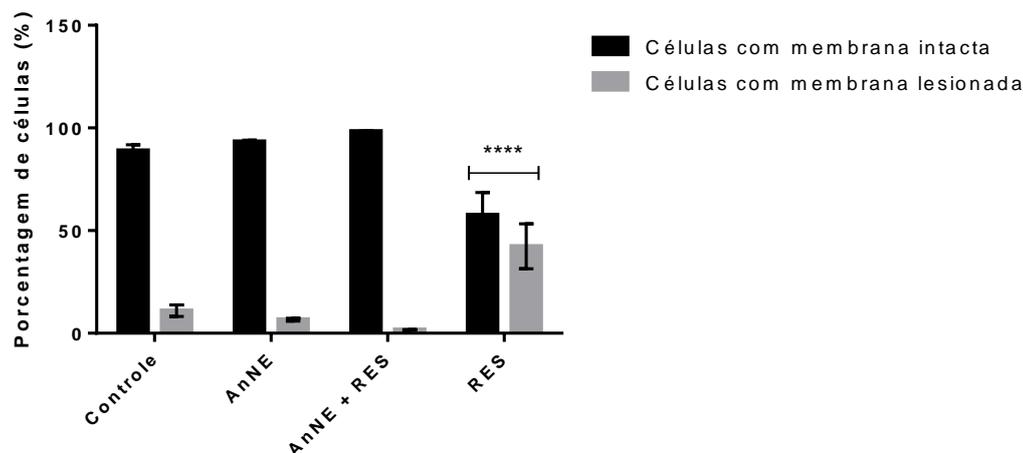
#### 4.9 AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS A431

Para avaliar os efeitos da AnNE, AnNE + RES e RES nas concentrações de 180 µg/mL para a AnNE e de 15 µg/mL para RES, na integridade de membrana e na proliferação celular das células A431 após 48 horas de exposição, foi utilizado o ensaio de azul de tripan. O PBS foi utilizado como controle.



**Figura 15.** Avaliação por Azul de tripan do número total de células de carcinoma epidermóide (A431) após exposição por 48 horas à nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol e os controles. Contagem das células em câmara de Neubauer. Teste ANOVA, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , pós-teste Tukey.

Após 48 horas de tratamento (Figura 15), é possível observar que apenas o tratamento com RES livre diminuiu significativamente (80%) o número total de células. Os tratamentos com AnNE e AnNE + RES não demonstram o mesmo resultado e não vão de acordo com a citotoxicidade demonstrada nos ensaios de MTT realizados.

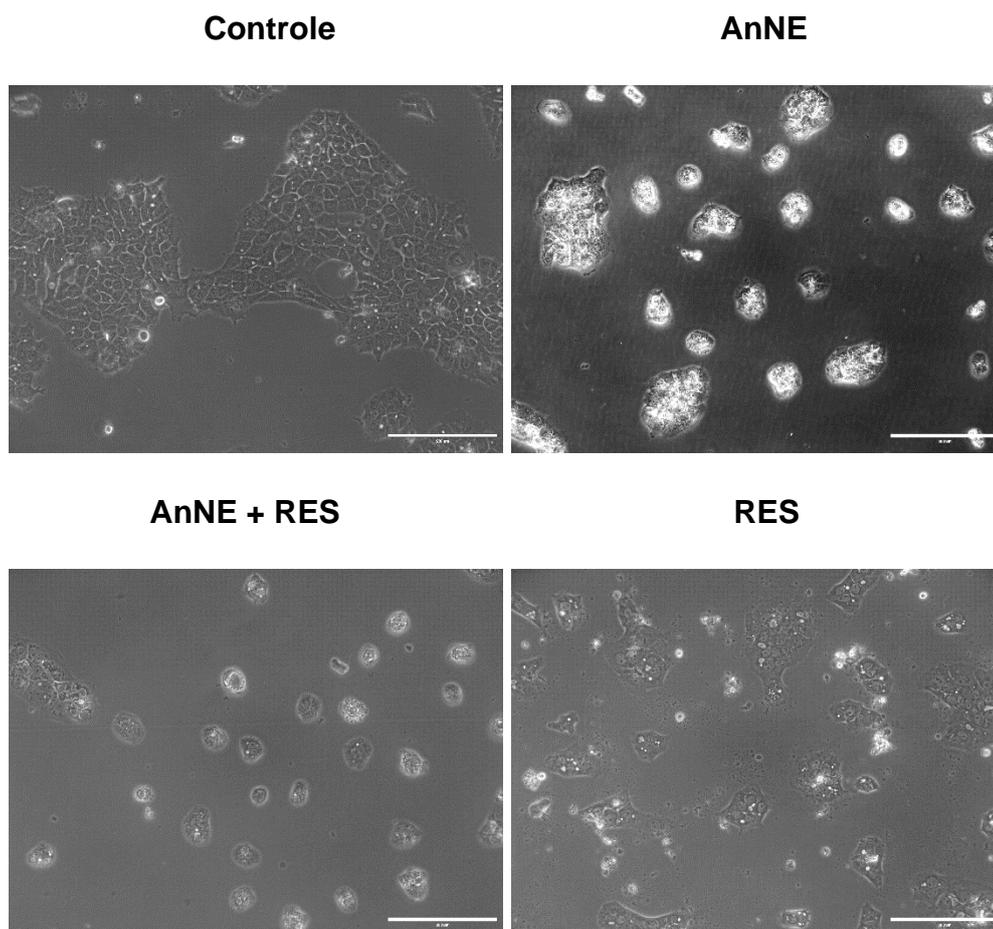


**Figura 16.** Avaliação da integridade da membrana plasmática de células de carcinoma epidermóide (A431) após exposição por 48 horas à nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol e os controles. Contagem das células em câmara de Neubauer. Teste one way ANOVA, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , pós-teste Tukey.

Da mesma forma, o tratamento com RES livre aumentou o número de células com membrana lesionada (40%, Figura 16) e corrobora com resultados do MTT. Porém os outros tratamentos (AnNE e AnNE + RES) não demonstraram diferença significativa do controle e diferem dos resultados de citotoxicidade realizados.

#### 4.10 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS A431 APÓS EXPOSIÇÃO A AnNE, AnNE + RES e RES

Após 48 horas dos tratamentos com AnNE, AnNE + RES e RES em suas determinadas concentrações, as células A431 foram submetidas a análise morfológica por microscopia de contraste de fase. O PBS foi utilizado como controle.



**Figura 17.** Análise morfológica de células de carcinoma epidermóide não melanoma (A431). As células foram expostas aos tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180  $\mu\text{g/mL}$  das nanoemulsões e 15  $\mu\text{g/mL}$  de resveratrol. O tampão fosfato foi usado como controle. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .

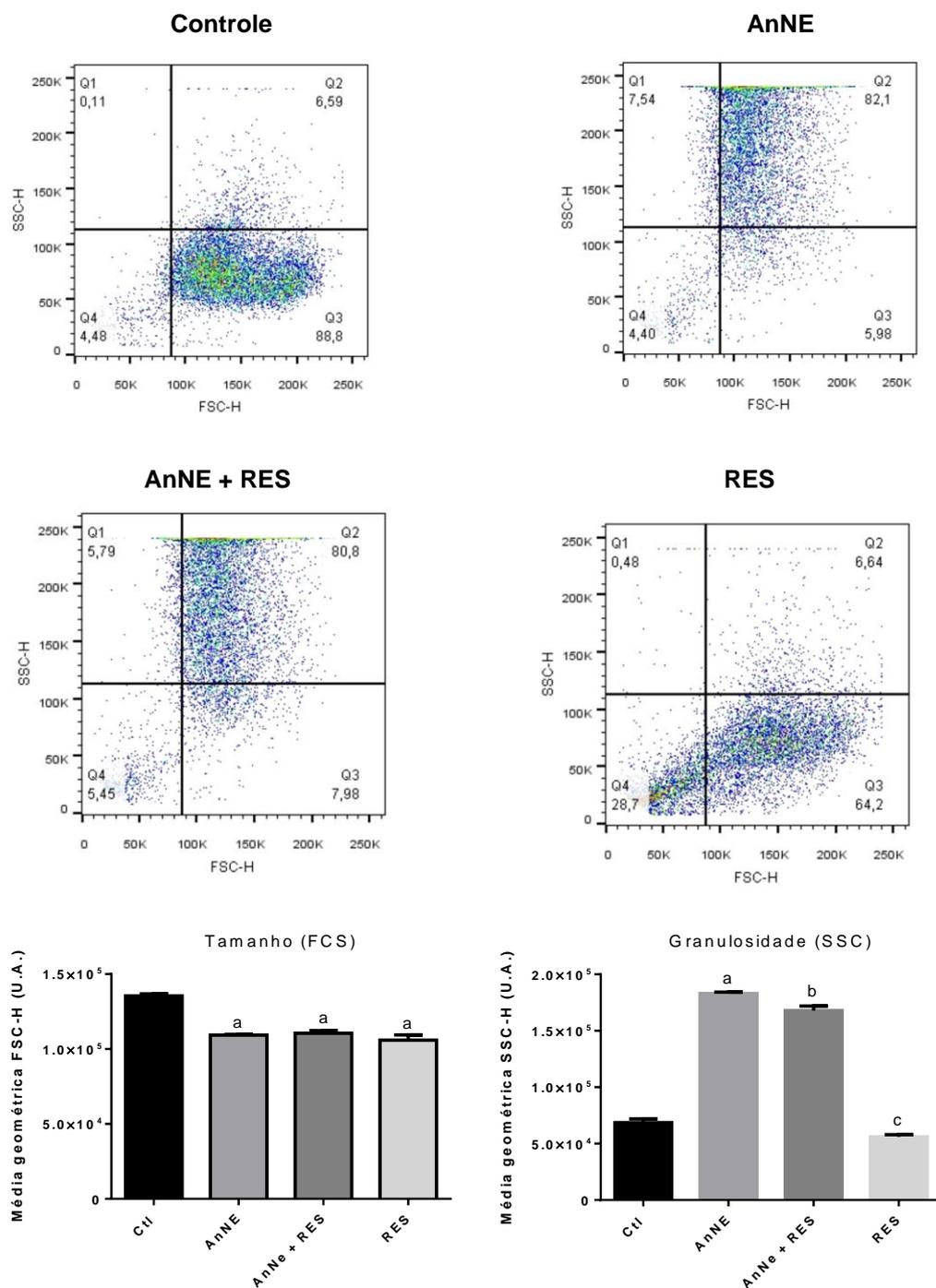
Na Figura 17 é possível perceber que o grupo de células tratadas com o controle PBS formaram grandes colônias, com poucos vacúolos, demonstrando a morfologia considerada normal para esta linhagem. Em comparação ao controle, as células tratadas com AnNE formaram colônias menores com muitos grânulos aparentes. O mesmo efeito ocorreu nas células tratadas com AnNE + RES, porém com colônias ainda menores. Diferente dos outros tratamentos, a exposição ao RES não alterou a granulosidade das células, porém a morfologia das células se mostrou diferente, onde não havia delimitação entre as células dentro de uma mesma colônia. As visíveis diferenças morfológicas aparentes após os tratamentos com nanoestruturas e o resveratrol livre sugerem que os efeitos de cada grupo são resultados de interações diferentes e possíveis mecanismos de ação em alvos

diferentes. O RES induziu mesmas alterações morfológicas que em outras células cancerosas (Sanjay et al., 2018).

#### 4.11 ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)

Afim de inferir os mecanismos de ação das amostras utilizadas no tratamento da linhagem celular A431, análises por citometria de fluxo foram realizadas. Este método permite estabelecer a morfologia das células de acordo com seu tamanho (FSC-C) e a granulosidade (SSC-H), determinar tipo de morte celular, fragmentação de DNA, ciclo celular e outros parâmetros.

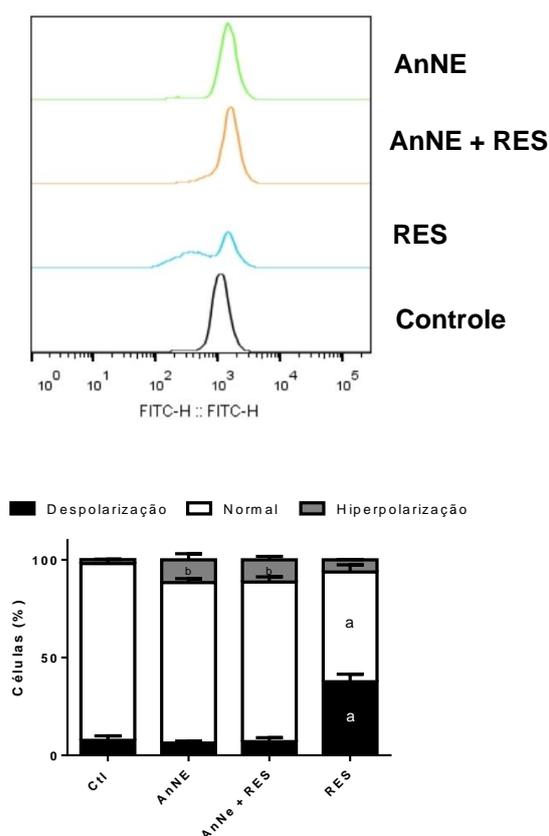
#### 4.11.1 Morfologia celular (tamanho e granulosidade)



**Figura 18.** Representação da alteração de parâmetros de tamanho (FCS) e granularidade (SSC) a partir de dot plot e média geométrica das células A431 após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol. Legenda: tamanho (FSC-H) e granularidade (SSC-H). Teste ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes ( $p < 0,0001$ ).

É possível inferir a partir da Figura 18 que os tratamentos com AnNE e AnNE + RES induziram os mesmos efeitos nas células. Houve diminuição significativa do tamanho e grande aumento de granulosidade. Tal aumento pode estar relacionado à associação e/ou internalização das nanogotículas nas células. Gabor e colaboradores (2008) mostraram que há uma correlação na associação de nanopartículas às células de mamíferos e o parâmetro SSC, sugerindo que um aumento no mesmo pode indicar melhor incorporação de nanopartículas. O tratamento com RES também diminuiu o tamanho das células, porém apresentou menor alteração de granulosidade, quando comparado ao controle. Todos os resultados apresentados neste ensaio corroboram com a análise morfológica por microscopia de contraste de fase apresentada no item 4.10.

#### 4.11.2 Potencial De Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

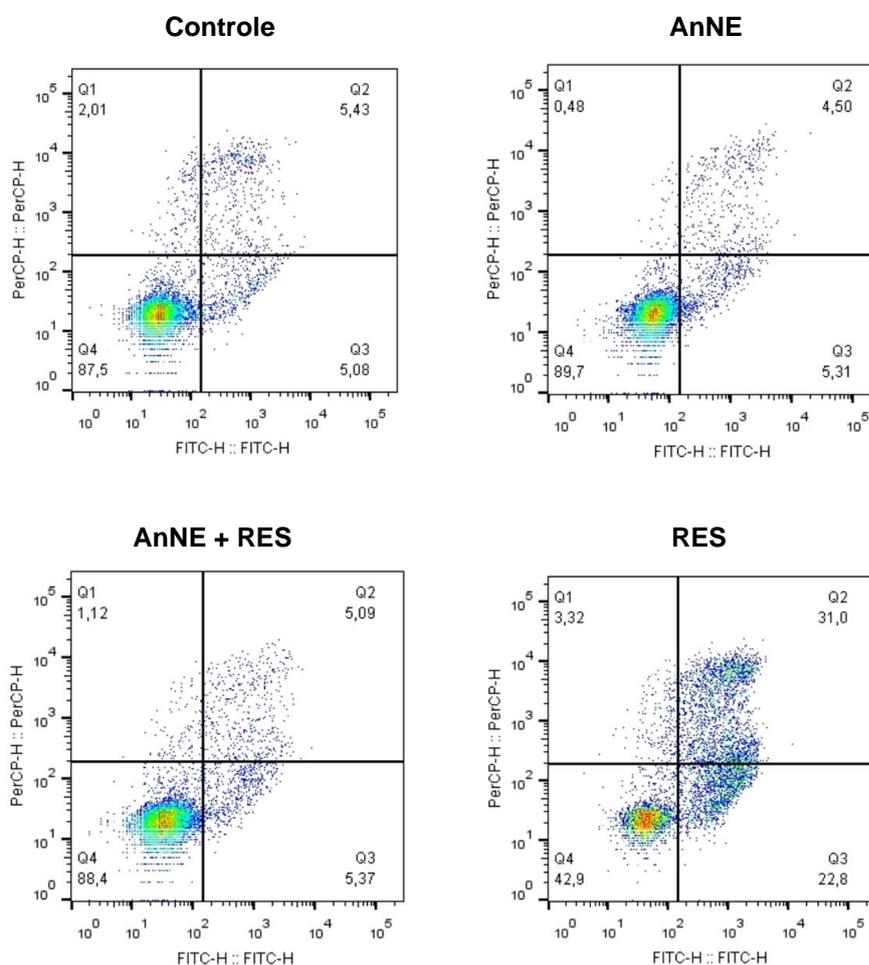


**Figura 19.** Avaliação e representação do Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) a partir da média geométrica após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das nanoemulsões e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de resveratrol. Test ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes ( $p < 0,001$ ).

Após 48 horas de exposição (Figura 19), observou-se que houve hiperpolarização significativa das membranas mitocondriais em células expostas ao RES. Esta hiperpolarização aumenta as possibilidades de maior formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar danos às células (Pereira, 2015). Quando há hiperpolarização da membrana mitocondrial, há um excesso de carga negativa dentro desta organela. Como consequência há lesão e ruptura desta membrana, o que gera toda uma sinalização molecular de apoptose e, por fim, a morte da célula (Ly, Grubb & Lawen, 2003). Portanto, é possível que tais alterações mitocondriais observadas no grupo tratado com RES resulte em morte por apoptose.

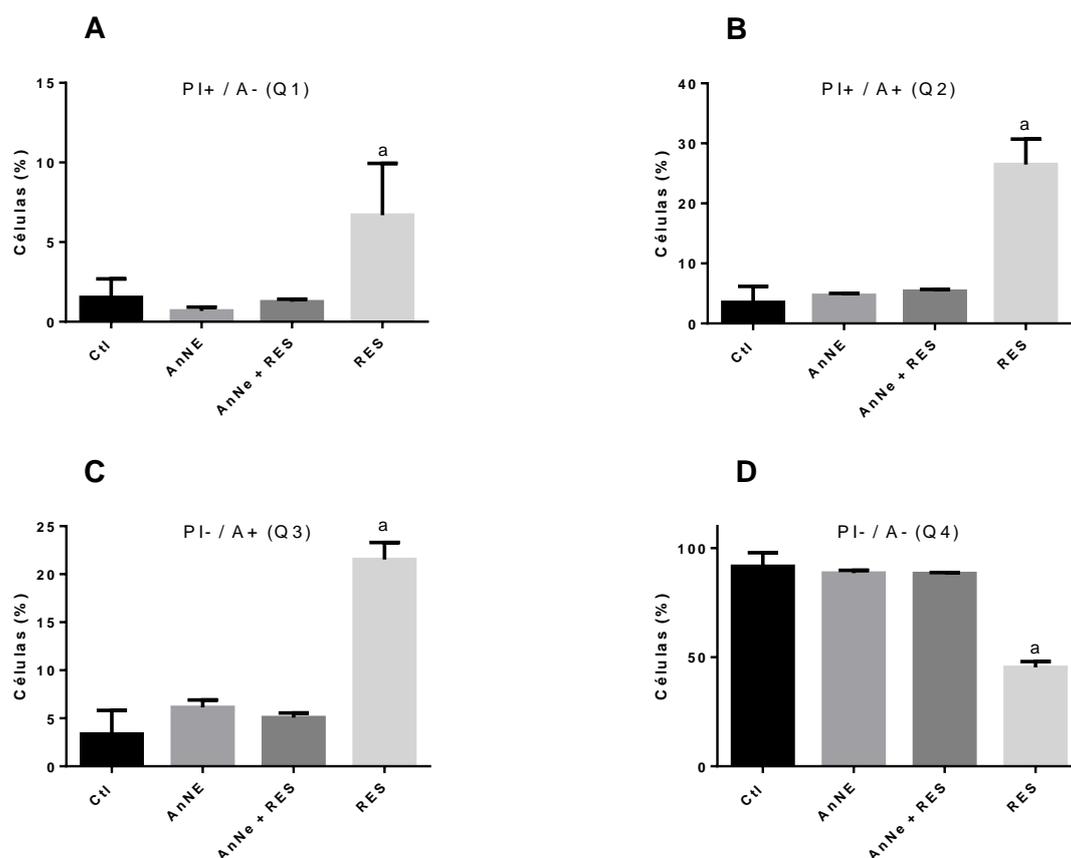
#### **4.11.3 Análise da morte celular a partir da exposição da fosfatidilserina**

Após 48 horas de exposição às AnNE, AnNE + RES e RES, as células foram marcadas por Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo (Figura 20). A detecção da marcação por Anexina-V é representada pelo eixo X e a detecção do PI corresponde ao eixo Y. Os gráficos dot plots estão divididos em quatro quadrantes: O quadrante 1 (Q1) representa as células marcadas apenas com o PI; o Q2 representa as células marcadas com o PI e com a Anexina-V; o Q3 representa as células marcadas apenas com a Anexina-V e o Q4 representa as células não marcadas. Essa divisão foi utilizada como padrão para determinar a marcação das células após os diferentes tratamentos.



**Figura 20.** Dot plot da avaliação de morte celular de células carcinoma epidermóide A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 48 horas de exposição a nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180  $\mu\text{g/mL}$  das nanoemulsões e 15  $\mu\text{g/mL}$  de resveratrol.

Nota-se que não há alterações dos padrões de marcação dos tratamentos com nanoemulsões associadas ou não ao resveratrol quando comparadas ao controle. Após exposição ao RES livre, nota-se o aumento de 26% das células com dupla marcação no quadrante Q2 e aumento de 17% de células marcadas apenas com Anexina V e média de 5% de aumento de células marcadas apenas com PI.



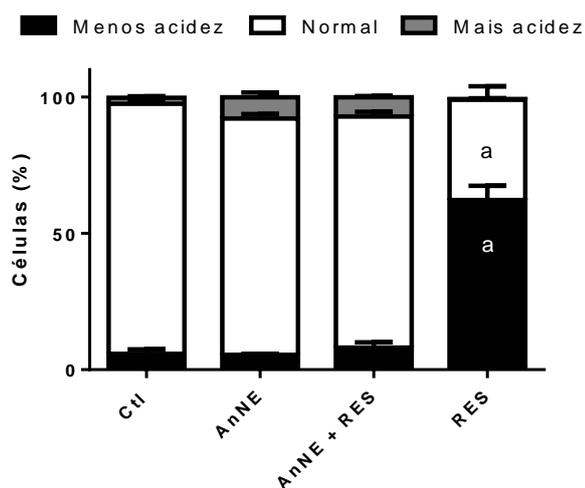
**Figura 21.** Avaliação da morte celular em linhagem de carcinoma epidermoide A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo após exposição a AnNE, AnNE + RES e RES nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol. Marcação positiva por Anexina-V: A+; marcação negativa por Anexina-V: A-; marcação positivo por Iodeto de propídeo: PI+ e marcação negativo por PI: PI-. Os gráficos representam cada quadrante: Q1: Células mortas por necrose (A-, PI+) **(A)**; Q2: Células em estágio de apoptose tardia (A+, PI+) **(B)**; Q3: Células em estágios iniciais de apoptose (A+, PI-) **(C)** e Q4: Células não apoptóticas ou viáveis (A-, PI-) **(D)**. O PBS e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram utilizados como controles. Teste ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes (p<0,001).

A diferença entre células marcadas ou não também está descrita na Figura 21. Apenas o grupo de células expostas ao RES livre demonstrou um perfil de marcação significativamente diferente do controle. Estes dados sugerem que a maioria das células sofreu apoptose devido à marcação da anexina, que indica que há exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática. Este dado corrobora com o ensaio de citotoxicidade celular, e indica que a redução na viabilidade das células tratadas por RES está relacionada à ativação de processos de morte celular. Por outro lado, a falta de marcação de anexina ou Iodeto de propídeo dos grupos tratados com AnNE e AnNE + RES indica que a redução na viabilidade celular

anteriormente observada no ensaio de MTT não está associada a ativação de processos de apoptose.

#### 4.11.4 Permeabilidade da Membrana do Lisossomo

Os lisossomos são vesículas membranosas envolvidas na digestão de macromoléculas. Eles contêm enzimas hidrolíticas caracterizadas por ótima atividade em um ambiente ácido (aproximadamente pH 5). O pH do citoplasma é geralmente ligeiramente alcalino (pH 7,2), assim, manter o baixo pH dos lisossomos requer energia (Pierzyńska-Mach, Janowski, & Dobrucki, 2014). A técnica utilizada com laranja de acridina neste trabalho é dependente do aprisionamento deste composto nas vesículas membranosas, que são impulsionadas pelo baixo pH de seu interior.



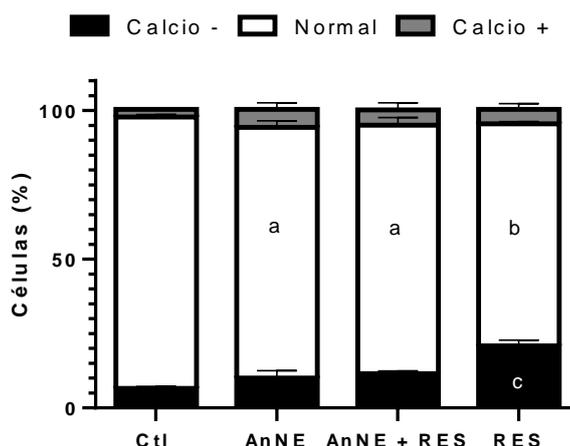
**Figura 22.** Avaliação e representação da acidez de lisossomos a partir do aprisionamento de laranja de acridina por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol. Teste ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes ( $p < 0,001$ ).

A Figura 22 mostra que apenas o tratamento com RES apresentou diferenças significativas em relação aos lisossomos das células tratadas. Neste grupo houve a diminuição do acúmulo do laranja de acridina na região lisossômica, caracterizando a diminuição da acidez desta organela ou que a mesma teve lise em sua membrana. Este processo pode ativar mecanismos de morte celular. A morte celular mais característica por alteração dos lisossomos é conhecida como autofagia. A autofagia é caracterizada por acúmulo citosólico de autofagossomos. Uma característica única

autofagia é a degradação e reciclagem de componentes celulares (proteínas e organelas) defeituosas, visando diminuir agregação no citoplasma (Wiman & Zhivotovsky, 2017; Luzio et al., 2007). Alguns estudos descrevem o resveratrol como indutor de autofagia através da ativação da sirtuína 1 (SIRT1), uma desacetilase conhecida capaz de promover autofagia através da desacetilação de ATG5, ATG7 e ATG8 (Wiman & Zhivotovsky, 2017). Os tratamentos anticarcinogênicos podem causar a autofagia excessiva e atuar como um processo precedente ao mecanismo de apoptose em células MCF-7 (Cui et al., 2007).

#### **4.11.5 Níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

O retículo endoplasmático (RE) é uma das principais organelas celulares e está envolvido na síntese, modificação e enovelamento de proteínas, a homeostase do cálcio intracelular e a síntese/metabolismo de lipídios. O funcionamento do RE é dependente de um ambiente oxidativo, principalmente para manter os níveis de Ca<sup>2+</sup> adequados (Ghosh, Nandi & Basu, 2019). A privação de nutrientes, variações no nível de cálcio e estresse oxidativo podem induzir uma condição de estresse que, por sua vez, poderá ativar vias de transdução de sinal intracelulares na tentativa de manter a homeostase celular, conhecida como *Unfolded Protein Response* (UPR). Quando há excesso de estresse essa mesma via se torna pró-apoptótica (Zhu et al., 2020). Neste ensaio, o Fluo-4 verde fluorescente ligado ao éster acetoximetílico (Fluo-4/AM) foi utilizado para determinar o nível intracelular de Ca<sup>2+</sup>.

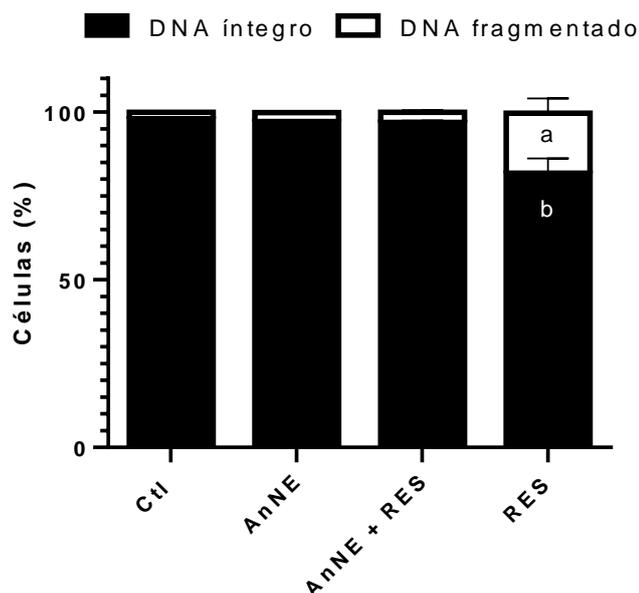


**Figura 23.** Avaliação e representação do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a partir da marcação com Fluo-4/AM por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das nanoemulsões e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de resveratrol por 48 horas. Teste ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes ( $p < 0,001$ ).

Novamente os grupos tratados com AnNE e AnNE + RES não apresentaram alterações no nível de cálcio intracelular (Figura 23), indicando que o mecanismo de ação não está diretamente ligado com o RE. O tratamento com RES apresentou diferença significativa do cálcio intracelular, dando indicativos discretos (diferença de 10% em relação ao controle) de estresse do retículo endoplasmático e possível contribuição na ativação de processos de morte celular.

#### 4.11.6 Fragmentação de DNA

Na análise da fragmentação de DNA apresentado na Figura 24 observa-se que apenas o grupo de células tratadas por 48 horas com RES apresentou fragmentação de DNA.

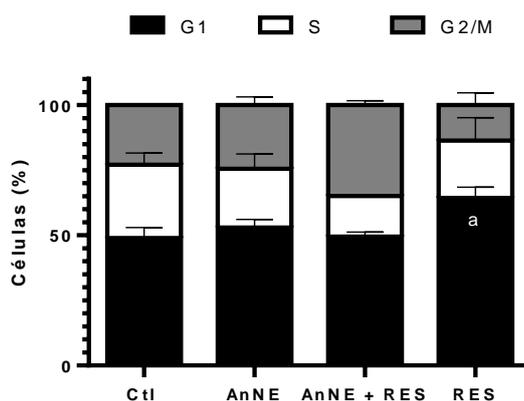


**Figura 24.** Avaliação e representação de fragmentação de DNA, a partir da marcação com iodeto de propídio por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com nanoemulsão a base de óleo de andiroba (AnNE) com ou sem resveratrol (RES) nas concentrações de 180 µg/mL das nanoemulsões e 15 µg/mL de resveratrol. Teste ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes ( $p < 0,001$ ).

Este resultado reforça mais uma vez que o perfil de morte celular analisado no grupo RES esteja relacionado à apoptose, uma vez que a fragmentação deste ácido nucleico é um indício do processo de apoptose celular. Da mesma forma, Kumar e colaboradores (2018) determinou que células de adenocarcinoma da próstata de camundongos (TRAMP) sofreram fragmentação de DNA após tratadas com 50 e 100 µM de RES por 16 horas.

#### 4.11.7 Ciclo celular

No ensaio de análise do ciclo celular Figura 25, observou-se uma tendência de alteração e bloqueio do ciclo na fase G2 para o grupo AnNE + RES. Apesar disso, os tratamentos com nanoemulsão à base de óleo de andiroba e sua associação ao resveratrol não apresentaram alterações significativas na mudança do padrão do ciclo celular em relação ao controle negativo PBS. O tratamento com o controle negativo água apresentou 50% das células na fase G1, 25% de células na fase S e 25% das células nesta fase do ciclo celular, aproximadamente. O tratamento com resveratrol livre apresentou um aumento de 15% das células aprisionadas no estágio G1 do ciclo celular.



**Figura 25.** Avaliação do ciclo celular das células A431 por citometria de fluxo após diferentes tratamentos com AnNE, AnNE + RES e RES nas concentrações de 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das nanoemulsões e 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de resveratrol. Teste ANOVA, diferença significativa quando comparado com o grupo controle está representada por letras diferentes ( $p < 0,001$ ).

Em estudos com outras linhagens celulares o resveratrol inibiu a proliferação celular de maneira dependente da concentração (25, 50 e 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) e tempo (24, 48 e 72h) de exposição em células A549 induzindo a interrupção do ciclo celular na fase G1 via regulação positiva de p21 e ativação da p53 (Yuan et al., 2015). Em células HCT-116wt, todos os análogos do resveratrol apenas induzem parada do ciclo celular na concentração de  $\geq 40 \mu\text{M}$  e após 24h de tratamento (Wang et al., 2017). As células SGC-7901 quando tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de resveratrol, as proporções de células paradas na fase S aumentam 35% quando comparadas às células do grupo controle na fase S (Wu et al., 2018).

Apesar de AnNE e AnNE + RES apresentaram o mesmo perfil de citotoxicidade no experimento de MTT, reduzindo 50% da viabilidade celular das células A431, visíveis alterações morfológicas e aumento da granulosidade, não foi possível observar efeitos nos demais ensaios avaliados. O resveratrol demonstrou efeitos citotóxicos em todos os ensaios realizados. Estes achados nos levam a pensar que os efeitos do resveratrol e do óleo de andiroba em nanoemulsão ocorrem por vias diferenciadas e causando diversas alterações celulares. Porém, quando associados em nanoemulsão, o resveratrol parece ter sua atividade anulada pela nanoemulsão ou até mesmo o encapsulamento é responsável por entregar o resveratrol em locais onde não há ação tão eficaz quanto o RES livre. Então, a combinação AnNE + RES mantém o mesmo perfil de citotoxicidade quando comparada aos tratamentos

separados. Porém, a AnNE + RES protege células HaCat da citotoxicidade do RES, sugerindo especificidade de ação em células cancerosas. Repetições dos experimentos em citometria de fluxo e novos experimentos de clonogenicidade celular e índice de encapsulamento serão necessários para melhor elucidação dos efeitos da AnNE nas células e se a associação AnNE + RES se torna mais eficaz que os dois tratamentos realizados de forma independente.

## 5 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. As BuNE formuladas apresentam DH 119,1 nm, Pdl 0,3 e PZ -30 mV. Quando submetidas à diferentes condições de armazenamento ao longo de 60 dias (4°C, 25°C e Luz 25°C), os parâmetros de DH e Pdl são estáveis em todas as condições. A amostra BuNE Luz (25°C) é a condição que apresentou mais instabilidade de PZ ao longo do tempo.
2. A BuNE diminui seus valores de pH nas condições de 25°C e Luz (25°C), passando de soluções neutras (pH 7) a ácidas (pH 5) em 60 dias de monitoramento. A variação de pH das BuNE armazenadas a 4°C é a menor entre as condições testadas.
3. BuNE Luz (25°C) é amostra que mais oxida ao longo de 60 dias de análise, enquanto a BuNE 4°C é a mais estável. A instabilidade oxidativa se relacionam com parâmetros físico-químicos no que diz respeito a alterações de pH e PZ. Desta forma, conclui-se que a melhor condição para armazenamento destas nanoemulsões é 4°C no escuro.
4. Dentre as nanoemulsões testadas em células A431, a AnNE apresenta citotoxicidade de forma dose e tempo dependente e reduz cerca de 50% da viabilidade celular na concentração de tratamento intermediária de 180 ug/mL em 48 horas de exposição. BuNE e AçNE apresentam baixa ou nenhuma atividade.
5. O resveratrol não interfere no ensaio de MTT, uma vez que os resultados do ensaio de cristal violeta não são divergentes. O resveratrol apresenta atividade dose e tempo dependente e reduz 50% da viabilidade celular em células A431 em 48 horas de exposição na concentração de 15 µg/mL.
6. A AnNE + RES apresenta DH 150 nm, Pdl 0,25 e PZ -35 mV e estes parâmetros não variam significativamente ao longo de 60 dias de análise.

7. A AnNE + RES não apresenta aumento significativo da citotoxicidade quando comparada aos tratamentos separados em células A431 nas concentrações de exposição durante 48 horas.

8. Em testes com células HaCat, o RES livre reduz 60% de viabilidade. Porém, as amostras AnNE, AnNE + RES não apresentam atividade citotóxica nesta linhagem com 48 horas de exposição. Mostrando que estas amostras tem atividade preferencial por células tumorais.

9. Após 48 hora de exposição, AnNE e AnNE + RES alteram a morfologia celular da A431, diminuindo o seu tamanho e aumentando o nível de granularidade. O tratamento com RES também diminui o tamanho das células, porém causa menor alteração de granulosidade.

10. A AnNE e AnNE + RES não alteram a proliferação celular, não causam lesão de membrana plasmática, não aumentam a taxa de DNA fragmentado, não param o ciclo celular, não mostram alterações na membrana dos lisossomos e nem alteram os níveis de  $Ca^{2+}$  das células A431. Porém, causam uma leve hiperpolarização da membrana mitocondrial após 48 horas de exposição.

11. O tratamento de A431 com 15  $\mu\text{g/mL}$  e 48 horas de exposição com RES livre demonstra respostas apoptóticas, induz lesão de membrana plasmática, reduz a proliferação celular, aumenta a taxa de DNA fragmentado, aumenta a proporção de células em fase G1 e aumenta a depolarização da membrana mitocondrial. Além disso, diminui a acidez dos lisossomos e aumenta o nível da  $Ca^{2+}$  intracelular.

## 6 REFERÊNCIAS

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI). Panorama Nanotecnologia. Série Cadernos da Indústria ABDI – Volume XIX. Brasília, 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. — Guia para Realização de Estudos de Estabilidade.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Carapa guianensis* Aubl. (ANDIROBA). Ministério da Saúde, 2015.

Agrawal N, Maddikeri GL, Pandit AB. Sustained release formulations of citronella oil nanoemulsion using cavitation techniques. *Ultrason Sonochem*. 2017 May;36:367–74.

Ahmad N et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res*. 2001 May;7(5):1466-73.

Al-Orf SM. Effect of oxidized phosphatidylcholine on biomarkers of oxidative stress in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2011 Apr;26(2):154-60. doi: 10.1007/s12291-010-0064-4.

American Cancer Society. What is câncer? <<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>>. Acesso em: 2019.

Amri A et al. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release*. 2012 Mar 10;158(2):182-93. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.083.

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

Araújo HLL. Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, in vitro. 2017. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília.

Batista JS et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*, 42(1), 136-141, 2012.

Baldissera MD et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: in vitro tests. *Experimental parasitology*, 134(3), 356-361. 2013.

Bhandari PR, Pai VV. Novel medical strategies combating nonmelanoma skin cancer. *Indian J Dermatol*. 2014 Nov;59(6):531-46. doi: 10.4103/0019-5154.143503.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016 Aug;235:337–51.

Bhattacharya S, Darjatmoko SR, Polans AS. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Res*. 2011 Jun;21(3):180-7. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283456dfc.

Blanquer-Rosselló MD et al. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017 Feb;1861(2):431-440. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.009.

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 2008 Oct 27;27(50):6434-51. doi: 10.1038/onc.2008.310.

Bruggisser, R et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta medica*, 68(05), 445-448. 2002.

Bruxel F et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química nova*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 35, n. 9 (2012), p.1827-1840.

Cadioli LP & Salla LD. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. *Revista de Ciências exatas e tecnologia*. 2006.1(1), 98-105.

Cappy A, Stievenard D & Vuillaume D. Nanotechnology: the Next Industrial Revolution? 2002.

Carletto B et al. Resveratrol-loaded nanocapsules inhibit murine melanoma tumor growth. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Aug 1;144:65-72. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.001. Epub 2016 Apr 2.

Carvalho JCT. Fitoterápicos: anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. *Tecmedd*. 2004.

Chen BH, Hsieh CH, Tsai SY, Wang CY, Wang CC. Anticancer effects of epigallocatechin-3-gallate nanoemulsion on lung cancer cells through the activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Sci Rep*. 2020 Mar 20;10(1):5163.

Chen W; Yang H. Progression of anticancer mechanism of resveratrol. *Int. J. Pathol. Clin. Med*. 2014; 28: 403–407.

Chiba K., Kawakami K., & Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol In Vitro*. 1998 Jun 1;12(3):251-8.

Chicaro CF. Análise da expressão da proteína NF-KappaB antes e depois do tratamento com Dexametasona e os óleos de Copaíba e Andiroba em cultura de

células de Carcinoma Epidermóide Bucal. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Cichocki M et al. The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on EGFR and Stat3 activation in human HaCaT and A431 cells *Mol Cell Biochem.* 2014; 396(1-2): 221–228. Published online 2014 Jul 26. doi: 10.1007/s11010-014-2157-5.

Choe E., & Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(4), 169-186. 2006.

Chung SS et al. Combination of resveratrol and 5-fluorouracil enhanced anti-telomerase activity and apoptosis by inhibiting STAT3 and Akt signaling pathways in human colorectal cancer cells. *Oncotarget.* 2018 Aug 31;9(68):32943-32957. doi: 10.18632/oncotarget.25993. eCollection 2018 Aug 31.

Cui Q et al. T. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Biol Pharm Bull.* 2007 May;30(5):859-64.

Darnet SH., Silva LHMD., Rodrigues, AMDC., & Lins RT. Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. *Food Science and Technology*, 31(2), 488-491. 2011.

Dimer FA., Friedrich RB, Beck, RC, Guterres SS, & Pohlmann AR. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. 2013, *Quím Nov*, 36(10), 1520-1526.

Ferreira ALA., & Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, 43(1), 61-68. 1997.

Ferreira BS. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules.* 2011 Jul 13;16(7):5875-85. doi: 10.3390/molecules16075875.

Fialho LL. Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Figueiras ARR., Coimbra AB., & Veiga FJB. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. *Boletim Informativo Geum.* 2014. 5(2), 14.

Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017 May 1;7(5):1016-1036. Review.

Freitas C., & Müller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. *International journal of pharmaceuticals*, 168(2), 221-229. 1998.

Fuentes E et al. *Mauritia flexuosa* presents in vitro and in vivo antiplatelet and antithrombotic activities. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:653257. doi: 10.1155/2013/653257.

Gabor, F et al. Characterization of binding and uptake of biomimetic nanoparticles by flow cytometry. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 18(1), 51-57. 2008.

Garner DL et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. 1997 Dec;57(6):1401-6.

Gee KR et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*. 2000 Feb;27(2):97-106.

Gilmore MP., Endress BA. & Horn CM. The socio-cultural importance of *Mauritia flexuosa* palm swamps (aguajales) and implications for multi-use management in two Maijuna communities of the Peruvian Amazon. 2013. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9(1), 29.

Grintzalis K, Zisimopoulos D, Grune T, Weber D, Georgiou CD. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*. 2013 Jun;59:27-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.038.

Guimarães, LG. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). *Química nova*, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

Ghosh C., Nandi A., & Basu S. Lipid Nanoparticle-Mediated Induction of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer Cells. *ACS Applied Bio Materials*, 2(9), 3992-4001. 2019.

Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*. 2016 Mar 21;12(11):2826-41. doi: 10.1039/c5sm02958a.

Gurgel-Gonçalves R, Palma AR, Motta PC, Bar ME, Cuba CA. Arthropods associated with the crown of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) palm trees in three different environments from Brazilian Cerrado. *Neotrop Entomol*. 2006 May-Jun;35(3):302-12.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Heiduschka G et al. Resveratrol synergistically enhances the effect of etoposide in HNSCC cell lines. *Acta Otolaryngol*. 2014 Oct;134(10):1071-8. doi: 10.3109/00016489.2014.888592.

INCA. O que é câncer? Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso: 2019.

INCA. Câncer de pele não melanoma - INCA. 2020. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso 2020.

Jang M et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997 Jan 10;275(5297):218-20.

Kargar M, Spyropoulos F, Norton IT. The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *J Colloid Interface Sci*. 2011 May 15;357(2):527-33. doi: 10.1016/j.jcis.2011.02.019.

Key J, Leary JF. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. *Int J Nanomedicine*. 2014 Jan 29;9:711-26. doi: 10.2147/IJN.S53717

Kenfack, D. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogenetic context. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 165(2), 186-221. 2011.

Kheawfu K, Pikulkaew S, Rades T, Müllertz A, Okonogi S. Development and characterization of clove oil nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018 Aug;46:330–8.

Kim AL et al. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. *Exp Dermatol*. 2006 Jul;15(7):538-46.

Kiralan SS. Increased antioxidant efficacy of tocopherols by surfactant solubilization in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*. 2014 Oct 29;62(43):10561-6. doi: 10.1021/jf503115j.

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

Kumar S et al. Resveratrol induces mitochondria-mediated, caspase-independent apoptosis in murine prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):20895-20908. doi: 10.18632/oncotarget.14947.

Leary JF. Nanotechnology: what is it and why is small so big? *Can J Ophthalmol*. 2010 Oct;45(5):449-56. doi: 10.3129/i10-089.

Lima ES; Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, set./dez., 2001.

Lollo G., Rodríguez GR., Torres D., & Alonso M. J. Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, vol. 77, n. 4, 2011.

Luzio JP et al. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Aug;8(8):622-32. Review.

Ly JD, Grubb DR, & Lawen A. The mitochondrial membrane potential in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003 Mar;8(2):115-28.

Manhães, Luciana Ribeiro Trajano. Caracterização da polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*, Mart.) com vista sua utilização como alimento funcional. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2007.

Maragheh AD, Tabrizi MH, Karimi E, Seyedi SMR, Khatamian N. Producing the sour cherry pit oil nanoemulsion and evaluation of its anti-cancer effects on both breast cancer murine model and MCF-7 cell line. *J Microencapsul*. 2019 Jun;36(4):399-409.

Martins RC., Filgueiras TS., & Ulysses, P. Ethnobotany of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) in a maroon community in central Brazil. *Economic Botany*. 2012, 66(1), 91-98.

McClements, DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter* 8.6: 1719-1729. 2012.

McClements DJ., & Decker EA. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of food science*, 65(8), 1270-1282. 2000.

Mei L, McClements DJ., Wu J., & Decker EA. Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. *Food chemistry*, 61(3), 307-312. 1998.

Melo Filho AB.; Vasconcelos MAS. *Química dos Alimentos*. 2016.

Mignani S et al. Advances in combination therapies based on nanoparticles for efficacious cancer treatment: an analytical report. *Biomacromolecules*. 2015 Jan 12;16(1):1-27. doi: 10.1021/bm501285t.

Milhomem-Paixão SSR. et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aublet) nanoemulsions: development and assessment of cytotoxicity, genotoxicity, and hematotoxicity. *Journal of Nanomaterials*, 2017.

Miranda Júnior RNC, Dolabela MF, Silva MNd, Póvoa MM, Maia JGS. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;142(3):679-83.

Monge-Fuentes V et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2017 Jan;166:301–10.

Mostafa NM. Antibacterial Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) Leaves Essential Oil Nanoemulsion against the Cariogenic *Streptococcus mutans*. *J Appl Pharm Sci*. 2018 Sep;8(9):34–41.

Muraina IA, Suleiman MM, Eloff JN. Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts? *Phytomedicine*. 2009 Jun;16(6-7):665-8. doi: 10.1016/j.phymed.2008.11.005.

Nassir AM et al. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles mediated programmed cell death in prostate cancer cells. *Saudi Pharm J.* 2018 Sep;26(6):876-885.

Nayak D., Pradhan S., Ashe S., Rauta PR., & Nayak, B.. Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431 carcinoma. *Journal of colloid and interface science*, 457, 329-338. 2015.

O'Collins VE et al. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Apr;32(4):585-97. doi: 10.1038/jcbfm.2011.203.

Oliveira BRD. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2008.

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

OMS (Organização Mundial da Saúde). Non-melanoma skin cancers: health effects of UV radiation. Disponível em <[https://www.who.int/uv/health/uv\\_health2/en/index1.html](https://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html)>. Acesso 2020.

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007 Dec;2(12):751-60. doi: 10.1038/nnano.2007.387.

Pereira B. Biogênese mitocondrial e exercício físico: hipótese do acoplamento elétrico-transcripcional. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*, 29(4), 687-703. 2015.

Pierzyńska-Mach A., Janowski PA., & Dobrucki JW. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry Part A*, 85(8), 729-737. 2014.

Qian C et al. Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chem.* 2012 Jun 1;132(3):1221-1229. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.091.

Rai VK et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release.* 2018 Jan 28;270:203-225. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.049.

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

Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther.* 2003 Jul;99(1):1-13.

Repetto, M; Boveris, A; Semprine, J. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2012.

Tatar AS, Nagy-Simon T, Tomuleasa C, Boca S, Astilean S. Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. *J Control Release*. 2016 Sep 28;238:123-138. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.035.

Sadurní N, Solans C, Azemar N, García-Celma MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*. 2005 Dec;26(5):438-45.

Sahu S et al. Active natural oil-based nanoemulsion containing tacrolimus for synergistic antipsoriatic efficacy. *Nanomedicine (Lond)*. 2018 Aug;13(16):1985-1998. doi: 10.2217/nnm-2018-0135.

Sakamoto A et al. Andriolides Q-V from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Fitoterapia*. 2013 Oct;90:20-9. doi: 10.1016/j.fitote.2013.07.001.

Sanjay K et al. Resveratrol induces mitochondria-mediated, caspase-independent apoptosis in murine prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Mar 28; 8(13): 20895–20908. Published online 2017 Feb 1. doi: 10.18632/oncotarget.14947.

Sampaio MC. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama in vitro. 2017. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília.

Schiassi MCEV et al. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chem*. 2018 Apr 15;245:305-311. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.104.

Shantha NC, Decker EA. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int*. 1994 Mar-Apr;77(2):421-4.

Shukla M et al. A combination of complexation and self-nanoemulsifying drug delivery system for enhancing oral bioavailability and anticancer efficacy of curcumin. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017 May;43(5):847-861.

Singh KK, Vingkar SK. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. *Int J Pharm*. 2008 Jan 22;347(1-2):136-43.

Sliwka L et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One*. 2016 May 19;11(5):e0155772. doi: 10.1371/journal.pone.0155772.

Tagne JB, Kakumanu S, Ortiz D, Shea T, Nicolosi RJ. A nanoemulsion formulation of tamoxifen increases its efficacy in a breast cancer cell line. *Mol Pharm*. 2008 Mar-Apr;5(2):280-6. doi: 10.1021/mp700091j.

Uner M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie*. 2006 May;61(5):375-86.

Wang S et al. Growth-Inhibiting Activity of Resveratrol Imine Analogs on Tumor Cells in vitro. *PLoS One*. 2017 Jan 23;12(1):e0170502. doi: 10.1371/journal.pone.0170502. eCollection 2017.

Wiman KG; Zhivotovsky B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J Intern Med*. 2017 May;281(5):483-495. doi: 10.1111/joim.12609.

Wongsagonsup R., Shobsngob S., Oonkhanond, B., & Varavinit, S. Zeta potential ( $\zeta$ ) analysis for the determination of protein content in rice flour. *Starch-Stärke*, 57(1), 25-31. 2005.

Wu et al. Resveratrol induces apoptosis in SGC-7901 gastric cancer cells. *Oncol Lett*. 2018 Sep;16(3):2949-2956.

Yesiltas B et al. Physical and oxidative stability of high fat fish oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate and phosphatidylcholine as emulsifiers. *Food Chem*. 2019 Mar 15;276:110-118. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.172.

Yuan L et al. Resveratrol induces cell cycle arrest via a p53-independent pathway in A549 cells. *Mol Med Rep*. 2015 Apr;11(4):2459-64. doi: 10.3892/mmr.2014.3100.

Zhang X et al. Resveratrol enhances the effects of ALA-PDT on skin squamous cells A431 through p38/ MAPK signaling pathway. *Cancer Biomark*. 2018;21(4):797-803. doi: 10.3233/CBM-170495.

Zanon, AB. Aspecto Teórico e prático sobre a avaliação da estabilidade de emulsão manipuladas em farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

Zeb, A., & Murkovic, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of  $\beta$ -carotene in corn oil triacylglycerols. *Food research international*, 50(2), 534-544. 2013.

Zhai XX et al. Effects of resveratrol on the proliferation, apoptosis and telomerase ability of human A431 epidermoid carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2016 May;11(5):3015-3018.

Zhu H et al. Pifithrin- $\mu$  incorporated in gold nanoparticle amplifies pro-apoptotic unfolded protein response cascades to potentiate synergistic glioblastoma therapy. *Biomaterials*. 2020 Feb;232:119677. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119677.



## DECLARAÇÃO

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.

A obra foi elaborada pelos:

**Organizadores: Graziella Anselmo Joanitti; Ricardo Bentes de Azevedo; Paulo César de Moraes**

### **PARTE I: MATERIAIS - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS**

- *Nanopartículas de ouro: métodos clássicos de obtenção e caracterização:*  
*Claire N. Lunardi; Fellipy S. Rocha; Anderson J. Gomes*

- *Nanoemulsões: preparação, características e estabilidade*  
*Lucas C. Silva, Leonardo O. B. Silva, Graziella A. Joanitti*

- *Lipossomas e suas aplicações*  
*Jaqueline R. Da Silva; Jaqueline V. Oliveira; Victor Hugo S Araujo*

- *Síntese verde de nanomateriais*  
*Luciano P. Silva; Beatriz S. Carvalho; Cíntia C. Bonatto; Júlia M. Pupe; Tatiane M. Pereira; Thalita F. Araujo*



EDITORA



UnB

UnB 33  
CIÊNCIA E OUSADIA



- *Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura como ferramentas de caracterização de nanossistemas*

*Tatiane Oliveira dos Santos, Renata Pereira Montenegro Igo*

## **PARTE II: APLICAÇÕES EM SAÚDE**

- *Aplicações da nanotecnologia em câncer*

*Marcela Landim, Alicia S. Ombredane, Graziella A. Joanitti*

- *Magnetohipertermia aplicada no tratamento de câncer*

*Ailton Sousa-Junior; Harley Rodrigues; Marcus Carrião; Elisângela Silveira-Lacerda; Andris Bakuzis*

- *Aplicações da nanotecnologia em tratamentos antivirais*

*Andréia C. Pinheiro; Beatriz C. A. O. Faria; Patrícia L. Costa, Marília F. Calmon, Graziella A. Joanitti*

- *Nanotecnologia aplicada para tratamentos de cicatrização e regeneração tecidual*

*Marcella L. B. Carneiro; Glécia V. S. Luz; Christian R. Q. Quijia; Thamis F. Santana; Luna A. N. de Carvalho; Lourdes M. Brasil*

- *Aplicação oftalmológica da nanotecnologia*

*Maíra N. Pereira; Marcilio Cunha-Filho; Tais Gratieri; Guilherme M. Gelfuso*

- *Aplicações da nanotecnologia em distúrbios e patologias cutâneas*

*Patrícia Mazureki Campos; Fabíola Silva Garcia Praça; Marcelo Henrique Kravicz*

## **PARTE III: MEIO AMBIENTE**

- *Nanotecnologias para descontaminação de águas*

*Alex Fabiano Cortez Campos*

**Brasília, 22 de outubro de 2019.**

**GERMANA HENRIQUES PEREIRA**

DIRETORA

EDITORA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

## CAPÍTULO X

---

# NANOEMULSÕES: PREPARAÇÃO, CARACTERÍSTICAS E ESTABILIDADE

Lucas C. Silva<sup>1,2</sup>, Leonardo O. B. Silva<sup>1,2</sup>, Graziella A. Joanitti<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil

\* Email: bygra1@gmail.com

Está representada aqui apenas a primeira página do capítulo do livro por questões de futura publicação.

### Resumo

Nanoemulsões são nanosistemas formados por uma dispersão de líquidos imiscíveis, associados a tensoativos. Ou seja, líquidos com coeficiente de solubilidade tão baixo que a mistura pode ser considerada heterogênea (óleo e água, por exemplo). As nanogotículas formadas em escala nanométrica apresentam propriedades químicas, físicas e biológicas diferentes de uma gotícula de composição igual na escala macro/micrométrica. O tensoativo é responsável por diminuir a tensão superficial entre as fases (oleosa e aquosa) e possibilitar a formação das nanogotículas. Neste capítulo são apresentados os tipos de nanoemulsões, bem como seus métodos de formulação, caracterização e estudo de estabilidade gravitacional, oxidativa e eletrostática. Além disso, métodos de mudança de superfície e da importância da utilização do tensoativo ideal para a formulação também serão discutidos.

### 1. Nanotecnologia e nanoemulsões

A nanotecnologia é a ciência conduzida em escala nanométrica ( $10^{-9}$  m), em que muitas propriedades químicas, físicas e mecânicas dos materiais mudam significativamente. Ao discutir as propriedades que caracterizam a escala nanométrica, pode-se, então, pensar em outras formas de utilizá-las para desenvolver novas tecnologias<sup>1</sup>. Neste contexto, nanoestruturas carreadoras são materiais em escala nanométrica que podem realizar o transporte de fármacos, agentes de imagem e/ou compostos bioativos. Dentre os nanocarreadores mais estudados pode-se citar, nanotubos de carbono, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de ouro e nanocarreadores baseados em lipídios, tais como lipossomas e nanoemulsões<sup>2</sup>.

As nanoemulsões são um tipo de nanosistema que são dispersões coloidais de líquidos imiscíveis, do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), estabilizadas por um surfactante que contribui para a manutenção do tamanho e propriedades em nanoescala ( $10^{-9}$  m). Eles possuem uma alta área de superfície/volume e podem ser utilizados para aumentar a chegada de fármacos em determinado local, promovendo a liberação sustentada destes e minimizando sua degradação<sup>1</sup>.