



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**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*.**

Henrique Loback Lopes de Araújo

BRASÍLIA

2017

HENRIQUE LOBACK LOPES DE ARAÚJO

EFEITOS DE COMBINAÇÕES ENTRE O ÁCIDO ANACÁRDICO DERIVADO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (*Anacardium occidentale*) E O ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.), LIVRES OU NANOESTRUTURADOS, NO TRATAMENTO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA, *IN VITRO*.

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

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI

BRASÍLIA

2017

HENRIQUE LOBACK LOPES DE ARAÚJO

EFEITOS DE COMBINAÇÕES ENTRE O ÁCIDO ANACÁRDICO DERIVADO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (*Anacardium occidentale*) E O ÓLEO DE AÇÁÍ (*Euterpe oleracea* Mart.), LIVRES OU NANOESTRUTURADOS, NO TRATAMENTO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA, *IN VITRO*.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Graziella Anselmo Joanitti

(Orientadora)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa

(Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Victoria Monge-Fuentes

(Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Marcella Lemos Brettas Carneiro

(Suplente)

Brasília, 24 de fevereiro de 2017

Dedico este trabalho a minha mãe que sempre me apoiou e me incentivou a ir atrás dos meus sonhos. Obrigado mamãe.

Agradecimentos

A Deus, por me proporcionar oportunidades que nunca imaginaria ter, pela força e coragem para sempre superar os desafios e realizar meus sonhos, e por seu eterno amor.

A minha família, minha mãe Eliana, meu irmão Arthur, pelo amor e apoio.

A Priscila, melhor amiga, companheira. Muito obrigado pelo amor, paciência, incentivo e compreensão.

A minha querida orientadora Graziella Anselmo Joanitti. Obrigado por acreditar em mim e me conceder essa oportunidade de poder aprender e colocar em prática meus conhecimentos, pelos ensinamentos científicos e principalmente pelo incentivo e paciência.

Aos meus amigos, que mesmo por não entenderem muitas vezes o que faço, sempre estão comigo me dando forças e me alegrando.

As minhas amigas biomédicas, Bruna, Vanessa e Jaqueline, por me suportarem desde a época de graduação e estarem comigo até os tempos de hoje.

Aos meus amigos de nanobiotecnologia, Mateus, Laíse, Ana Lygia e Raphael, pelo acolhimento no laboratório, ensinamentos sobre a nanobiotecnologia e companhia no sofrimento e diversão diária.

A todos os “filhos da Grazi” pela ajuda prestada ao decorrer desses anos, em especialmente ao Victor Hugo.

A Alicia Simalie Ombredane, pelas análises na citometria de fluxo e orientação no período em que nossa professora ficou ausente.

Aos colegas do Laboratório de Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB, pela amizade, discussões científicas, ajuda e apoio.

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

A querida Dona Zélia, pelo apoio e auxílio prestado no laboratório de nanobiotecnologia.

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

“An expert is a person who has made all the mistakes that can be made in a very narrow field.”

Niels Bohr (1885-1962)

RESUMO

O Câncer de Pele Não Melanoma (CNPM) o tipo de câncer que possui maior incidência no Brasil e no mundo. O ácido anacárdico (AA) é um composto proveniente da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) que vem atraindo grande interesse nos últimos anos devido às suas propriedades antitumorais, antibióticas, gastroprotetoras e antioxidantes. O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) também vem atraindo a atenção de pesquisadores, por ser rico em polifenóis com atividades como supressão tumoral, antiproliferativo e pró-apoptótica. Grande parte desses fitoquímicos que possuem atividades terapêuticas são pouco solúveis em soluções aquosas, o que dificulta sua administração e absorção no organismo. Desta forma, a encapsulação desses compostos em nanoestruturas se torna uma alternativa plausível para potencializar seus efeitos biológicos. Diante do exposto, o presente projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos de combinações entre o ácido anacárdico (AA) derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de câncer de pele não melanoma *in vitro*. Os testes de estabilidade mostraram que a nanoemulsão à base de óleo de açaí (AçNE) apresentaram gotículas com diâmetro hidrodinâmico de ± 140 nm, com índice de polidispersão de 0,229, potencial de superfície de $\pm 17,6$ mV e pH 7 por 120 dias. Foi possível modificar a superfície das AçNE adicionando polímeros de quitosana (CH), polietileno glicol (PEG) e fosfolipídios catiônicos DOTAP (1,2-Dioleoiloxi-3-(trimetilamônio) propano). Tais formulações não apresentaram efeito citotóxico nas linhagens A431 e HaCaT, independentemente do tipo de superfície. Os tratamentos AçNE associado ao AA provocaram uma significativa redução na viabilidade das células A431, porém não foi observado efeito de sinergismo entre os mesmos. Em contrapartida, quando ambos compostos foram adicionados na forma não-nanoestruturada, observou-se redução de 90% da viabilidade de células A431 em 24 horas. Dados de citometria de fluxo indicam que a combinação dos compostos livres resulta em morte celular por apoptose e bloqueio do ciclo celular. O presente estudo sugere que a combinação de óleo de açaí e AA é uma promissora alternativa terapêutica antitumoral a ser mais explorada em estudos futuros.

Palavras-chave: Câncer De Pele Não Melanoma; Nanoemulsão; Óleo De Açaí; Ácido Anacárdico; Terapia Combinatória.

ABSTRACT

Non-Melanoma Skin Cancer (CNPM) is the type of cancer that has the highest incidence in Brazil and worldwide. Anacardic acid (AA) is a compound derived from cashew nuts (*Anacardium occidentale*) that has attracted great interest in recent years due to its antitumor, antibiotic, gastroprotective and antioxidant properties. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has also attracted the attention of researchers, because it is rich in polyphenols which shows great activity as a tumor suppressor, antiproliferative and pro-apoptotic. Most of these phytochemicals that have therapeutic activities are poorly soluble in aqueous solutions, which hinders their administration and absorption in the body. In this way, the encapsulation of these compounds in nanostructures becomes a plausible alternative to enhance their biological effects. Thus, the present research project has the objective of evaluating the effects of anacardic acid (AA) derived from cashew nut shell (*Anacardium occidentale*) and açai oil (*Euterpe oleracea* Mart.), free or nanostructured, in the treatment of non-melanoma skin cancer in vitro. The stability tests showed that the açai oil-based nanoemulsion (AçNE) showed droplets with a hydrodynamic diameter of ± 140 nm, with a polydispersion index of 0.229, surface potential of ± 17.6 mV and pH 7 for 120 days. It was possible to modify the surface of the AçNE by adding polymers of chitosan (CH), polyethylene glycol (PEG) and cationic phospholipids DOTAP (1,2-Dioleoyloxy-3- (trimethylammonium) propane). Such formulations showed no cytotoxic effect on the A431 and HaCaT cell lines, regardless of surface type. The AçNE treatments associated with AA caused a significant reduction in the viability of A431 cells, but no synergism was observed between them. On the other hand, when both compounds were added in the non-nanostructured form, a 90% reduction in the viability of A431 cells was observed in 24 hours. Flow cytometry data indicate that the combination of the free compounds results in cell death by apoptosis and cell cycle block. The present study suggests that the combination of açai oil and AA is a promising alternative antitumor therapy to be further explored in future studies.

Keywords: Non-Melanoma Skin Cancer; Nanoemulsion; Açai Oil; Anacardic Acid; Combinatory treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das etapas da carcinogênese. Fases da iniciação, promoção e progressão.....	1
Figura 2. Representação do potencial invasivo das células tumorais.....	1
Figura 3. Representação da estrutura da pele.	2
Figura 4. Representação dos tipos de câncer de pele.....	5
Figura 5. Representação da lesão do câncer de pele espinocelular.....	6
Figura 6. Representação da metástase do câncer de pele espinocelular.....	7
Figura 7. Desenho botânico do <i>Anacardium occidentale</i>	10
Figura 8. Desenho da estrutura da castanha do caju.	11
Figura 9. Estrutura química do ácido anacárdico em 2D (A) e em 3D (B) e as características do ácido anacárdico (C).....	12
Figura 10. Fruto do açaí (A) e alguns de seus componentes químicos: flavonoide (B), antocianina (C) e lignana (D).	13
Figura 11. Diagrama esquemático de emulsão do tipo óleo/água (1) e água/óleo (2).	16
Figura 12. Diagrama esquemático de uma nanoemulsão.	17
Figura 13. Foto de uma nanoemulsão (esquerda) e uma macroemulsão (direita).....	17
Figura 14. Esquema do desenho experimental	22
Figura 15. Representação das nanoemulsões com base de óleo de açaí livre (A) e recobertas por quitosana (B), polietilenoglicol (C) e DOTAP (D)	23
Figura 16. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontinua, das diferentes formulações de AÇNE armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 180 dias.....	36
Figura 17. Gráfico comparativo entre o potencial zeta das diferentes formulações de AÇNE armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 180 dias.	38

Figura 18. Gráfico comparativo do potencial hidrogeniônico das diferentes formulações de AçNE armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz após 30, 60,120 e 180 dias após sua formulação.	40
Figura 19. Avaliação do aspecto morfológico da AçNE 2:1 armazenada a 4 °C observada por microscopia eletrônica de transmissão.	42
Figura 20. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontínua, da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 120 dias.....	46
Figura 21. Gráfico comparativo do potencial Zeta da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 120 dias.	48
Figura 22. Gráfico comparativo do potencial Hidrogeniônico da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 120 dias.....	50
Figura 23. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontínua, da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) após diluição seriada.....	52
Figura 24. Gráfico comparativo do potencial zeta da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) após diluição seriada.....	53
Figura 25. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontínua, da formulação de AçNE (nanoemulsão com óleo de açaí) e AçNE CH (nanoemulsão com quitosana) após variação de pH.	54
Figura 26. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontínua, da formulação de AçNE (nanoemulsão com óleo de açaí) e AçNE CH (nanoemulsão com quitosana) após variação de pH.	55

Figura 27. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol), AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) e de óleo livre, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)..... 56

Figura 28. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de Branco (surfactante e água), Branco CH (surfactante e quitosana), Branco PEG (surfactante, água e PEG) e Branco DOTAP (surfactante, água e DOTAP), equivalentes às concentrações de óleo livre e de AçNEs, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001) 57

Figura 29. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol), AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) e de óleo livre, comparando-os com o controle água (H₂O) por 72 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)..... 58

Figura 30. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de Branco (surfactante e água), Branco CH (surfactante e quitosana), Branco PEG (surfactante, água e PEG) e Branco DOTAP (surfactante, água e DOTAP), equivalentes às concentrações de óleo livre e de AçNEs, comparando-os com o controle água (H₂O) por 72 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001) 58

Figura 31. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações (200, 175, 150, 125 e 100 µM) de AA (ácido anacárdico), e seu controle DMSO equivalentes à concentração de AA, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas (**A**) e 72 horas (**B**). Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)..... 60

Figura 32. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações do óleo livre (45, 90 e 180 µg/mL, respectivamente), de ácido anacárdico (150, 125 e 100 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM) e seus controles equivalentes, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas (**A**) e 72 horas (**B**). Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001). 62

Figura 33. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a concentração de 45 µg/mL do óleo livre, 45 µg/mL de AçNE (nanoemulsão de açaí), 45 µg/mL de AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), ácido anacárdico (AA) (125, 100 e 75 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (125, 100 e 75 µM), AçNE (45 µg/mL) associado ao AA (125, 100 e 75 µM) e AçNE CH (45 µg/mL) associado ao AA (125, 100 e 75 µM), comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001). 64

Figura 34. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a concentração de 90 µg/mL do óleo de açaí, 90 µg/mL de AçNE (nanoemulsão de açaí), ácido anacárdico (150, 125 e 100 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), AçNE (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001). 65

Figura 35. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a concentração de Branco (surfactante e água) equivalente à concentração de AçNE, etanol equivalente à concentração óleo livre, DMSO equivalentes as concentrações de AA, Branco associado ao AA (150, 125 e 100 µM), etanol associado ao AA (150, 125 e 100 µM), e Branco associado ao DMSO com as concentrações equivalentes ao tratamento AçNE + AA, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001). 66

Figura 36. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos humanos (HaCaT) submetidas a concentração de 90 µg/mL do óleo de açaí, 90 µg/mL de AçNE (nanoemulsão de óleo de açaí), ácido anacárdico (150, 125 e 100 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), AçNE (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001). 67

Figura 37. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos humanos (HaCaT) submetidas a concentração de Branco (surfactante e água) equivalente à concentração de AçNE, etanol equivalente à concentração óleo livre, DMSO equivalentes as concentrações de AA, Branco associado ao AA (150, 125 e 100 µM), etanol associado ao AA (150, 125 e 100 µM), e Branco associado ao DMSO com as concentrações equivalentes ao tratamento AçNE + AA, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001). 68

- Figura 38.** Avaliação por Azul de tripan do número total de células de carcinoma epidermóide após exposição por 24 horas às AçNE (nanoemulsão de açaí) e Óleo de açaí a 90 µg/mL, AA a 125 µM, AçNE a 90 µg/mL associado ao AA a 125 µM, Óleo de açaí a 90 µg/mL associado ao AA a 125 µM, e os controles Paclitaxel (PTX) a 50 nM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 29,4 µM e água ultrapura (H₂O). Contagem das células em câmara de Neubauer..... 69
- Figura 39.** Porcentagem de células A431 com e sem lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs a 50 µM e ao controle água ultrapura (H₂O). Test ANOVA e post-teste Bonferroni: (***: P< 0,0001 / **: P< 0,001 e *: P<0,01)..... 70
- Figura 40.** Avaliação da fragmentação de DNA por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AçNE, óleo livre, AA, AçNE + AA e Óleo Livre + AA na concentração de 90 µg/mL para a AçNE e óleo, e de 125 µM para o AA, em linhagem de Carcinoma epidermóide (A431). Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: P< 0,0001). 71
- Figura 41.** Avaliação do ciclo celular por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às NE, óleo, AA, NE + AA e Óleo + AA na concentração de 90 µg/mL para a AçNE e óleo, e de 125 µM para o AA em linhagem de carcinoma epidermóide (A431). Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: P< 0,0001 / **: P< 0,001 e *: P<0,01)..... 71
- Figura 42.** Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) avaliado por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição das células de Carcinoma epidermóide (A431) às NE (**A**), AA (**B**), NE + AA (**C**), Óleo (**D**) e Óleo + AA (**E**) na concentração de 90 µg/mL para a NE e óleo, e de 125 µM para o AA..... 73
- Figura 43.** Representação do $\Delta\psi_m$ a partir da média geométrica após os diferentes tratamentos. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: P< 0,0001 e **: P< 0,001)..... 74
- Figura 44.** Dot plot dos ajustes dos parâmetros para a detecção dos marcadores após o tratamento das células de Carcinoma epidermóide (A431) com controle negativo (água) sem marcação (**A**), H₂O₂ e marcada apenas por anexina V – FITC (**B**), H₂O₂ e marcadas apenas por PI (**C**) e por H₂O₂ e marcadas por ambos marcadores (**D**). 75
- Figura 45.** 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 24 horas de exposição a NE (A), Óleo (B), AA (C), NE + AA (D) e Óleo + AA (E) na concentração de 90 µg/mL para a NE e óleo, e de 125 µM para o AA..... 76

Figura 46. 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 NE (A), Óleo (B), AA (C), NE + AA (D) e Óleo + AA (E) na concentração de 90 µg/mL para a NE e óleo, e de 125 µM para o AA. 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 (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). A água ultrapura (H₂O), o Paclitaxel (PTX) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram utilizados como controles. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o controle (***: P< 0,0001 / **: P< 0,001 e *: P<0,01)..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Epidemiologia do carcinoma espinocelular: fatores de risco.	8
Tabela 2. Siglas de identificação dos grupos de tratamentos.....	28
Tabela 3. Caracterização por DLS das nanoemulsões de óleo de açaí (AçNE) desenvolvidas com variadas proporções de surfactante:óleo (m/m) armazenadas em diferentes condições de temperatura (Temperatura Ambiente e a 4 °C) após 1 dia de sua formulação.	35
Tabela 4. Caracterização por DLS das AçNE livres ou recobertas com polietilenoglicol (PEG), quitosana (CH) ou DOTAP armazenadas em temperatura ambiente ou a 4 °C por 24 horas.	44
Tabela 5. Compilação dos resultados dos ensaios biológicos em células de Carcinoma epidermóide (A431) após 24 horas de exposição a AçNE, AA, AçNE + AA, Óleo de Açaí e Óleo de Açaí + AA na concentração de 90 µg/mL para a AçNE e óleo de açaí, e de 125 µM para o AA.....	78

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

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

AA – Ácido anacárdico (ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico)

AçNE – Nanoemulsão com base de óleo de açaí

AçNEs – Nanoemulsões com base de óleo de açaí

ANOVA – Análise de variância

ATCC – American Type Culture Collection

CA – Ceratose actínica

CB – Carcinoma basocelular

CE – Carcinoma espinocelular

CH - Polímeros de quitosana

CP – Câncer de pele

CPDs – Ciclobutano-pirimidina

CPM – Câncer de pele melanoma

CPNM – Câncer de pele não melanoma

DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DLS – Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DOTAP - Fosfolipídios catiônicos (1,2-Dioleoiloxi-3-(trimetilamônio) propano)

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FACS – Citometria de fluxo

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HaCaT- Linhagem de queratinócitos humanos

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LCCC – Líquido da casca da castanha de caju

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MPM – Metaloproteínas de matriz

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

NE – Nanoemulsão

NEs- Nanoemulsões

OMS – Organização Mundial de Saúde

Pdl – Índice de polidispersão

PEG – Polietilenoglicol

PI – Iodeto de propídeo

PTX – Paclitaxel

RNase – Ribonuclease

T.A. – Temperatura ambiente

UnB – Universidade de Brasília

UV – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER DE PELE.....	3
1.1.1 Câncer de pele não melanoma	4
1.2 TERAPIA COMBINATÓRIA.....	9
1.3 ÁCIDO ANACÁRDICO.....	10
1.4 ÓLEO DE AÇAÍ.....	12
1.5 NANOTECNOLOGIA.....	14
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 FORMULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ.....	22
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES.....	23
4.2.1 Estabilidade Coloidal Das Nanoemulsões	23
4.2.2 Espalhamento De Luz Dinâmico (DLS) E Potencial Zeta	24
4.2.3 Microscopia Eletrônica De Transmissão	24
4.3 ÁCIDO ANACÁRDICO.....	25
4.4 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	25
4.4.1 Linhagens Celulares	25
4.4.2 Manutenção das linhagens celulares	25
4.4.3 Tripsinização Das Células	25
4.4.4 Plaqueamento Das Células	26
4.4.5 Tratamentos	26
4.5 TESTES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS.....	29
4.5.1 Teste De Viabilidade Celular – Ensaio De MTT (brometo de 3-(4,5- 4.5.3.2 Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol	29
4.5.3.3 4.5.2 Citometria De Fluxo	29
4.5.3 4.5.3 Fragmentação De DNA E Ciclo Celular	30
Potencial De Membrana Mitocondrial.....	31
Exposição De Fosfatidilserina.....	31
Avaliação Da Integridade De Membrana E Proliferação Celular.....	32

4.6 TESTES ESTATÍSTICOS	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 FORMULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE AÇAÍ (AÇNES)	34
5.1.1 Características Das Nanoemulsões Após Formulação.....	34
5.1.2 Análise Da Estabilidade Das Diferentes Concentrações Das Nanoemulsões Após Período De Armazenamento.....	35
5.1.3 Características Das AÇNE Após Modificações De Sua Superfície.....	43
5.1.4 Análise Da Estabilidade Das AÇNEs Após Período De Armazenamento. 45	45
5.1.5 Avaliação Da Estabilidade Das Nanoemulsões Após Diluição Em Série 51	51
5.1.6 Avaliação Da Estabilidade Das Nanoemulsões Após Variação De pH 54	54
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	55
5.2.1 Determinação Da Viabilidade Celular MTT	55
5.2.2 Tratamento Com A AÇNE Livre E Recobertas Em Células A431	55
5.2.2.1 Tratamento Com Ácido Anacárdico Em Células A431	59
5.2.2.2 Tratamento Do Óleo De Açaí Associado Ao Ácido Anacárdico Em	
5.2.2.3 Células A431	61
Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células A431	63
5.2.2.3.1 <i>Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Na Concentração De 45 µg/mL Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células A431.</i>	<i>63</i>
5.2.2.3.2 <i>Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Na Concentração De 90 µg/mL Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células A431</i>	<i>65</i>
5.2.2.3.3 <i>Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Na Concentração De 90 µg/mL Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células HaCaT</i>	<i>67</i>
5.2.3 Avaliação De Integridade De Membrana E Proliferação Celular	69
5.2.4 Citometria De Fluxo (FACS)	70
Fragmentação De DNA E Ciclo Celular	70
Potencial De Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	72
Exposição A Fosfatidilserina	74
6 CONCLUSÕES.....	79

7 REFERÊNCIAS81

1 INTRODUÇÃO

Câncer é uma denominação atribuída a um conjunto de mais de 100 diferentes tipos de doenças que possuem em comum células anormais com proliferação desordenada e potencial invasivo para outras regiões do corpo (metástase). Esta doença apresenta caráter multifatorial onde fatores genéticos (e.g. mutações) e fatores ambientais/comportamentais podem agir em conjunto, ou em sequência, para promover ou dar início a um câncer (INCA, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2030 haverá aproximadamente 21,4 milhões de novos casos de câncer, seguido de 13,2 milhões de mortes, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população mundial. Sendo que no Brasil, no ano de 2016, estimava-se 596 mil novos casos de câncer em homens e mulheres.



Figura 1. Representação das etapas da carcinogênese. Fases da iniciação, promoção e progressão. Adaptado de: (DEILSON, 2002)

A carcinogênese possui três estágios: a iniciação que se dá pela exposição das células aos carcinógenos, tendo como consequência a mutação e formação de clones celulares atípicos, podendo permanecer nesse estado por longos períodos, sendo possível conservar seu fenótipo e função semelhante ao das células normais

passando a ser chamado de hiperplasia (HANAHAN; WEINBERG, 2011; OLIVEIRA et al., 2007; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). O segundo estágio é conhecido como promoção, onde ocorre a propagação anormal desses clones celulares com alterações na expressão gênica, alterando sua função de origem e morfologia, passando a ser chamado de displásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). O último estágio é a progressão, onde as células mutadas apresentam autonomia para proliferar de forma desordenada, e a capacidade de difundir-se para outros tecidos pela via linfática mediante a angiogênese, tornando-se invasivas (OLIVEIRA et al., 2007; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Estudos epidemiológicos demonstram que o risco de incidência de desenvolvimento de câncer se diferencia entre grupos de populações, e essas diferenças são associadas aos fatores de estilo de vida e hábito (OLIVEIRA et al., 2007). Assim no Brasil, o câncer de pele representa o câncer mais frequente em todas as populações, com uma estimativa de mais de 181 mil novos casos de câncer no período de 2016 (INCA, 2016).

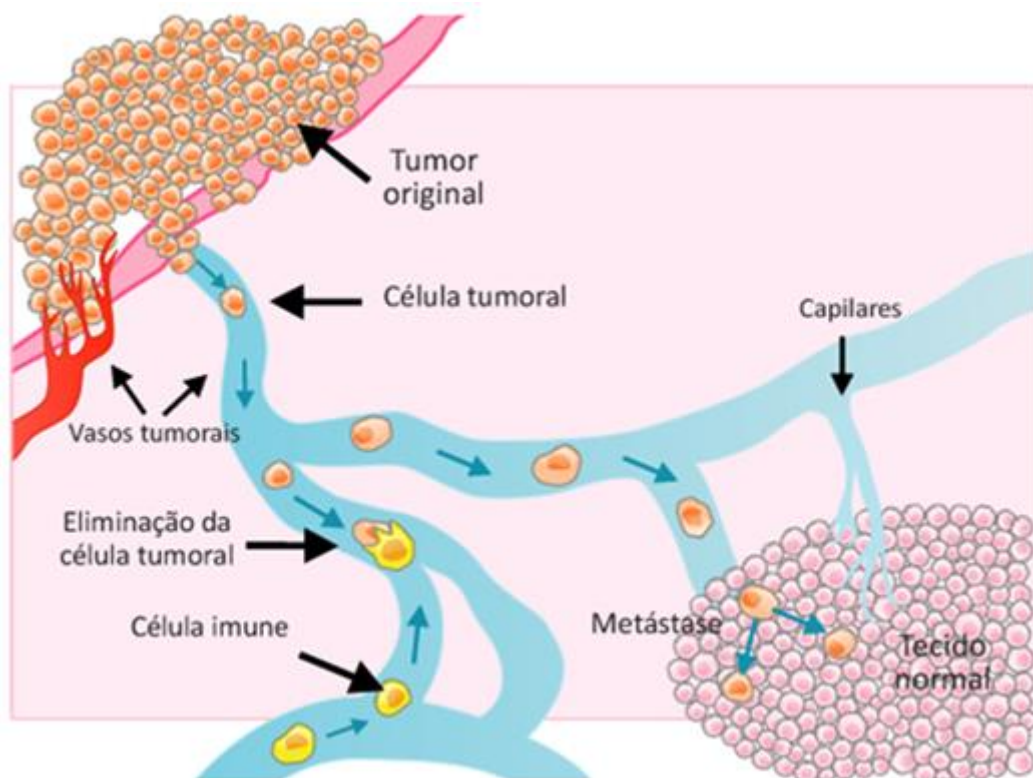


Figura 2. Representação do potencial invasivo das células tumorais. Adaptado da ilustração de Alexandre Gianinni

1.1 CÂNCER DE PELE

A pele, que caracteriza cerca de 16% do peso corporal, é o maior órgão do corpo humano (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Com diversas funções, uma das mais importantes é a de servir como uma barreira para prevenir a perda de temperatura e água, e de promover proteção ao corpo humano com as funções imunes inatas e adaptativas (PDQ CANCER GENETICS EDITORIAL BOARD, 2002).

Dividida em duas camadas principais, a derme (camada mais interna) é constituída pelo tecido conjuntivo, e a epiderme (camada mais superficial) por tecido epitelial estratificado pavimentoso, e que tem em sua composição os tecidos epitelial, mesênquimal, glandular e neurovascular (PDQ CANCER GENETICS EDITORIAL BOARD, 2002; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). As células mais abundantes na epiderme são os queratinócitos, que são os responsáveis pela síntese da queratina, a proteína que compõe a camada protetora do tecido, e em seguida os melanócitos, que são menos abundantes e são encarregados da produção da melanina. Na derme encontramos grande parte das células imunes e os fibroblastos, que participam diretamente em grande parte das respostas fisiológicas na pele (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

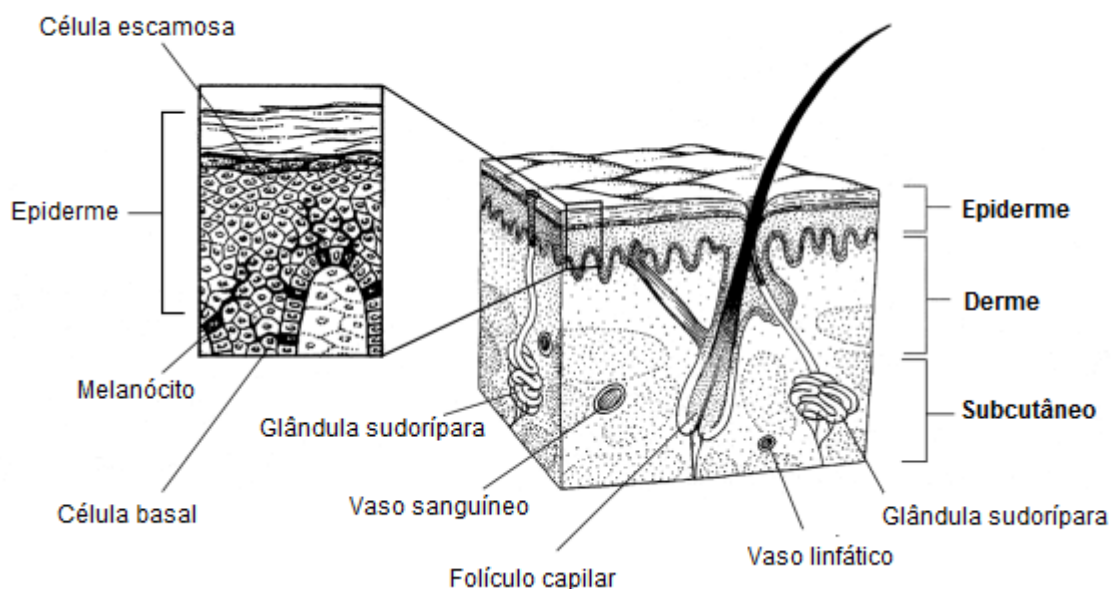


Figura 3. Representação da estrutura da pele. Adaptado de: <https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/about/what-is-basal-and-squamous-cell.html>

O Câncer de pele (CP) é o de maior ocorrência em toda população mundial. Se apresenta basicamente sob duas formas: melanoma e não melanoma. O CP melanoma (CPM) é o de menor incidência, porém, é o mais agressivo, com origem nos melanócitos. O CP não melanoma (CPNM), que possui a maior incidência nos casos de câncer de pele, contudo, é menos agressivo, podendo ocorrer nas células basais ou nas células escamosas (PDQ CANCER GENETICS EDITORIAL BOARD, 2002)

No Brasil, aponta-se uma incidência de aproximadamente 600 mil novos casos de cânceres no período de 2016 e 2017, excluindo-se os casos de CPNM (cerca de 180 mil novos casos) que correspondem ao tipo de câncer com maior incidência no Brasil, responsável por 25% dos casos de tumores registrados (INCA, 2016).

O câncer de pele ocorre mais frequentemente em homens do que em mulheres, aumentando sua ocorrência de acordo com a idade. A base para a prevenção do CP é a proteção da pele contra a exposição solar excessiva, com roupas apropriadas e a utilização de protetor solar (GREEN; OLSEN, 2017). O aumento observado nas taxas de câncer de pele está associado com diversos fatores, incluindo a transição do aumento da expectativa de vida da população, o que aumenta o risco de manifestação do CPNM. Assim como o aumento das atividades ocupacionais e recreacionais expostas a luz (APALLA et al., 2017).

1.1.1 CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA

O câncer de pele não melanoma (CPNM) pode se apresentar de duas formas, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular. O carcinoma basocelular (CB) apresenta um baixo índice de crescimento, presença de tumor local invasivo na epiderme e baixo índice metastático. O carcinoma espinocelular (CE) desenvolve-se a partir de queratinócitos epidermais displásicos e apresenta um maior índice de metástase se comparado com o CB. Fatores de risco para o desenvolvimento dessa forma de câncer são pessoas com a pele classificada como fototipo I-III na escala de Fitzpatrick (pois estão mais susceptíveis a desenvolver ceratose actínica), idade avançada, exposição prolongada à radiação ultravioleta (UV) e pacientes

imunodeficientes ou com síndromes genéticas como albinismo ou xeroderma pigmentoso (BHANDARI; PAI, 2014; NIH, 2014).

O CE é associado a uma exposição frequente ou moderada a radiação UV, e é frequentemente precedido pela doença de Bowen ou por Ceratose actínica (FELLER et al., 2016). O CE normalmente se origina na pele actinicamente danificada, onde um dos mais fortes preditores do desenvolvimento do CE em pessoas previamente não acometidas com a doença, é a presença da ceratose actínica (CA). A CA são tumores benignos da displasia queratinócita, apresentam aparência avermelhada, causados pelo acúmulo da exposição solar e ocorre geralmente na cabeça e no pescoço, costas das mãos e antebraços em populações de mais idade e de pele clara. Pessoas que apresentam grande quantidade de CA possuem grande risco de desenvolver câncer de pele (GREEN; OLSEN, 2017).

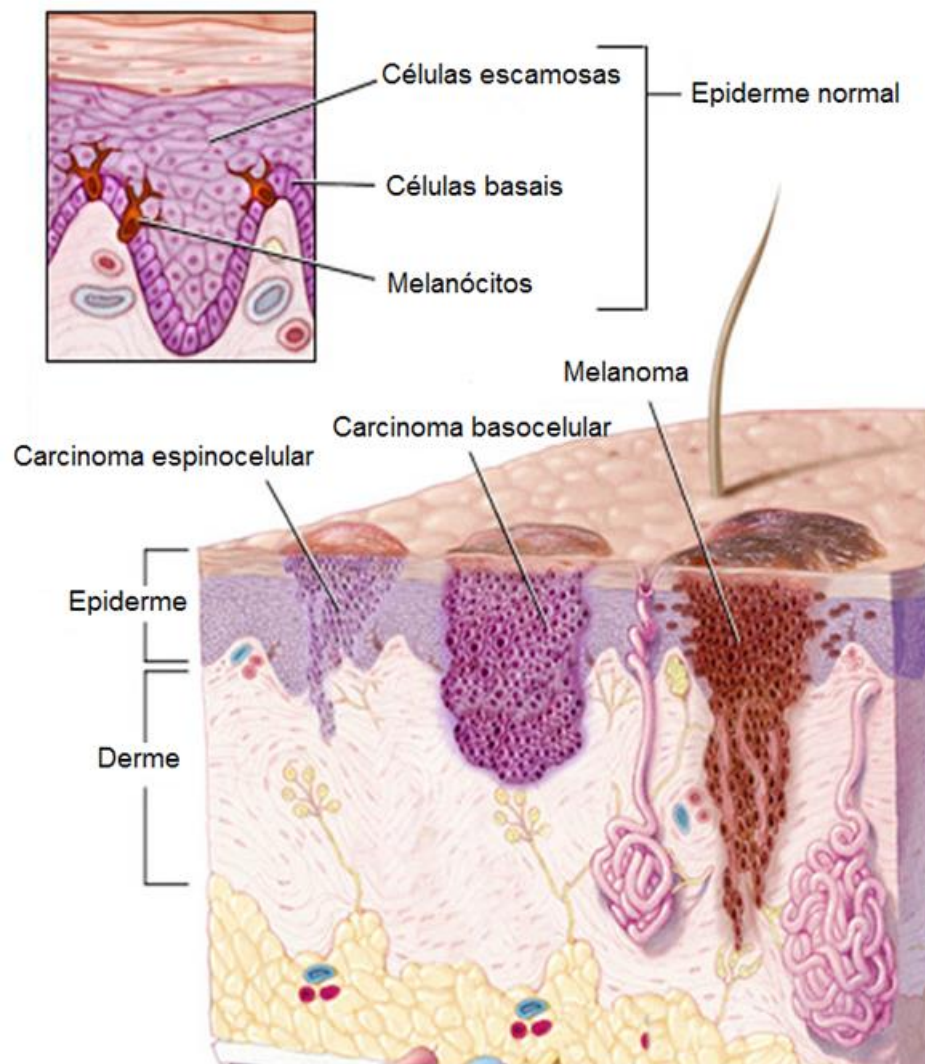


Figura 4. Representação dos tipos de câncer de pele. Adaptado de: <https://previsecare.wordpress.com/2013/01/16/skin-cancer-squamous-cell-carcinoma/>

Mesmo na ausência da exposição ao UV, o CE é ocasionalmente associado a feridas não cicatrizantes ou cicatrizes, ou lesões crônicas que são ou foram precedidas por processos imunoinflamatórios crônicos (FELLER et al., 2016)

A radiação UV induz duas classes principais de fotoprodutos mutagênicos nos queratinócitos, dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPDs) e 6,4 pirimidina-pirimidina. Essas lesões no DNA podem dar origem a mutações que dão as características de mutagênese induzida pela radiação UV, consideradas como as mutações com assinatura UV. Além disso, a exposição prolongada da pele ao sol, pode induzir a geração de espécies altamente reativas de oxigênio pela UV, capazes de gerar danos ao DNA e assim promover mutagênese (FELLER et al., 2016).

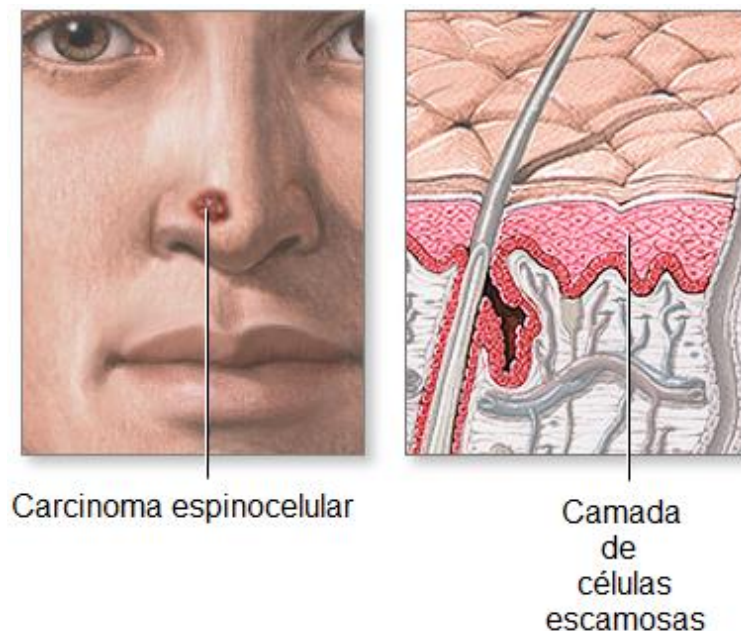


Figura 5. Representação da lesão do câncer de pele espinocelular. Adaptado de: <https://medlineplus.gov/ency/imagepages/9947.htm>

A derme apresenta um papel extremamente importante na patogenicidade do CE. Na conexão entre a derme a epiderme situa-se a membrana basal que inicialmente previne que o tumor invada o tecido conjuntivo adjacente. A degradação do colágeno, principalmente do colágeno tipo IV, na membrana basal é crucial para a infiltração das células tumorais e isso se dá pela ação das metaloproteínas de matriz (MPM) 2 e 9 (Fig.6). Uma vez em que a membrana basal é invadida pelas células tumorais, elas começam a se associar ao ambiente multicelular tumoral, o que é essencial para a modulação do tumor e sua metástase (FELLER et al., 2016).

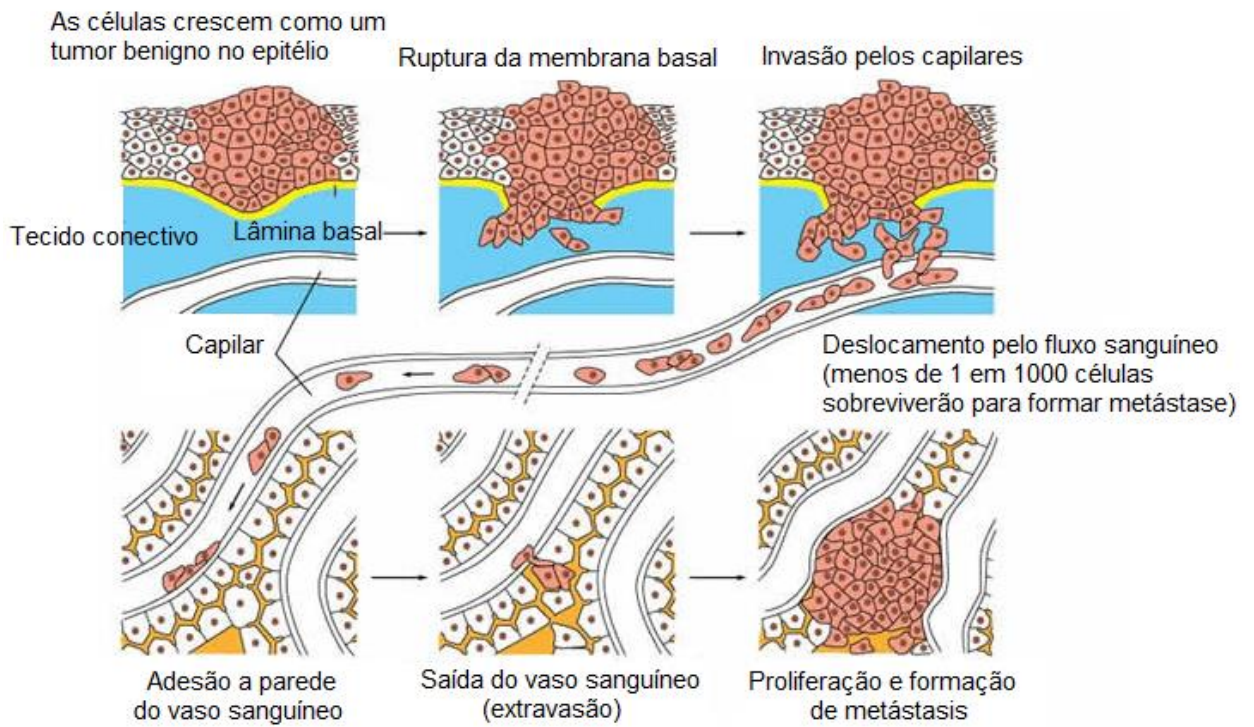


Figura 6. Representação da metástase do câncer de pele espinocelular. Adaptado de: http://blissatomic.blogspot.com.br/2016_02_21_archive.html

Tabela 1. Epidemiologia do carcinoma espinocelular: fatores de risco.

FATOR DE RISCO/ EXPOSIÇÃO	ASSOCIAÇÃO DIRETA	MAGNITUDE DO EFEITO	FORÇA DAS EVIDÊNCIAS
EXPOSIÇÃO Á RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	↑	++	Forte
PELE SENSÍVEL AO SOL (INCLUINDO SÍNDROMES HEREDITÁRIAS)	↑	++	Forte
IMUNOSUPRESÃO	↑	+	Forte
USO DE GLUCOCORTICÓIDE	↑	+	Forte
EXPOSIÇÃO QUÍMICA (PESTICIDAS, HERBICIDAS, HAPS)	↑	+	Forte
ARSÊNICO	↑	+	Forte
TABAGISMO	↑	+	Relação provável, baseado em dados substanciais
EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO IONIZANTE	↑	+	Relação provável, baseado em dados substanciais
PAPILOMAVIRUS HUMANO	-	SA	Relação fraca, se houver, baseada em dados substanciais
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL ELEVADO	-	SA	Relação fraca, se houver, baseada em dados substanciais
ATIVIDADE FÍSICA	-	SA	Relação fraca, se houver, baseada em dados substanciais
FATORES DIETÁRIOS	-	SA	Relação fraca, se houver, baseada em dados substanciais
USO DE CONTRACEPTIVO ORAL	-	SA	Relação fraca, se houver, baseada em dados substanciais
USO DE HORMÔNIOS NA PÓS-MENOPAUSA	-	SA	Relação fraca, se houver, baseada em dados substanciais
ALTURA (APENAS EM HOMENS)	↑	+	Achados inconsistentes; Dados limitados
USO DE ÁLCOOL	↑	+	Achados inconsistentes; Dados limitados

HAPs, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; +: indica a magnitude aproximada da associação; ++, moderado a grande aumento no risco; +, Aumento ligeiro a moderado do risco; SA, sem associação. (GREEN; OLSEN, 2017).

1.2 TERAPIA COMBINATÓRIA

Avanços sobre o conhecimento da biologia tumoral indicam que o câncer não é apenas uma massa de células tumorais em proliferação, mas um tecido complexo formado por tipos celulares distintos participando de interações atípicas entre si e com o microambiente que o compõe (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Tal heterogeneidade e complexidade implicam em desafios para o tratamento. Os métodos mais utilizados para o tratamento de CPNM abrangem procedimentos cirúrgicos (como curetagem, eletrodissecação, excisão), quimioterapia, radioterapia, crioterapia e laserterapia (BHANDARI; PAI, 2014). Dentre os desafios mais comuns encontrados na aplicação de terapias antitumorais destacam-se a resistência do tumor aos quimioterápicos disponíveis; e reduzida especificidade do tratamento para células tumorais, desencadeando efeitos adversos severos e toxicidade tais como a morte de células sanguíneas, infertilidade, alopecia, alterações gastrintestinais, dentre outros (DE SOUZA et al., 2014; MORACHIS; MAHMOUD; ALMUTAIRI, 2012; NIH, 2014).

Nesse contexto, a terapia combinatória tornou-se uma alternativa e a principal estratégia para o tratamento de diversos tipos de cânceres resistentes a medicamentos. A terapia consiste na administração de doses menores de agentes anticancerígenos em combinação visando uma sinergia capaz de atingir diferentes alvos celulares simultaneamente, potencializando assim as chances de destruição do tumor e reduzindo a incidência de efeitos colaterais (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012; MIGNANI et al., 2015; HU et al., 2012). Com isso, a terapia combinatória pode diminuir a preocupação com a toxicidade acumulativa dos fármacos, uma vez que, doses menores de agentes se tornam mais eficazes quando utilizados em combinação. Podendo otimizar os resultados devido ao seu potencial de adição ou sinergismo, obtendo uma resposta mais completa ou mais rápida, ou ambas, também reduzindo a toxicidade do tratamento, tolerabilidade e a conformidade (CATHER; CROWLEY, 2014). Desta forma, a terapia combinatória pode aumentar a eficácia acima dos níveis alcançados pelas terapias tradicionais, ou aumentar o tempo da janela terapêutica (O'COLLINS et al., 2012).

O principal desafio que se encontra nesse tipo de tratamento é a otimização dos parâmetros dos agentes anticancerígenos, como a dosagem, a sequência na administração dos compostos, como os agentes irão se comportar dentro do corpo,

biodistribuição, permeabilidade e transporte dos mesmos pela membrana, que se não calculados corretamente pode gerar efeitos colaterais indesejados para o paciente (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012; MIGNANI et al., 2015; HU et al., 2014). Muitos compostos fitoquímicos com atividades antitumorais já descritos na literatura são encontrados em abundância na biodiversidade vegetal brasileira. Apesar disso, os efeitos de sinergismo advindos da combinação dos mesmos ainda são pouco conhecidos e explorados.

1.3 ÁCIDO ANACÁRDICO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*), pertencente à família Anacardiaceae, originalmente do Brasil e agora sendo extensivamente cultivado na Índia e no leste da África, é uma árvore frondosa com muitos ramos e que cresce até 12 metros (DE LIMA et al., 2008; MORAIS et al., 2010; USHANANDINI et al., 2009). Essa árvore é responsável pela produção do pseudofruto (caju), onde o fruto (castanha do caju) fica presa (MORAIS et al., 2010).

O fruto do cajueiro consiste em casca exterior (epicarpo), casca interior (endocarpo), e um líquido fortemente vesicante da casca da castanha de caju. O líquido da casca da castanha do caju (LCCC) se encontra entre a casca exterior e a interior (pericarpo) (DE LIMA et al., 2008). Como parte do processamento, a casca da castanha do caju é eliminada como resíduo e subproduto agrícola. (HAMAD; MUBOFU, 2015).



Figura 7. Desenho botânico do *Anacardium occidentale*. Fonte: http://www.tudosobreplantas.com.br/asp/plantas/ficha.asp?id_planta=370626

O ácido anacárdico (AA), ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico, é um tipo de lipídio fenólico apresentando um grupo alifático (saturado ou insaturado) e outro aromático em sua estrutura (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). O AA é um componente proveniente do LCCC que se tornou de grande interesse nos últimos tempos devido às suas propriedades antitumorais, antibióticas, gastroprotetoras e antioxidantes (HAMAD; MUBOFU, 2015).

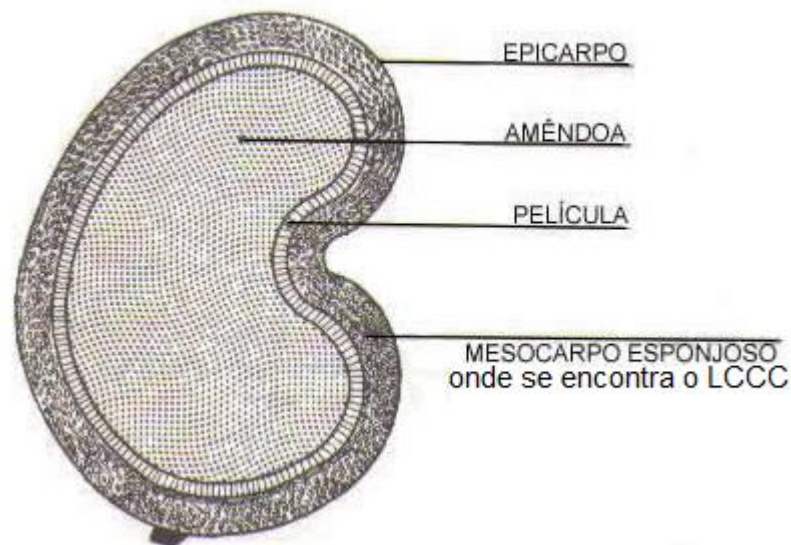


Figura 8. Desenho da estrutura da castanha do caju. Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAxdAAK/cultura-caju>

Aproximadamente 90% do extrato da semente é composto pelo AA, e a parte restante é constituída por outros componentes relacionados ao AA como cardanol, cardol e 2-metil-cardol (LIPKA et al., 2014). As atividades biológicas do AA isolado já foram extensivamente avaliadas, identificando que o AA e seus derivados inibem a proliferação e induzem morte em diversos tipos de células tumorais como melanomas, cânceres de cólon, próstata, pulmão, cervical, rins e mama (HEMSHEKHAR et al., 2012; LIPKA et al., 2014; SEONG et al., 2014; WU et al., 2011). Foi demonstrado que sua atividade antitumoral se dá pela inibição da histona acetiltransferase p300, responsável pela regulação do sistema de reparação e de transcrição do DNA. Adicionalmente, o AA bloqueia o fator de transcrição NF- κ B, responsável por controlar a expressão de mais de 400 produtos gênicos diferentes necessários para a sobrevivência e expansão das células tumorais (HEMSHEKHAR et al., 2012; LIPKA et al., 2014; SEONG et al., 2014). O AA foi identificado como o primeiro produto natural

inibidor da atividade p300 HAT. Baseado nesses resultados, o uso do AA se tornou um componente muito interessante para o desenvolvimento de tratamentos na área de prevenção do câncer (GERHAUSER, 2012).

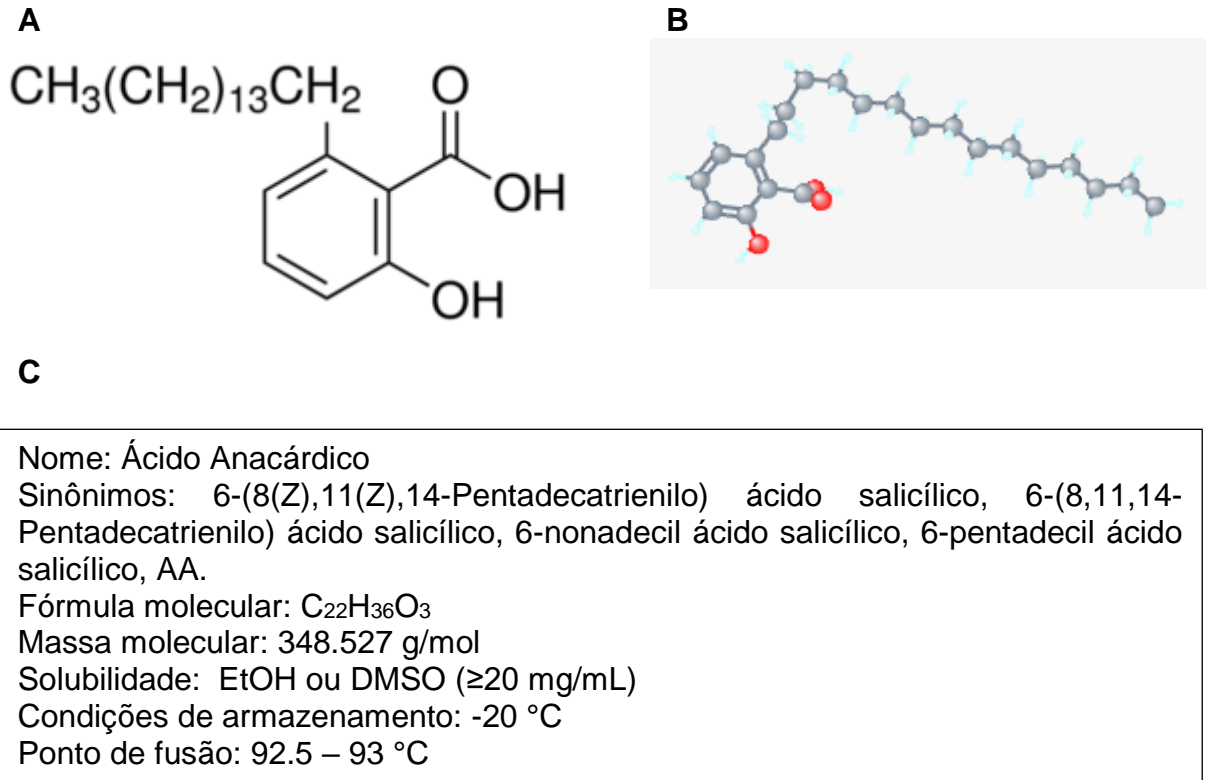


Figura 9. Estrutura química do ácido anacárdico em 2D (**A**) e em 3D (**B**) e as características do ácido anacárdico (**C**). Fontes: Sigma-Aldrich; PubChem; BioVision.

Além das atividades biológicas, o AA proveniente do LCCC, vem se mostrando como um potencial candidato para o desenvolvimento de nanomateriais (AL-HAZZANI et al., 2012). Apesar de apresentar efeitos antitumorais promissores, até o presente momento, não foram reportados estudos avaliando os efeitos do AA em câncer de pele não melanoma.

1.4 ÓLEO DE AÇAÍ

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) também vem atraindo muita atenção de pesquisadores devido a suas propriedades antioxidantes demonstradas *in vitro*. Rico

em polifenóis variados, sendo a antocianina o polifenol predominante representando mais de 90% do conteúdo polifenólico total do açaí, foi mostrado que essa classe de biomoléculas apresenta atividade como supressor tumoral, inibindo e retardando o crescimento de células de câncer do cólon, e exerce também função pró-apoptótica e antiproliferativa em células de leucemia (DIAS et al., 2014; FERRARI; ROCHA-FILHO, 2011).

Os polifenóis naturais do açaí, vem atraindo muita atenção devido à sua alta capacidade antioxidante demonstrada *in vitro*. Os polifenóis do açaí são principalmente os ácidos fenólicos, flavonóides e lignanas (CHIN et al., 2008; DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004). Entre os flavonoides anticiânicos, Cianidina-3-O-glucosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo constituem as antocianinas predominantes em açaí (DIAS et al., 2014).

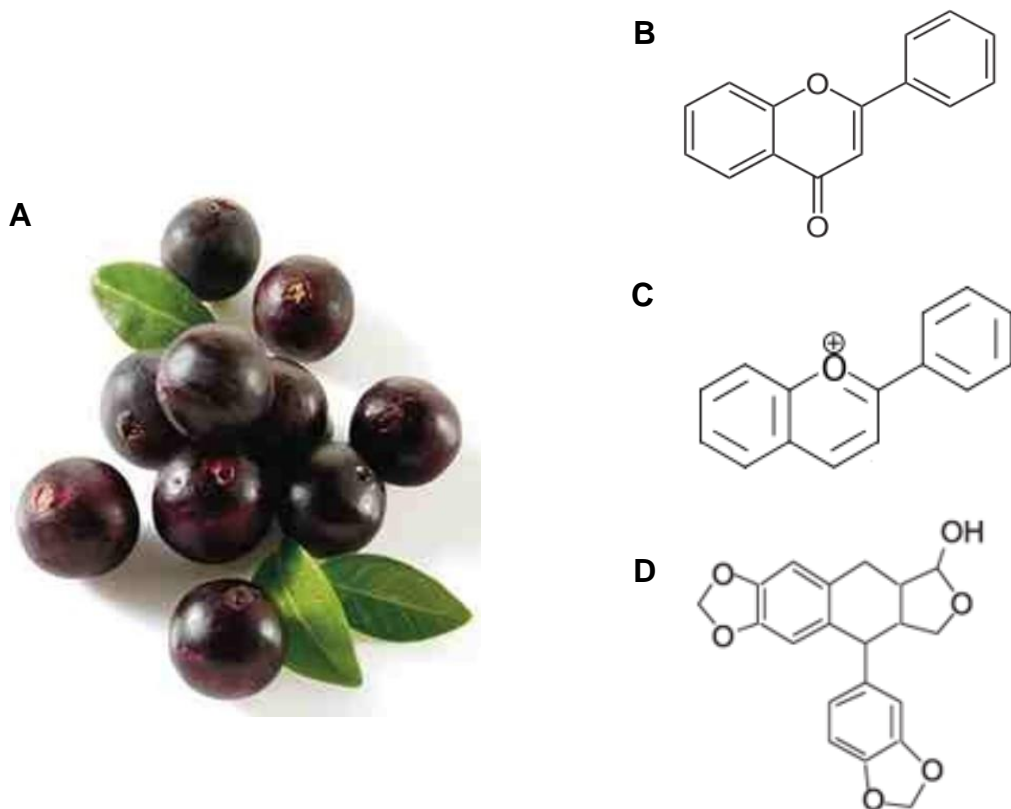


Figura 10. Fruto do açaí (A) e alguns de seus componentes químicos: flavonoide (B), antocianina (C) e lignana (D). Fontes: <http://www.ecoviveiro.com.br/>; <http://seminariodequimica.over-blog.es/>; <https://en.wikipedia.org/wiki/>; GUARATINI et al., 2009.

Os polifenóis possuem a capacidade de modular diferentes estágios do processo apoptótico e/ou na expressão de proteínas regulatórias, incluindo a desregulação do NF-kB, clivagem da caspase-3, desregulação expressão

antiapoptótica Bcl-2 e Bcl-XL, e o aumento da expressão do proapoptótico Bax.(DAHER et al., 2014; DIAS et al., 2014). As antocianinas são pertencentes a classe de polifenóis, e servem como antioxidantes atuando como um fotoprotetor eliminando diretamente as espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo (FERRARI; ROCHA-FILHO, 2011). Os flavonóides não antociânicos identificados na polpa de açaí constituem homoorientina, orientina, taxifolino desoxihexose e isovitexina (GALLORI et al., 2004)

Pesquisas mostram que o óleo de açaí em nanoemulsão possui atividade contra células de câncer de pele melanoma em modelos *in vitro* e *in vivo* (MONGE-FUENTES et al., 2017) e em células não melanoma *in vitro* e *in vivo* (RAMOS, 2013). Apesar de promissor, os mecanismos de ação relacionados às atividades biológicas do óleo de açaí ainda estão sendo investigados. Segundo HEINRICH e colaboradores (2011), as análises referentes à avaliação do potencial farmacológico do açaí ainda precisam ser extensivamente expandidas realizando-se estudos epidemiológicos, toxicológicos e outros experimentos *in vitro* e *in vivo* mais detalhados, a fim de construir uma base de dados mais robusta que represente seus efeitos biológicos de forma mais precisa.

A maioria dos compostos fitoquímicos que apresentam propriedades terapêuticas (e.g. AA, polifenóis presentes no óleo de açaí) são pouco solúveis em soluções aquosas, o que dificulta sua administração e absorção pelo organismo. Nesse contexto, o encapsulamento desses compostos fitoquímicos em nanoestruturas torna-se uma alternativa plausível para modular a biodisponibilidade e a biodistribuição dos mesmos, potencializando assim seus efeitos biológicos (HUANG et al., 2010).

1.5 NANOTECNOLOGIA

O termo nanotecnologia, surgido em meados do século XX. Esse campo vem se apresentando com uma área de extrema importância para o progresso da ciência (SCHAEFER, 2010). É compreendida como a ciência que estuda a matéria e desenvolve tecnologias em escala nanométricas, geralmente entre 1 a 100 nm (MIGNANI et al., 2015; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010).

A nanotecnologia apresenta potencial de transformação no campo farmacêutico, oferecendo possibilidades de encapsular e entregar estrategicamente fármacos, proteínas, ácidos nucleicos ou vacinas enquanto melhora a terapêutica. A nanoencapsulação de um composto aumenta a permeabilidade e o efeito de retenção do fármaco na célula alvo, principalmente em um tecido canceroso, uma vez que o mesmo apresenta vascularização deficiente com drenagem linfática prejudicada (SRIRAMAN; ARYASOMAYAJULA; TORCHILIN, 2014). É evidente que a nanotecnologia aplicada à medicina irá provar ser extremamente efetiva ao criar novas terapias e também melhorar terapias convencionais clássicas.

Sistemas nanométricos ou micrométricos próprios para encapsulação e entrega de fármacos podem ser estruturados a partir de diversos materiais como lipídios, ouro, carbono, proteínas e sistemas poliméricos (MORACHIS; MAHMOUD; ALMUTAIRI, 2012). Os lipídios, por serem muito usados e bem caracterizados, apresentam uma vantagem por apresentar uma dinâmica que permite criar clusters de peptídeos e de outros ligantes aumentando a afinidade de interação com a célula alvo (MORACHIS; MAHMOUD; ALMUTAIRI, 2012).

Dentro dos sistemas lipídicos nos encontramos as emulsões das quais são amplamente utilizadas em uma grande variedade de indústrias das quais a farmacêutica, cosmética, agroquímica e a alimentícia fazem parte (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). Emulsões são dispersões coloidais heterogêneas, termodinamicamente instáveis, que possuem pelo menos dois líquidos imiscíveis em sua composição (DAHER et al., 2014; RAMOS, 2013; SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). Por não serem formadas espontaneamente, seu preparo é diretamente influenciado pelas condições termodinâmicas, modo de preparo e a ordem de adição dos componentes. Sua estrutura se dá pela presença de gotículas da fase dispersa na fase contínua, sendo que as emulsões mais simples são classificadas como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) dependendo de qual fase constitui a fase dispersa (FORGIARINI et al., 2001; SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). Por não apresentarem estabilidade com a variação de temperatura e por períodos longos de tempo, vem se utilizando as nanoemulsões.

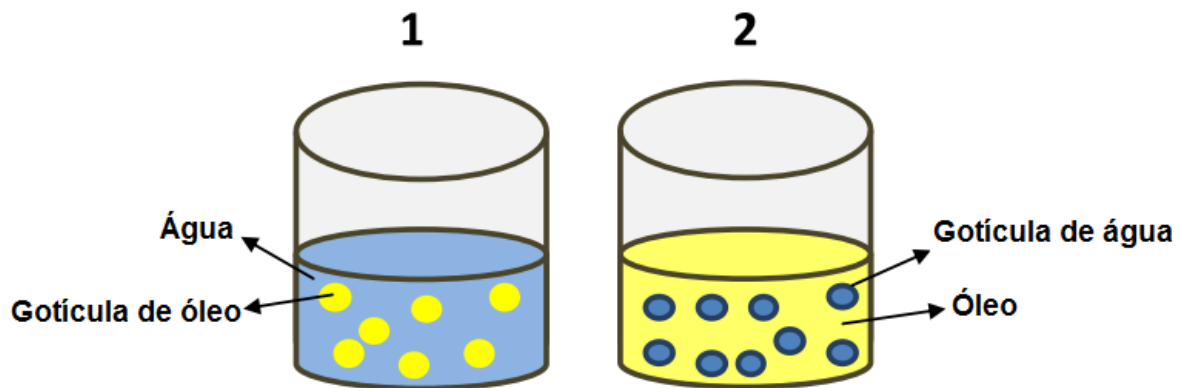


Figura 11. Diagrama esquemático de emulsão do tipo óleo/água (1) e água/óleo (2). Adaptado de RAMOS (2013).

Nanoemulsões podem ser classificadas como um tipo de nanossistema lipídico onde há uma mistura heterogênea em escala nanométrica de três fases: fase oleosa, fase aquosa e os tensoativos, com nanogotículas com diâmetro de 50 a 1000nm, sendo que normalmente elas se apresentam com um diâmetro médio de 100 a 500 nm (SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010). Possuem aparência transparente ou translúcida, com propriedades mecânicas, ópticas, longa duração, metaestável que podem ser ajustadas ou melhoradas com outros materiais desejáveis, tais como revestimentos, biomoléculas e aditivos químicos, podendo ser incorporados simultaneamente (FRYD; MASON, 2012; WANG et al., 2009). Essas modificações promovem uma melhora nos princípios e na concepção da nanoemulsão, fazendo com que ela possua a composição e as propriedades desejadas (FRYD; MASON, 2012). Geralmente são produzidas com materiais biodegradáveis, como óleos naturais, e permitem a solubilização de componentes hidrofóbicos na fase oleosa, ou a modificação da partícula de óleo para aumentar o tempo de circulação visando atingir o tumor (GANTA; AMIJI, 2009; SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). As propriedades das nanoemulsões dependem muito da sua condição termodinâmica, mas também do protocolo de preparo, principalmente a ordem no qual os componentes foram adicionados, despertando o interesse para o estudo de práticas e aplicações dessas nanoestruturas em áreas biomédicas (WANG et al., 2009).

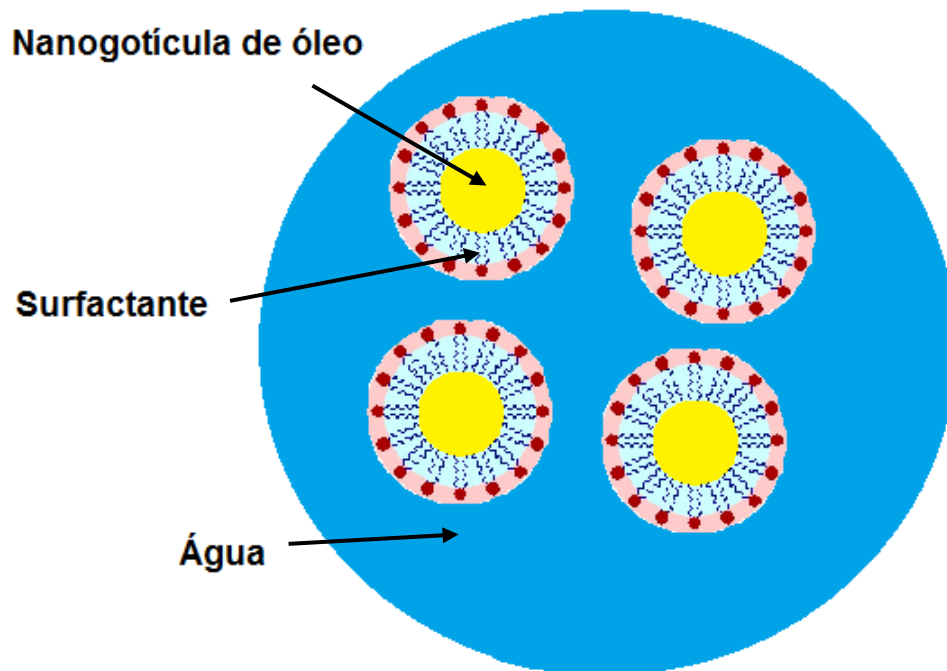


Figura 12. Diagrama esquemático de uma nanoemulsão.



Figura 13. Foto de uma nanoemulsão (esquerda) e uma macroemulsão (direita). (SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010)

RAMOS (2013) já avaliou a citotoxicidade da terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão a base de óleo de açaí contra o câncer de pele não-melanoma. Assim, a proposta do estudo é de propor uma outra forma de formulação das nanoemulsões com base de óleo de açaí (AçNE), e modificar sua estrutura de superfície afim de melhorar seu desempenho.

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados, no tratamento de câncer de pele não melanoma *in vitro*.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de pele é o tipo de câncer que ocorre com mais frequência no mundo. O CPM (câncer de pele melanoma), apesar de mais agressivo, é o que ocorre com menor incidência, e o câncer de pele não melanoma ocorre com maior incidência, porém é menos invasivo. O tratamento de câncer pode ser realizado de várias formas, como por exemplo com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Apesar de ter uma vasta gama de tratamentos, estes nem sempre são eficientes, podendo também ser muito invasivos, uma vez que são inespecíficos, pois atuam não só nas células tumorais, mas também nas células não tumorais, podendo acarretar em um quadro de imunodeficiência.

O ácido anacárdico é proveniente do líquido da casca da castanha do caju e apresenta características antitumorais, antibióticas, gastroprotetoras e antioxidantes. O açaí, da mesma forma, apresenta atividades antioxidantes, podendo também atuar como supressor tumoral, impossibilitando e desacelerando o crescimento de células cancerígenas. Ambos são compostos naturais provenientes da biodiversidade brasileira e que demonstram grande potencial clínico terapêutico.

As atividades antitumorais da combinação do ácido anacárdico e compostos fitoquímicos presentes no óleo de açaí ainda não foram avaliadas, o que torna essa frente de pesquisa promissora para o desenvolvimento de tratamentos combinatórios e alternativos para o câncer, uma vez que a associação desses compostos pode contribuir para intensificar a efetividade de tratamentos antitumorais. Adicionalmente, a nanoestruturação de tais compostos pode contribuir para favorecer a biodisponibilidade e interações dos mesmos com o tumor, uma vez que eles apresentam caráter hidrofóbico.

Desse modo, a avaliação da combinação desses dois biocompostos da biodiversidade brasileira pode-se instaurar-se como uma nova terapia para o câncer de pele não melanoma, mais eficiente e específica, é com compostos naturais. Além dessa avaliação, investiu-se tempo para analisar as modificações da superfície da nanoemulsão, afim de melhorar o seu potencial e sua estabilidade, o que é importantíssimo para os efeitos finais.

Apesar de já existirem dados utilizando nanoemulsões com óleo de açaí, os efeitos da associação de um nanoemulsão com base de óleo açaí associada com ácido anacárdico ainda não foram identificados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

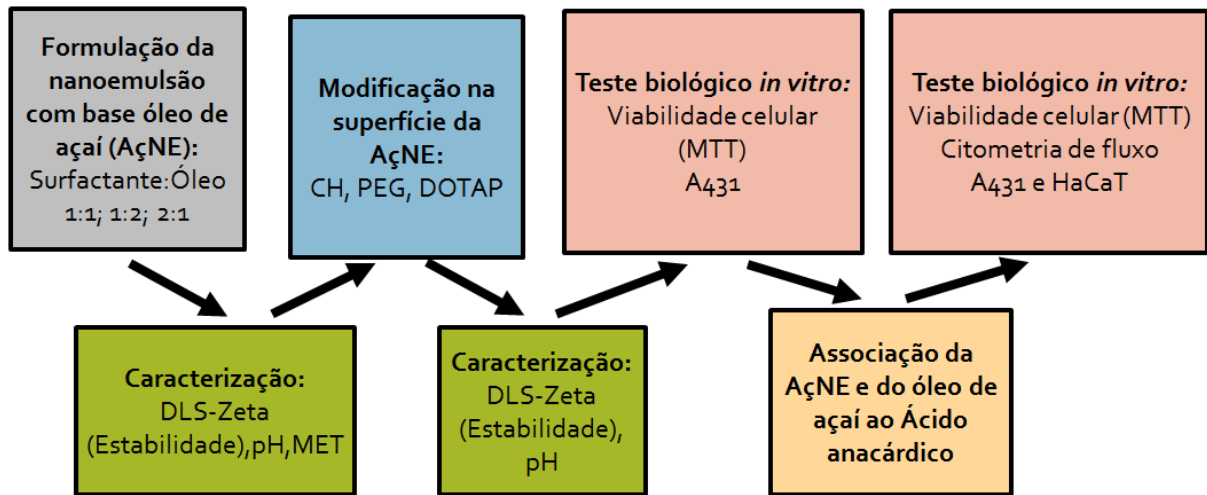
Avaliar os efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), livres ou nanoestruturados em diferentes formulações, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar e desenvolver nanoemulsões à base de óleo de açaí com gotículas recobertas ou não com polietilenoglicol (PEG), polímeros de quitosana (CH) ou 1,2-Dioleoiloxi-3-(trimetilamônio) propano (DOTAP).
- Caracterizar as nanoemulsões obtidas quanto ao aspecto macroscópico, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, carga de superfície e pH.
- Determinar a estabilidade das nanoemulsões desenvolvidas em diferentes condições de temperatura e tempo de armazenamento.
- Analisar o potencial de combinações entre o ácido anacárdico e óleo de açaí, livres ou nanoestruturados, no metabolismo, na viabilidade celular das células de linhagem de queratinócitos humano não tumoral (HaCaT), *in vitro*.
- Analisar o potencial de combinações entre o ácido anacárdico e óleo de açaí, livres ou nanoestruturados, no metabolismo, integridade de membrana e proliferação de células tumorais de câncer de pele espinocelular da linhagem A431, *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Apresenta-se a seguir o desenho de esquema experimental dos experimentos realizados nesse projeto (Fig. 12).



*AçNE, Nanoemulsão com base óleo de açaí; CH, Quitosana; PEG, Polietilenoglicol; DOTAP, 1,2-Dioleoiloxi-3-(trimetilamônio) propano.

Figura 14. Esquema do desenho experimental

4.1 FORMULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ

Foi utilizado o protocolo descrito por ARAUJO e colaboradores (2014) modificado. O óleo de açaí (Beraca, Brasil) foi dissolvido na presença de surfactante na proporção (óleo:surfactante) de 1:1, 1:2 ou 2:1 (m/m) para a formação de um concentrado de nanoemulsão a base de óleo de açaí. Detalhes referentes ao tipo de surfactante utilizado não foram descritos devido ao andamento de um processo de pedido de patente. As formulações com carga de superfície negativa foram feitas utilizando-se água nanopura como dispersante ou dissolvendo-se o polímero polietileno glicol (PEG) junto da água, e as formulações positivas foram feitas adicionando-se fosfolípidios catiônicos (1,2-Dioleoiloxi-3-(trimetilamônio) propano, DOTAP) (Avanti Polar Lipids, EUA) ou polímeros de quitosana (CH) de alta massa molecular (Sigma, EUA) na água nanopura. Diferentes proporções do concentrado foram diluídas em água nanopura e submetidas à sonicação (equipamento de 400 W – potência 4) por 5 minutos em banho de gelo.

Todas as nanoformulações desenvolvidas no presente estudo (Fig. 15) foram armazenadas a 4 °C e em abrigo de luz, tendo em vista sua melhor estabilidade.

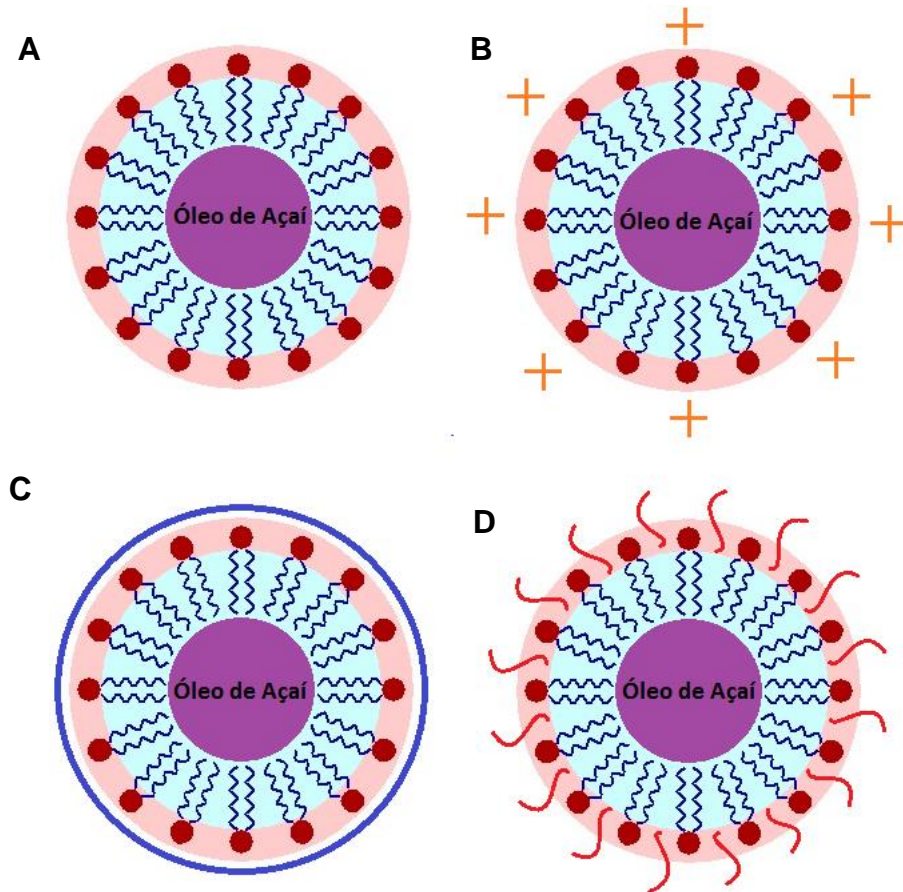


Figura 15. Representação das nanoemulsões com base de óleo de açaí livre (A) e recobertas por quitosana (B), polietilenoglicol (C) e DOTAP (D)

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e a carga de superfície das nanogotículas foram determinados por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética utilizando-se o equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, UK). As amostras não foram diluídas para a análise.

4.2.1 ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NANOEMULSÕES

As alíquotas de 1 mL das formulações foram estocadas em diferentes temperaturas (4 °C ou temperatura ambiente), ao abrigo da luz, e analisadas a cada 15 dias (por um período total de 180 dias para as formulações 1:1, 1:2 e 2:1, e 120 dias para as AçNE, AçNE CH, AçNE PEG e AçNE DOTAP) pelos métodos de caracterização descritos no item 4.2.2.

4.2.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA

As AÇNEs com concentrações diferentes (1:1, 1:2 e 2:1) e as AÇNEs (AÇNE, AÇNE CH, AÇNE PEG e AÇNE DOTAP) os controles (Branco 1:1, Branco, 1:2, Branco 2:1, Branco. Branco CH, Branco PEG, Branco DOTAP) foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta de superfície (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, UK) no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB). Estas técnicas oferecem informações referentes ao diâmetro hidrodinâmico (DH) a partir do movimento Browniano de partículas dispersas em meio líquido. Uma camada de solvatação se forma ao redor dessas partículas, o que resulta em uma superestimação do DH. O tamanho é obtido de acordo com a distribuição em intensidade. A partir dessa informação, as distribuições em número e em volume são geradas considerando uma solução contendo duas populações de partículas de tamanho diferente em igual proporção. O índice de polidispersão (Pdl) é um dado importante e corresponde à variação do tamanho dentro de uma amostra relativa à sua distribuição em intensidade. O seu valor varia de 0 a 1, sendo que quanto menor o valor, mais monodispersa é a amostra. Além disso, o DLS determina a carga de superfície (potencial Zeta) das partículas, indicando a estabilidade coloidal desta.

As amostras foram analisadas após diluição em água ultrapura (1:10, v/v). As medidas foram realizadas em triplicata, em um ângulo de espalhamento fixo de 90° e a 25°C. A representação dos resultados foi feita a partir do DH em número e em intensidade (Z-average), do Pdl e do potencial Zeta utilizando a versão 7.04 do software ZetaSizer. Os valores foram representados pela média \pm desvio padrão da média e os gráficos foram plotados no programa GraphPad Prism®5 e 6.

4.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A AÇNE 2:1 foi analisada por MET no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília com o auxílio da MsC. Márcia Cristina Oliveira da Rocha. Esta técnica fornece informações sobre o tamanho e formato das gotículas contidas na AÇNE. Após diluição das amostras em água ultrapura (1:12,5, v/v), 2 μ L foram aplicados em uma grade de cobre de 300 mesh

recoberto por uma resina de Formvar. Após 24 horas de secagem à temperatura ambiente a amostra ficou exposta por 30 minutos ao óxido de ósmio para a contraste negativo. O suporte contendo a amostra foi introduzido no microscópio JEM-1011 (Jeol, Japão). A imagem foi obtida em um aumento de 250.000 x.

4.3 ÁCIDO ANACÁRDICO

O ácido anacárdico (BioVision, EUA) foi solubilizado em DMSO em uma concentração de 50 mM e armazenado a temperatura de -20 °C e ao abrigo de luz.

4.4 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.4.1 LINHAGENS CELULARES

A linhagem de CPNM utilizada (A431) foi comprada da American Type Culture Collection (ATCC). A linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Ambas são linhagens isoladas de humano e imortalizadas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.

4.4.2 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES

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

4.4.3 TRIPSINIZAÇÃO DAS CÉLULAS

As linhagens celulares utilizadas (A431 e HaCAT) são aderentes. Dessa forma, a tripsina, uma enzima que hidrolisa as ligações peptídicas, foi utilizada para soltar as

células da superfície de garrafa de cultura. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi descartado e 4 mL de tripsina (Tripsina 0,25%, Life, EUA) foram adicionados. As células foram incubadas por 3 a 6 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após observar por microscopia de luz que todas as células estavam soltas, 4 mL de meio de cultura completo foram adicionados para neutralizar o efeito da tripsina. O conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugado. Após 3 minutos de centrifugação a 1341 g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura e utilizado nos passos descritos a seguir.

4.4.4 PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS

Dez microlitros (µL) das células ressuscitadas em 1 mL de meio de cultura foram separados em um microtubo de 0,6 mL e 90 µL de azul de tripan foram adicionados. Após homogeneização, 10 µL foram colocados em uma câmara de Neubauer e as células foram contadas em microscópio de luz invertido. O número de células foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Número de células /mL} = \frac{\text{Número de Células Contadas}}{\text{Número de Quadrantes Contados}} \times \text{Fator de Diluição} \times 10^4$$

Foram adicionadas 3x10³ células/poço em placa de 96 poços de fundo achatado. Número de células necessários para que as células não atingissem a confluência no período experimental utilizado. Após o plaqueamento, as placas contendo as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.4.5 TRATAMENTOS

As AçNEs, Óleo, AA e os seus respectivos controles (Branco, Etanol, DMSO), foram diluídos em meio de cultura completo visando obter as concentrações desejadas para os tratamentos. Devido à presença de ácido acético nas formulações de AçNE CH, Branco CH, o ajuste do pH para 7 foi feito utilizando-se uma solução de

NaOH 10 M e confirmado com fita indicadora de pH. Com o pH ajustado o meio supostamente deveria mudar da coloração amarelada a uma coloração roxa clara parecida com a do controle negativo. O controle negativo foi preparado com água ultrapura em meio de cultura completo adicionando-se volumes equivalentes aos volumes acrescentados para os grupos experimentais. Para a aplicação do tratamento nas células, o meio de cultura de cada poço foi descartado na medida em que eram adicionados 200 μ L das diferentes amostras. As placas foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 e 72 horas.

Os grupos dos tratamentos experimentais estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Siglas de identificação dos grupos de tratamentos.

SIGLAS	AMOSTRAS REFERENTES
AçNE 1:1	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, 1:1 (Surfactante: Óleo)
Branco 1:1	Surfactante e água
AçNE 1:2	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, 1:2 (Surfactante: Óleo)
Branco 1:2	Surfactante e água
AçNE 2:1	Nanoemulsão à base de óleo de açaí, 2:1 (Surfactante: Óleo)
Branco 2:1	Surfactante e água
AçNE	Nanoemulsão à base de óleo de açaí (Surfactante: Óleo)
Branco	Surfactante e água
AçNE CH	Nanoemulsão à base de óleo de açaí com CH
Branco CH	Surfactante e água com CH
AçNE PEG.	Nanoemulsão à base de óleo de açaí com PEG
Branco PEG	Surfactante e água com PEG
AçNE DOTAP	Nanoemulsão à base de óleo de açaí com DOTAP
Branco DOTAP	Surfactante e água com DOTAP
Óleo Livre	Óleo de Açaí livre
AA	Ácido Anacárdico
AçNE + AA	Nanoemulsão à base de óleo de açaí associada ao Ácido Anacárdico
AçNE CH + AA	Nanoemulsão à base de óleo de açaí com quitosana, associada ao Ácido Anacárdico
Branco + AA	Surfactante e água associado ao Ácido Anacárdico
Branco CH + AA	Surfactante e água com CH associado ao Ácido Anacárdico
Etanol	Etanol diluído em água (Mesma concentração do óleo de açaí)
DMSO	Dimetilsulfóxido (Mesma concentração do AA)
Etanol + AA	Etanol diluído em água (Mesma concentração do óleo de açaí) associado ao Ácido Anacárdico
Branco + DMSO	Surfactante e água associado ao DMSO
Óleo Livre + DMSO	Óleo de Açaí livre associado ao DMSO

4.5 TESTES EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

4.5.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DE MTT (BROMETO DE 3-(4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL-TETRAZOL

Após 24 e 72 horas de exposição das células às diferentes concentrações dos tratamentos, o ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT foi realizado. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução do MTT (amarelo ouro) pela ação de desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH em cristais de formazan (azul). O meio de cultura da placa com as diferentes amostras foi retirado e 150 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura completo – 15 μL de MTT (Life, EUA) com 135 μL de meio de cultura) foram adicionados a cada poço. Após 2 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂, a solução de MTT foi descartada e 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EUA) foram acrescentados em cada poço da placa com o intuito de dissolver os cristais de formazan formados. A absorbância dos poços foi avaliada por espectrofotômetro (Molecular devices, EUA) a 595 nm. Os resultados foram apresentados em porcentagem de viabilidade celular considerando a absorbância do controle negativo (água ultrapura com meio DMEM completo) como 100% de viabilidade. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas. Foi realizado três ensaios em triplicatas.

4.5.2 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite classificar partículas microscópicas em suspensão, contar e examinar. Diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos podem ser avaliados simultaneamente (Carvalho et al, 2010). As análises foram realizadas no citômetro (BD FACSVerse™, EUA) do Departamento de Biologia Celular no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Para a realização dos experimentos, placas de 12 poços com fundo achatado foram utilizadas. As células em cultura foram tripsinizadas e contadas de acordo com os procedimentos descritos 50 nos itens 3.5.1 e 3.5.2. O volume de 1 mL de meio de cultura contendo 5×10^4 células foi adicionado em cada poço das placas. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o tratamento das células foi realizado com as AçNE, Óleo livre, AA, AçNE + AA e Óleo livre + AA na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$ para a AçNE e o Óleo livre, 125 μM para o AA, o controle

negativo (água ultrapura) e o controle positivo (peróxido de hidrogênio – H₂O₂). Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante de cada poço foi coletado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL correspondentes a cada um dos poços. As células foram tripsinizadas com 400 µL de tripsina e a placa foi incubada na estufa por 5 minutos. O sobrenadante coletado previamente foi colocado novamente em cada poço correspondente da placa para neutralizar o efeito da tripsina. As células foram ressuspensas e coletadas novamente nos microtubos correspondentes para centrifugação a 3083 g, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em PBS 1x e centrifugado novamente para retirar o excesso de meio de cultura e tratamento. Em seguida, as células foram processadas de acordo com cada experimento conforme descrito abaixo. Durante as análises por citometria de fluxo (FACS), 10000 eventos foram adquiridos para cada amostra e cada experimento. Para cada avaliação de citometria de fluxo foi realizado um experimento independente com triplicata. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.5.3 FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CICLO CELULAR

A avaliação de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas foi determinada com a adição de iodeto de propídeo (PI). O PI é um dos corantes com afinidade por DNA mais utilizados em citometria de fluxo (FACS) por ser capaz de se intercalar entre pequenas sequências de nucleotídeos (Carvalho et al, 2010).

O pellet de células tratadas foi ressuspensado em 1 mL de etanol 70% gelado e armazenado a – 20 °C por pelo menos 24 horas ou até o dia da análise. No dia da análise, cada microtubo foi centrifugado a 3083 g, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas novamente. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de PBS 1x contendo RNase (50 µM) foram adicionados ao pellet. As amostras foram incubadas na estufa a 37°C por 30 minutos protegidos da luz. Em seguida, 100 µL de PI (20 µg/mL) (Probes – Thermo Fisher, EUA) preparado em PBS foram adicionados à temperatura ambiente por 30 minutos protegidos da luz. Após esse procedimento, as células foram analisadas por FACS. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Potencial De Membrana Mitocondrial

4.5.3.1 A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada pela adição de Rodamina 123 (Probes – Thermo Fisher, EUA). A Rodamina 123 é um composto catiônico de fluorescência verde que se associa às membranas das mitocôndrias de acordo com a sua polarização (TermoFisher, 2015). A solução estoque de Rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL. O volume de 300 µL de Rodamina 123 (5 µg/mL) em PBS foi adicionado ao pellet das células tratadas e incubado por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3083 g, por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e 300 µL de PBS foram acrescentados. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirar o excesso de Rodamina 123. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo e analisadas por FACS imediatamente. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.5.3.2 Exposição De Fosfatidilserina

A fosfatidilserina é um fosfolípídio presente na superfície interna da membrana plasmática das células. Durante o processo de apoptose, ela é translocada para a camada externa da membrana funcionando assim como sinalizador para a fagocitose. A Anexina V é uma proteína utilizada para identificar as células em fase inicial de apoptose por possuir uma alta afinidade à fosfatidilserina. Nas análises por FACS, a Anexina está associada a um fluorocromo tipo FITC e é usada simultaneamente com o PI. Somente as células mortas ou com membrana danificada são permeáveis ao PI que é um indicador de apoptose tardia e/ou de morte celular por necrose (BD Pharmingen™). O paclitaxel (PTX) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na concentração de 50 nM e 29,4 µM, respectivamente, foram utilizados com controles positivos de mortes celulares por apoptose e necrose, respectivamente. O PTX é um medicamento que se liga à tubulina, proteína do citoesqueleto das células, reduzindo a proliferação celular e levando à morte celular por apoptose. Em paralelo, o H₂O₂ é um agente oxidante que age diretamente na membrana lipídica e no DNA, levando a ruptura da membrana, ocasionando morte celular por necrose. O pellet das células tratadas foi ressuspenso em 500 µL de PBS gelado e centrifugado a 3083 g, por 5 minutos a 4

°C. Após descartar o sobrenadante, 100 µL de tampão de ligação (0,1 M de HEPES (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂) foi adicionado ao pellet. Em seguida, 5 µL de solução de Anexina V (BD, EUA) e 10 µL de solução de PI (50 µg/mL) foram acrescentados em cada microtubo. A mistura foi deixada por 15 minutos protegida da luz a temperatura ambiente. Logo em seguida, 300 µL de tampão de ligação foram acrescentados. As amostras foram colocadas em gelo e analisadas por FACS imediatamente. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Avaliação Da Integridade De Membrana E Proliferação Celular

4.5.3.3 O processo de plaqueamento descrito acima (item 4.4.4) foi realizado para o teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular utilizando-se placa de 12 poços com fundo achatado contendo 5×10^4 células/poço. Após 24 horas de exposição aos diferentes tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o pellet obtido foi ressuscitado em 100 µL de meio de cultura completo (item 4.4.3). 10 µL de suspensão de células foram retirados e adicionados a uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA) na proporção de 1:1 (v/v). O número de células totais foi determinado em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 4.4.3, contando-se células com coloração azul e não azuis. Este ensaio permite diferenciar as células viáveis ou não viáveis de acordo com o estado da membrana plasmática. O azul de tripan penetra nas células que apresentam membrana plasmática danificada e as coram de azul. As células viáveis com membrana intacta não apresentam coloração. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.6 TESTES ESTATÍSTICOS

Todos os resultados de caracterização e ensaios celulares foram obtidos em triplicata e apresentados como a média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Prism 5.01 (EUA). As possíveis diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) de um fator e pelo post teste Bonferroni e Dunnett, considerando-se

estatisticamente significativo $P < 0,05$. Os gráficos foram plotados no programa Prism 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado tendo como principal objetivo sintetizar nanoemulsões com base óleo de açaí (AçNE), livres ou recobertas com o biopolímero quitosana (CH), polímero PEG, lipídio catiônico DOTAP, e avaliar suas características e mecanismos de ação em linhagem de câncer de pele não melanoma (A431). O trabalho foi dividido em etapas, onde a primeira foi determinar a concentração de surfactante:óleo, para a formulação da AçNE e avaliar sua estabilidade. A segunda etapa foi recobrir as AçNEs e avaliar a sua estabilidade, tanto das nanoemulsões recobertas quanto das livres, bem como avaliar a influência do biopolímero quitosana, polímero PEG, lipídio catiônico DOTAP nas propriedades da AçNE, e avaliar seus potenciais de ação em células tumorais. A última etapa consistiu em avaliar a influência da associação do ácido anacárdico com a AçNE e seus mecanismos de ação em células tumorais e não tumorais.

5.1 FORMULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DE AÇAÍ (AçNEs)

5.1.1 CARACTERÍSTICAS DAS NANOEMULSÕES APÓS FORMULAÇÃO

As primeiras nanoemulsões utilizando o óleo de açaí como base (AçNE) foram formuladas utilizando três proporções de surfactante:óleo, sendo as proporções utilizadas 1:1, 1:2 e 2:1 massa/massa (m/m), que posteriormente foram armazenadas em temperatura ambiente (T.A.) e a 4 °C (Tabela 3) para identificar qual seria a melhor forma de armazenamento e averiguar se a temperatura iria ter algum impacto na estabilidade da formulação (Fig. 16, Fig. 17, e Fig. 18).

Tabela 3. Caracterização por DLS das nanoemulsões de óleo de açaí (AçNE) desenvolvidas com variadas proporções de surfactante:óleo (m/m) armazenadas em diferentes condições de temperatura (Temperatura Ambiente e a 4 °C) após 1 dia de sua formulação.

Nanoemulsão	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)	pH
AçNE 1:1 – T.A.	142,9 ± 2,9	0,198	-25,7 ± 0,5	7
AçNE 1:1 – 4°C	150,0 ± 1,0	0,187	-24,0 ± 0,9	7
AçNE 2:1 – T.A.	126,3 ± 0,6	0,217	-24,5 ± 1,5	7
AçNE 2:1 – 4°C	128,8 ± 0,2	0,200	-24,9 ± 1,5	7
AçNE 1:2 – T.A.	152,2 ± 0,6	0,220	-21,1 ± 0,4	7
AçNE 1:2 – 4°C	149,1 ± 1,0	0,208	-20,4 ± 0,2	7

*Pdl= Índice de polidispersão; **Desvio padrão Pdl: <0,01

Foi observado na tabela 3 que todas as formulações apresentaram formação de nanogotículas abaixo de 200 nm após sua formulação, com populações homogêneas com índice de polidispersão menor que 0,220, potencial Zeta entre -20 e -26 mV e pH de 7. As formulações de AçNE 2:1 apresentaram o menor diâmetro hidrodinâmico se comparado as outras formulações. Isso pode ocorrer pois concentrações altas de surfactante na fase contínua reduzem a tensão superficial, aumentando a estabilidade da gotícula e gerando nanogotículas com diâmetro hidrodinâmico menores (FRYD; MASON, 2012).

5.1.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS NANOEMULSÕES APÓS PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

Para observar a estabilidade, as formulações foram armazenadas por 180 dias ao abrigo de luz em temperatura ambiente e a 4 °C, mensurando o seu diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Fig.16), potencial zeta (Fig.17), potencial Hidrogeniônico (Fig.18) e sua morfologia por meio do método de microscopia eletrônica de transmissão (Fig.19).

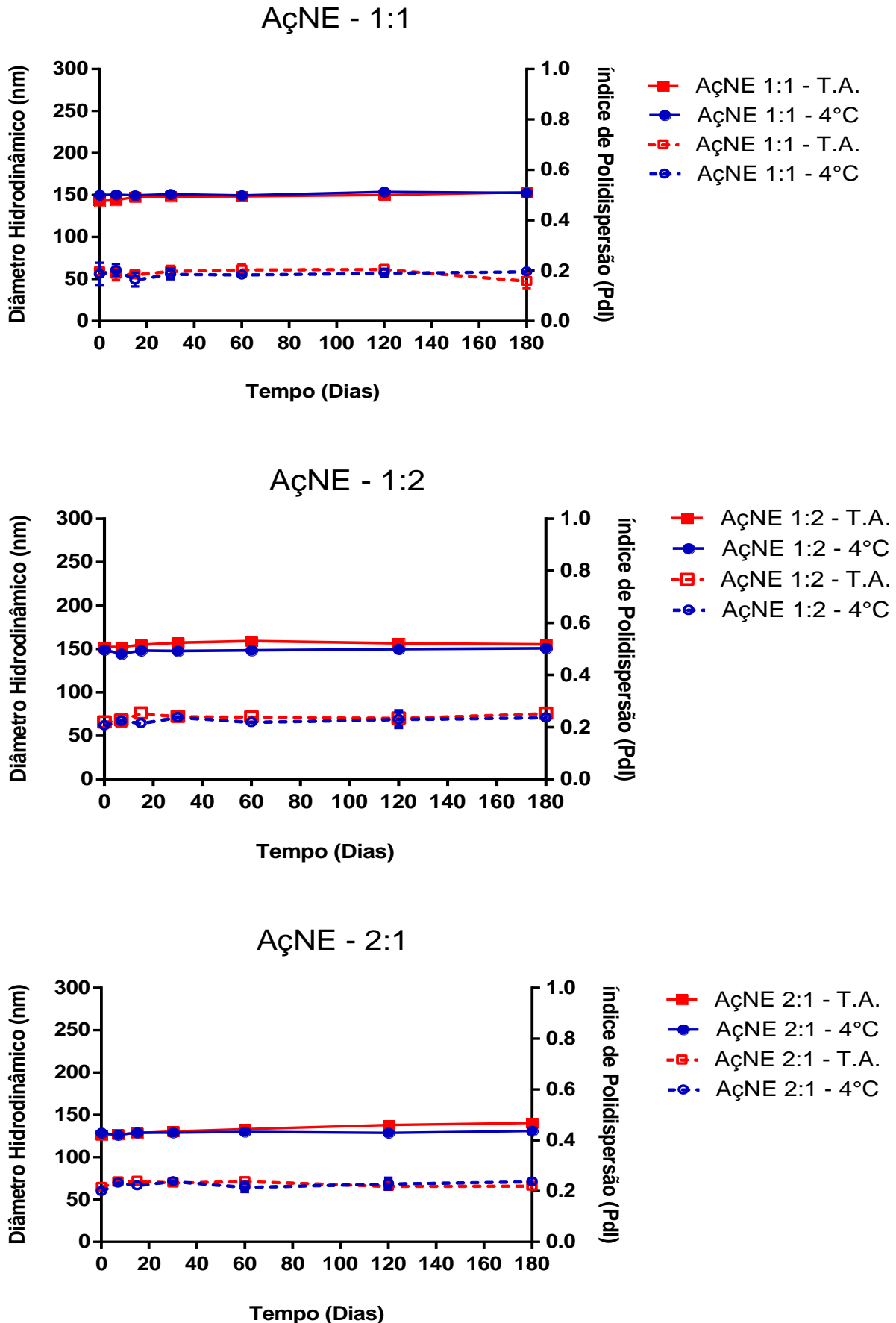


Figura 16. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontinua, das diferentes formulações de AçNE armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 180 dias.

As formulações não apresentaram grandes variações ao passar dos dias (Fig. 16) mantendo assim suas características coloidais, porém as formulações armazenadas a 4 °C apresentaram menor variação de diâmetro hidrodinâmico após 180 dias, sendo que a AÇNE 2:1 armazenada a 4 °C apresentou uma nanogotícula com diâmetro hidrodinâmico médio de 129 nm, equivalendo a nanogotícula que possui o menor diâmetro hidrodinâmico. Foi possível observar a diferença do diâmetro hidrodinâmico entre as formulações com concentrações diferentes de surfactante:óleo sendo que a formulação 1:1 obtiveram a média do diâmetro hidrodinâmico de 147,7 nm e 150,6 nm na temperatura ambiente e à 4 °C, respectivamente. Na formulação de 1:2, 155,3 nm e 148,3 nm, na temperatura ambiente e à 4C, respectivamente.

Os resultados da polidispersão (Fig. 16) não apresentaram grandes variações independente da proporção surfactante:óleo, e não se diferenciando muito de acordo com as temperatura a qual foi armazenada, mostrando que as formulações se mantem homogêneas.

Essa estabilidade se dá pelo pequeno tamanho das nanogotículas e sua polidispersão, que garantem a habilidade da mesma de prevenir o amadurecimento de Ostwald, cremagem e sedimentação (WANG et al., 2009). Foi observado assim que todas as formulações utilizadas se provaram cineticamente estáveis durante o período analisado.

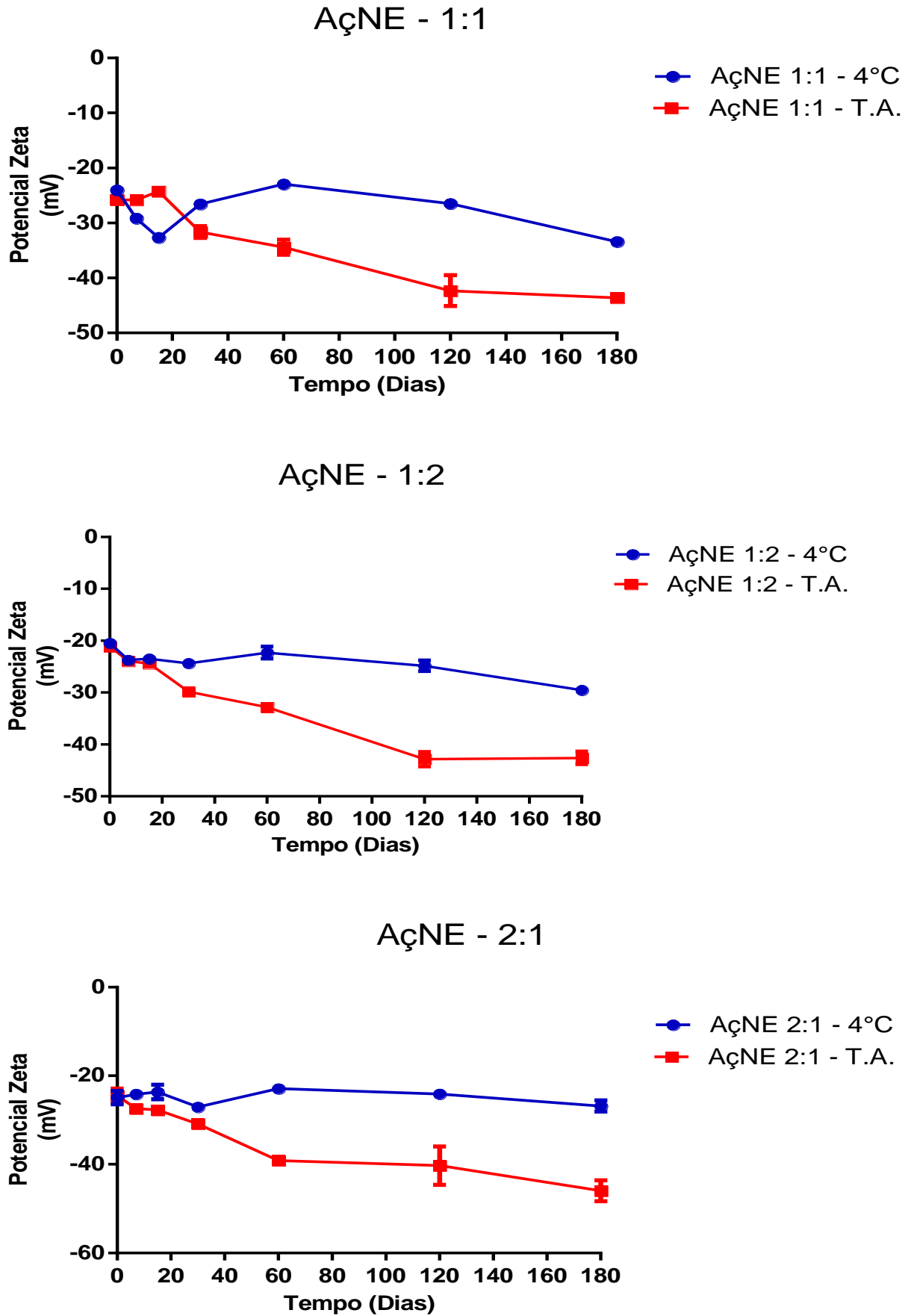


Figura 17. Gráfico comparativo entre o potencial zeta das diferentes formulações de AçNE armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 180 dias.

A temperatura de armazenamento demonstrou influência direta na variação do potencial zeta com o passar dos dias (Fig. 17), assim, foi observado que as formulações armazenadas a 4 °C apresentaram menor variação do potencial zeta. Esse fenômeno talvez ocorra, pois, a temperatura ambiente pode estar aumentando a energia cinética do sistema nanométrico, assim reduzindo seu potencial zeta, podendo gerar mudanças na estrutura cristalina do lipídeo (FREITAS; MÜLLER, 1998).

A AÇNE 2:1 armazenada a 4 °C foi a formulação que demonstrou uma menor variação no potencial zeta após 180 dias. Essa variação no potencial Zeta não influenciou nos diâmetros e nos índices de polidispersão das AÇNEs formuladas, quando comparamos os gráficos da figura 16 com os gráficos da figura 17.

Após estudos com o intuito de melhorar a caracterização das formulações, foi iniciado a mensuração do potencial Hidrogeniônico (pH) das nanoemulsões, pois mudanças no pH podem ser indicadores de reações químicas que podem comprometer a qualidade da formulação (BERNARDI et al., 2011), mas apenas a partir do dia 30 da qual a formulação foi feita, e assim a medida foi realizada apenas quatro vezes em um intervalo de tempo para determinar se haveria ou não diferença no pH, obtendo assim os resultados da Figura 18.

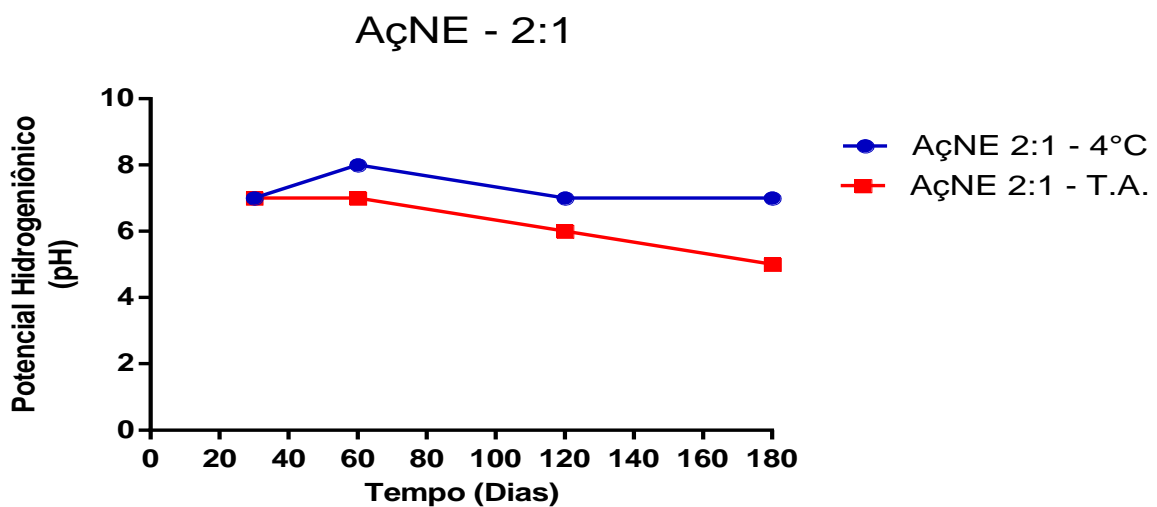
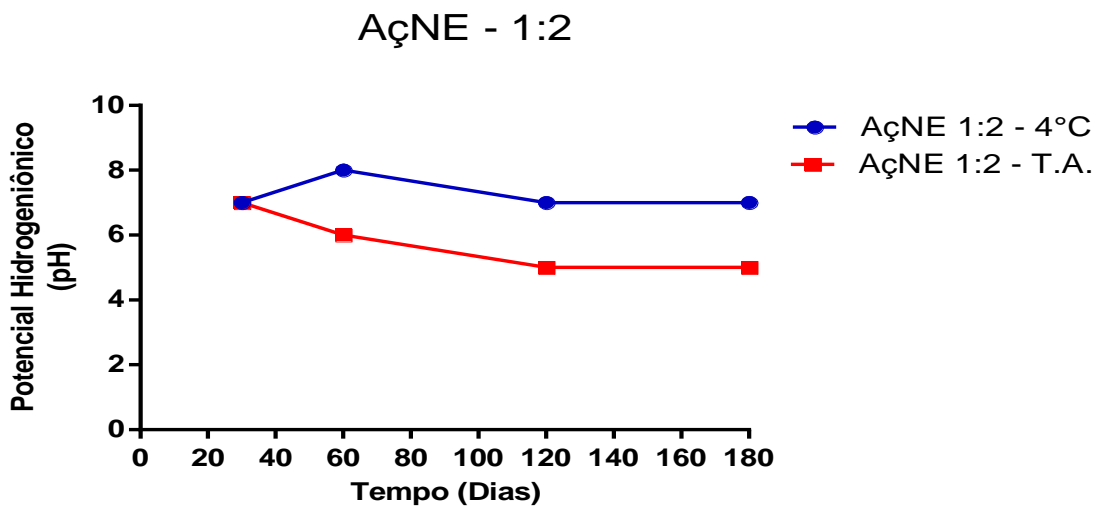
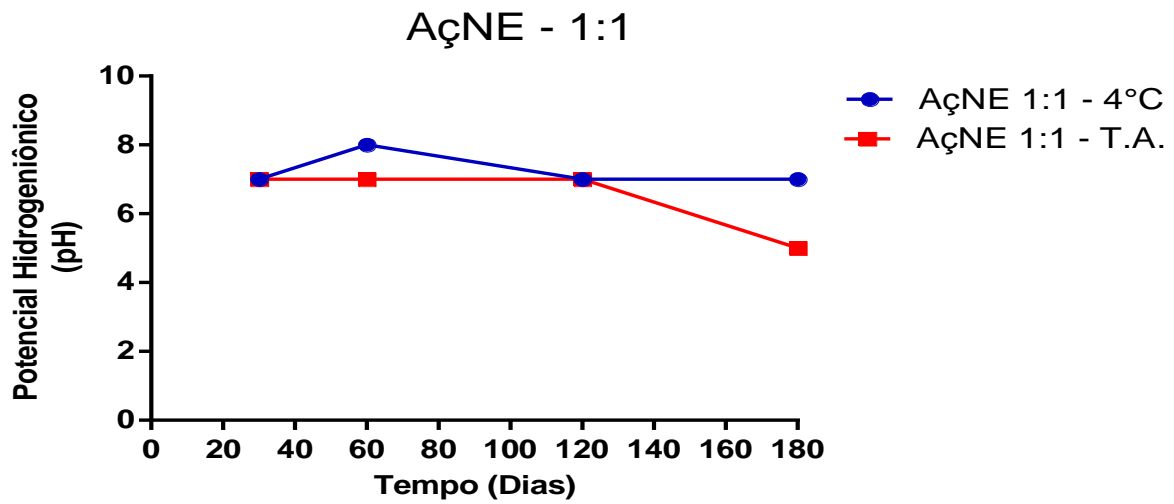


Figura 18. Gráfico comparativo do potencial hidrogeniônico das diferentes formulações de AçNE armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz após 30, 60, 120 e 180 dias após sua formulação.

Com o passar dos dias as amostras armazenadas em temperatura ambiente apresentaram redução do pH (Fig.18), o que indica que a temperatura de 4 °C ajuda na estabilidade do pH das nanoemulsões não permitindo que elas se tornem ácidas. Nanoemulsões produzidas utilizando óleos vegetais podem apresentar uma queda no seu pH devido a quebra dos ácidos graxos, da qual a temperatura pode estar atuando desestabilizando a nanoemulsão por hidrólise (BERNARDI et al., 2011).

Observa-se que a AÇNE 1:2 T.A. foi a que demonstrou essa queda do pH mais rapidamente. Isso pode ser devido a maior quantidade de óleo de açaí presente nessa formulação, que por estar armazenado em T.A. acaba por oxidar mais rápido.

Essa acidificação do pH nas amostras em T.A. se correlacionam diretamente com a redução do potencial Zeta das mesmas, aonde as nanogotículas que apresentaram um pH mais ácido também apresentou uma maior redução do seu potencial zeta, em especial a AÇNE 1:2 T.A que demonstrou essa queda mais visualmente (Fig. 17).

A AÇNE 2:1 armazenada a 4 °C, mostrou ser a formulação com menor diâmetro hidrodinâmico com uma menor variação do potencial zeta, distribuição de diâmetros homogênea e com um pH neutro, demonstrando um grande potencial para as aplicações biológicas, assim foi a escolhida para a realização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e obtendo assim a imagem da figura 19.

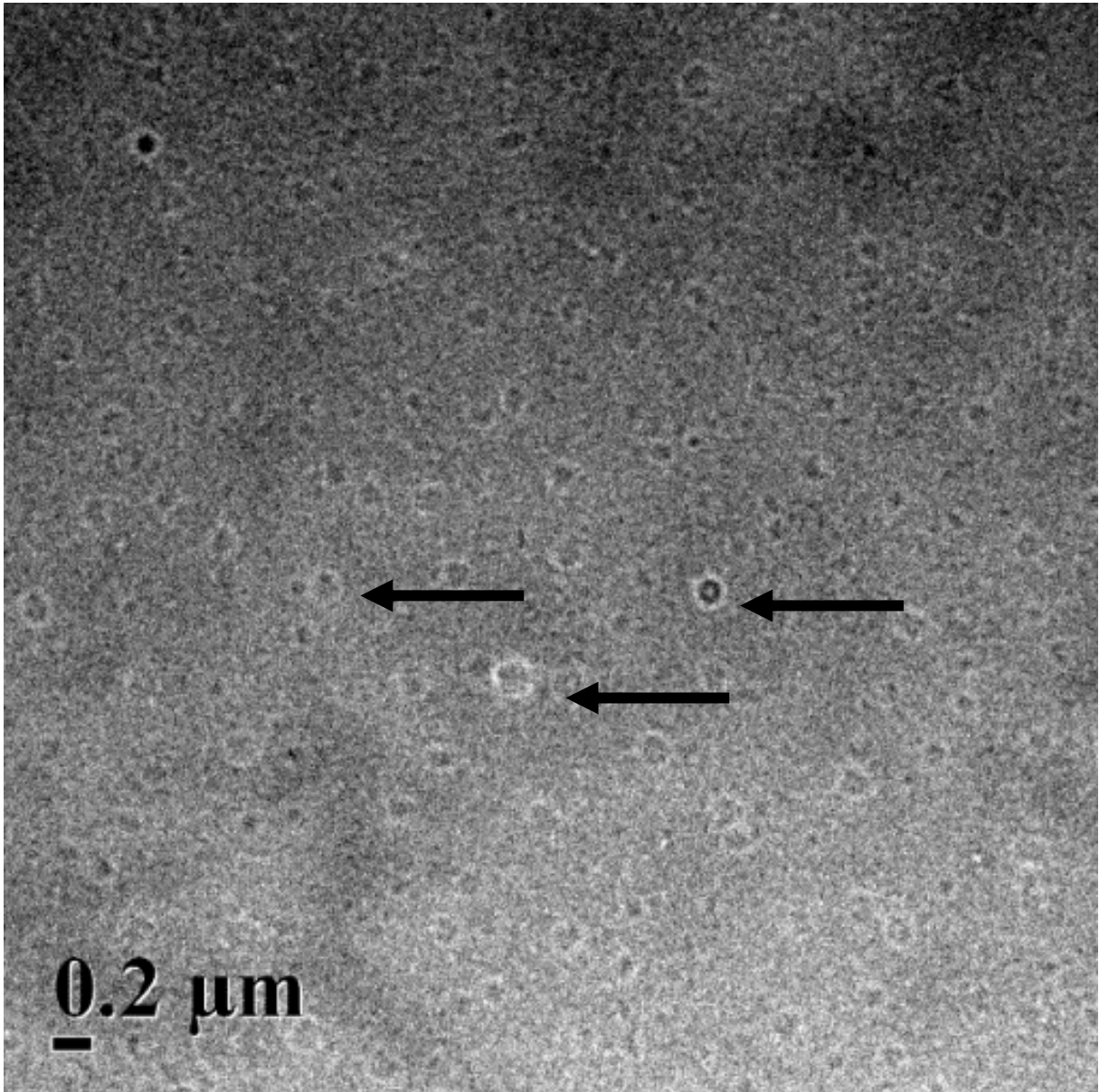


Figura 19. Avaliação do aspecto morfológico da AÇNE 2:1 armazenada a 4 °C observada por microscopia eletrônica de transmissão.

A micrografia realizada (Fig.19) apresentou nanoemulsões esféricas e menores que 0,2 μm , que corrobora com os resultados obtidos no DLS.

A concentração escolhida para dar continuidade ao trabalho foi de 2:1 pois obteve a menor média de diâmetro hidrodinâmico, 132 nm na temperatura ambiente e 129 nm à 4 °C, e apresentando uma maior quantidade de surfactante em sua formulação, o que leva a acreditar que em um modelo biológico, essa formulação possa ser mais resistente mantendo a característica de nanoemulsão por mais tempo e podendo se aproveitar do efeito de permeabilidade e retenção (EPR), assim como a biodisponibilidade.

5.1.3 CARACTERÍSTICAS DAS AÇNE APÓS MODIFICAÇÕES DE SUA SUPERFÍCIE

A superfície da nanoemulsão de açai foi modificada através da adição de CH, PEG e DOTAP na formulação da AÇNE, com o intuito de observar a influência das mesmas nas propriedades das nanogotículas, sua estabilidade e analisar sua ação em células tumorais.

Com base nos resultados obtidos, foi utilizado a proporção de 2:1 para as próximas etapas. E para facilitar a leitura, será chamada apenas de AÇNE.

A quitosana vem sendo utilizada no processo de síntese de nanopartículas devido a seu cátion que lhe confere uma maior eficiência na absorção pelas membranas negativas de células tumorais por meio de interação e atração eletrostática, além de promover o transporte paracelular pela regulação das junções oclusivas (CAMPOS; VARAS-GODOY; HAIDAR, 2017; CONG et al., 2017; DE MATTEIS et al., 2016). O PEG foi utilizado para recobrir a AÇNE por saber-se de seu potencial de impedir agregação e adsorção pelas proteínas séricas, por meio de repulsão estéricas e de hidratação, mantendo assim sua estabilidade coloidal (DE MATTEIS et al., 2016). A escolha de testar o lipídio catiônico DOTAP na formulação da AÇNE, foi devido o mesmo proporcionar a adição de múltiplas cargas catiônicas na NE, e interagir com moléculas polianiónicas formando lipoplexos (YUN; BAE; AHN, 2016).

Ao recobrir as nanogotículas com polietilenoglicol (PEG), quitosana (CH) ou DOTAP e as armazenando em diferentes condições de temperatura, foram observadas variações nos parâmetros físico-químicos das nanogotículas (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização por DLS das AÇNE livres ou recobertas com polietilenoglicol (PEG), quitosana (CH) ou DOTAP armazenadas em temperatura ambiente ou a 4 °C por 24 horas.

Nanoemulsão	Diâmetro		Potencial	
	hidrodinâmico (nm)	Pdl	Zeta (mV)	pH
AÇNE – 4° C	140,0 ± 2,2	0,229 ± 0,01	-17,6 ± 0,5	7
AÇNE – T.A.	136,7 ± 1,3	0,22 ± 0,01	-18,9 ± 1,4	7
AÇNE CH – 4° C	96,3 ± 0,4	0,203 ± 0,01	14,5 ± 2,0	4
AÇNE CH – T.A.	95,0 ± 0,2	0,202 ± 0,34	14,6 ± 0,7	4
AÇNE PEG – 4° C	89,6 ± 0,5	0,220 ± 0,007	-13,9 ± 0,3	7
AÇNE PEG – T.A.	99,5 ± 1,2	0,243 ± 0,007	-17,6 ± 0,4	7
AÇNE DOTAP – 4° C	132 ± 0,7	0,215 ± 0,008	21,9 ± 0,6	7
AÇNE DOTAP – T.A.	132,4 ± 0,4	0,217 ± 0,007	17,3 ± 1,0	7

*Pdl: Índice de Polidispersão.

No presente estudo, Todas as AÇNEs apresentaram um diâmetro hidrodinâmico característico de nanoemulsão, após sua formulação (entre 20 nm e 200 nm) (WANG et al., 2009). Foi possível observar que o PEG e a CH tiveram grande influência na redução do diâmetro da AÇNE. Sendo os diâmetros obtidos com o recobrimento com CH semelhante a outros estudos que utilizaram nanoemulsões recobertas com CH (DE MATTEIS et al., 2016). E as AÇNE com PEG também apresentou resultado similares com estudo que utilizou o PEG com revestimento de nanopartículas (MEKKAWY et al., 2017). A AÇNE livre demonstrou diâmetros semelhantes a outras nanoemulsões com óleo de açaí encontrados na literatura (MONGE-FUENTES et al., 2017; RAMOS, 2013). A AÇNE CH 4 °C e T.A., e a AÇNE DOTAP 4 °C e T.A., apresentaram um potencial Zeta positivo devido as cargas catiônicas presentes na CH e no DOTAP, corroborando com estudos feitos utilizando CH (DE MATTEIS et al., 2016) e DOTAP (YUN; BAE; AHN, 2016). Essa mudança do potencial zeta é uma indicação de que as moléculas catiônicas da CH e do DOTAP foram adsorvidas na superfície das nanogotículas. A AÇNE (4 °C e T.A.) e a AÇNE PEG (4 °C e T.A.) demonstraram um potencial Zeta negativo devido ao uso da água como dispersante. Um potencial Zeta acima de +30 mV e menor que -30 mV é o considerado ideal para se ter uma nanoemulsão estável, assim podemos considerar que todas as AÇNEs apresentam uma moderada estabilidade coloidal (FREITAS; MÜLLER, 1998). Porém, existem estudos que relatam que nanopartículas com

potencial Zeta neutro ou inferior a 30 mV também podem ser manter estáveis por vários meses (FREITAS; MÜLLER, 1998; OMBREDANDE, 2016).

5.1.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS AÇNES APÓS PERÍODO DE ARMAZENAMENTO.

Após formular as nanoemulsões de óleo de açaí com diferentes coberturas de superfície, foi observada sua estabilidade por 120 dias ao abrigo da luz em temperatura ambiente e a 4 °C, e avaliadas seu diâmetro hidrodinâmico, Pdl, potencial Zeta e pH (Figuras 20, 21, 22 e 23).

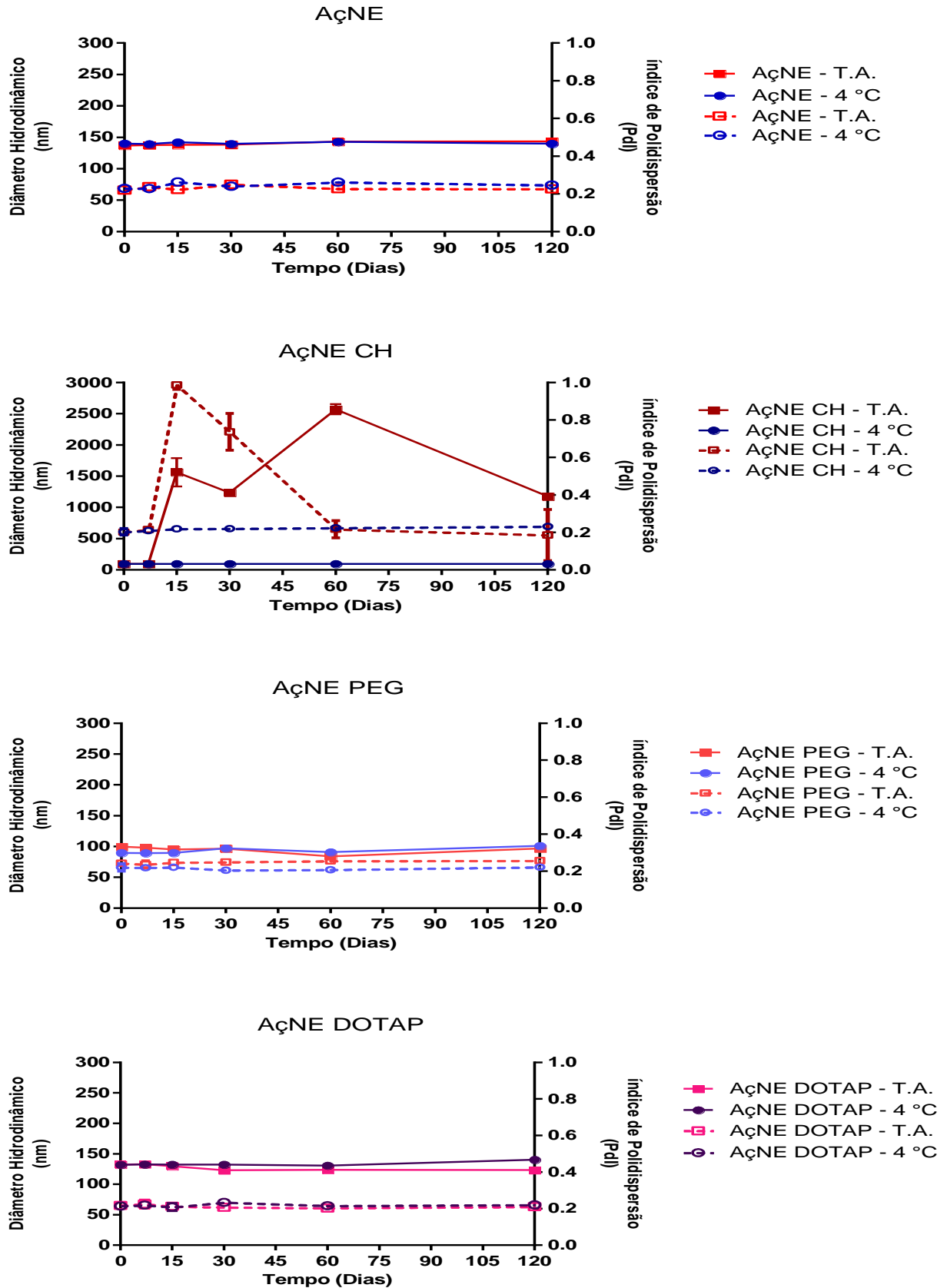


Figura 20. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontinua, da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 120 dias.

Após 120 dias de avaliações, foi possível observar uma grande variação no diâmetro hidrodinâmico da AÇNE CH – T.A. com o passar dos dias em comparação as outras formulações (Fig. 20). Percebe-se que a AÇNE PEG armazenada a 4 °C apresenta o menor diâmetro hidrodinâmico dentre todas. Observa-se também uma grande variação na polidispersão da AÇNE CH – T.A. a partir do décimo quinto dia de avaliação, sendo que as outras formulações conseguem manter o Pdl sem grandes variações.

As nanoemulsões livres, PEG, DOTAP e CH 4 °C apresentaram uma média de Pdl entre 0,213 e 0,248 (Fig. 20), indicando um padrão de monodispersão, pois, um Pdl com o valor acima de 0,5 demonstra uma ampla distribuição de moléculas de tamanhos diferentes, o que pode resultar na agregação das partículas (NAYAK et al., 2015).

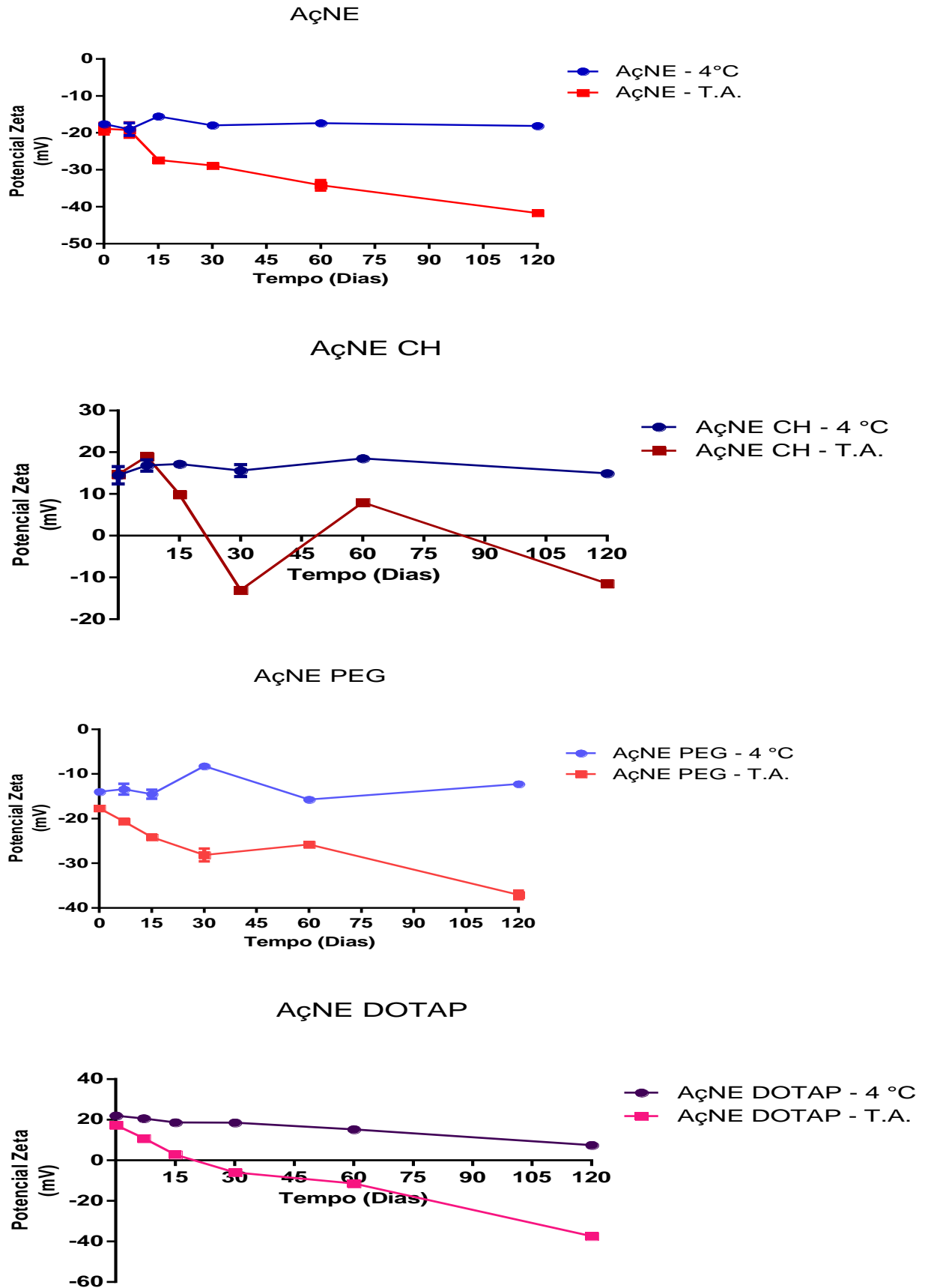


Figura 21. Gráfico comparativo do potencial Zeta da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 120 dias.

É possível observar que a temperatura influencia diretamente nos valores do potencial zeta das formulações recobertas com DOTAP (Fig. 21), pois com o passar do tempo, mesmo quando resfriada sua carga diminui exponencialmente, sendo que a AÇNE DOTAP T.A. ultrapassa o ponto isoelétrico após 30 dias de formulação. Assim como a AÇNE DOTAP T.A., a AÇNE CH T.A. também ultrapassa o ponto isoelétrico, porém não ocorre grande variação no diâmetro e no índice de polidispersão da AÇNE DOTAP T.A.. Isso pode ser resultado da presença dos cátions presentes nas formulações, que em temperatura ambiente, tendem a liberar seus cátions na fase dispersante assim diminuindo o potencial zeta das nanogotículas. Os resultados da avaliação do potencial zeta corroboram diretamente com os resultados encontrados na avaliação do diâmetro hidrodinâmico e do Pdl das AÇNE CH T.A., aonde pode se observar uma grande instabilidade com uma grande variação de diâmetros e polidispersão (Fig. 20).

As nanoemulsões armazenada a 4 °C se mostraram mais estáveis durante o período de tempo avaliado, dando destaque para a AÇNE 4 °C, que apresentou potencial zeta estável e mais próximo de - 30 mV, demonstrando assim a estabilidade coloidal da formulação.

Com os resultados obtidos e apresentados nas figura 20 e 21, foi possível observar novamente a importância da temperatura de armazenamento das nanoemulsões, principalmente nas formulações que utilizam CH, não só pelo potencial Zeta, mas também pelo seu diâmetro hidrodinâmico e Pdl, pois por possuir ácido acético em sua composição, quando armazenada em temperatura ambiente o mesmo se volatiliza, desestabilizando as partículas e fazendo com que as mesmas passem pelo processo denominado Amadurecimento de Ostwald, alterando todas as características da nanoemulsão (FORTUNA, 2010). Excluindo-se as AÇNE CH T.A., todas mantiveram a estabilidade sem grandes variações pelo período de 120 dias.

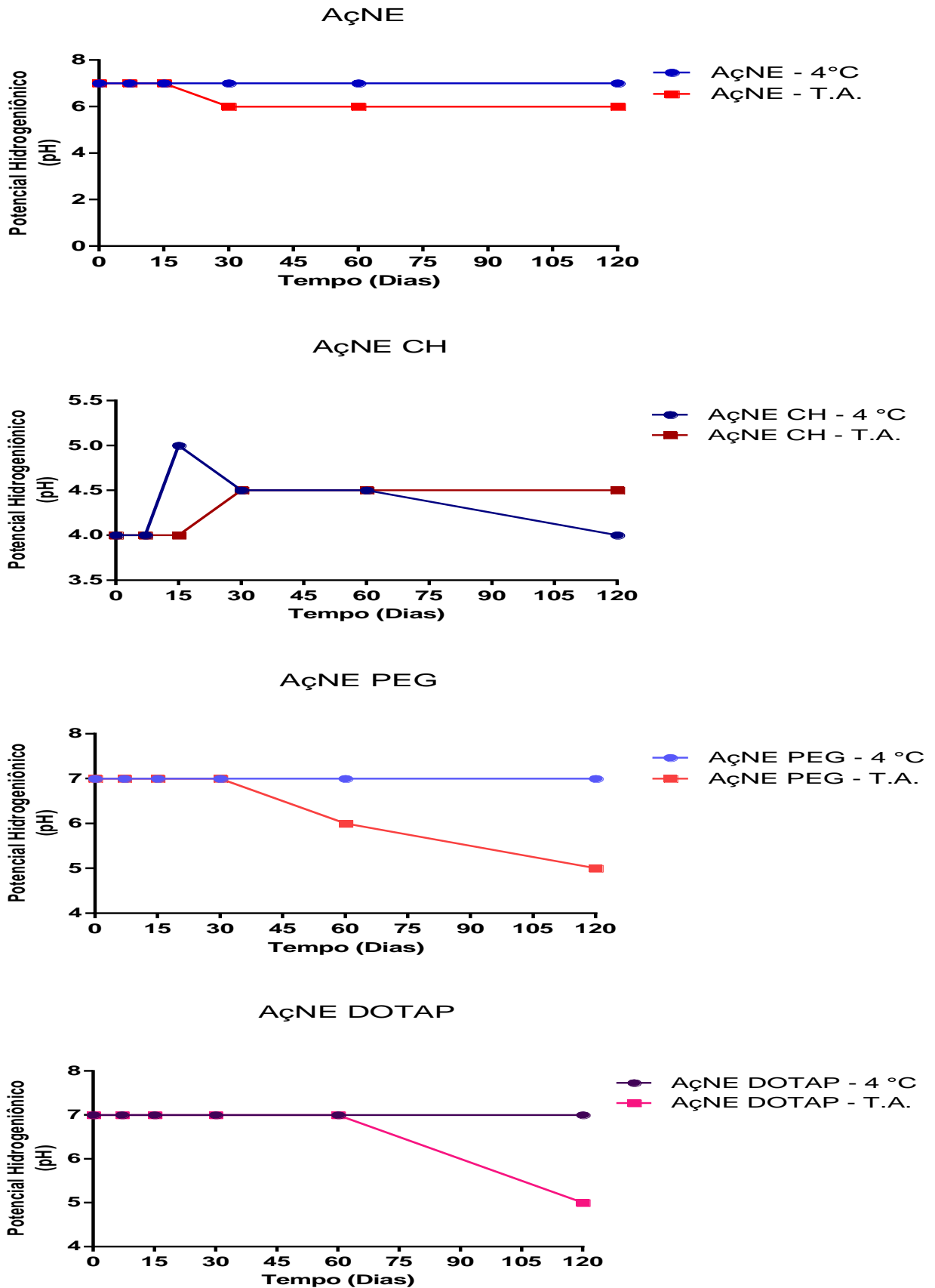


Figura 22. Gráfico comparativo do potencial Hidrogeniônico da formulação de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) armazenadas em temperatura ambiente e a 4 °C em abrigo de luz por 120 dias.

O pH das formulações (Fig. 22), exceto a que contém quitosana, é de 7 e com o tempo, as formulações em temperatura ambiente apresentam uma queda no pH. As formulações que contém quitosana apresentam pH ácido (4) devido ao ácido acético que é utilizado para a sua dissolução, dando assim essa característica ácida à nanoemulsão. Observa-se que as AÇNE CH T.A. tendem a aumentar seu pH com o passar do tempo, o que corrobora diretamente com os resultados encontrados nas figuras 20 e 21.

As formulações armazenadas a 4 °C mostraram que a temperatura se faz muito importante para a estabilidade do pH das nanogotículas.

5.1.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES APÓS DILUIÇÃO EM SÉRIE

Os resultados obtidos após a avaliação do Pdl, diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta das AÇNEs com diferentes coberturas de superfície, após diluição em série, encontram-se nas figuras 23 e 24 respectivamente.

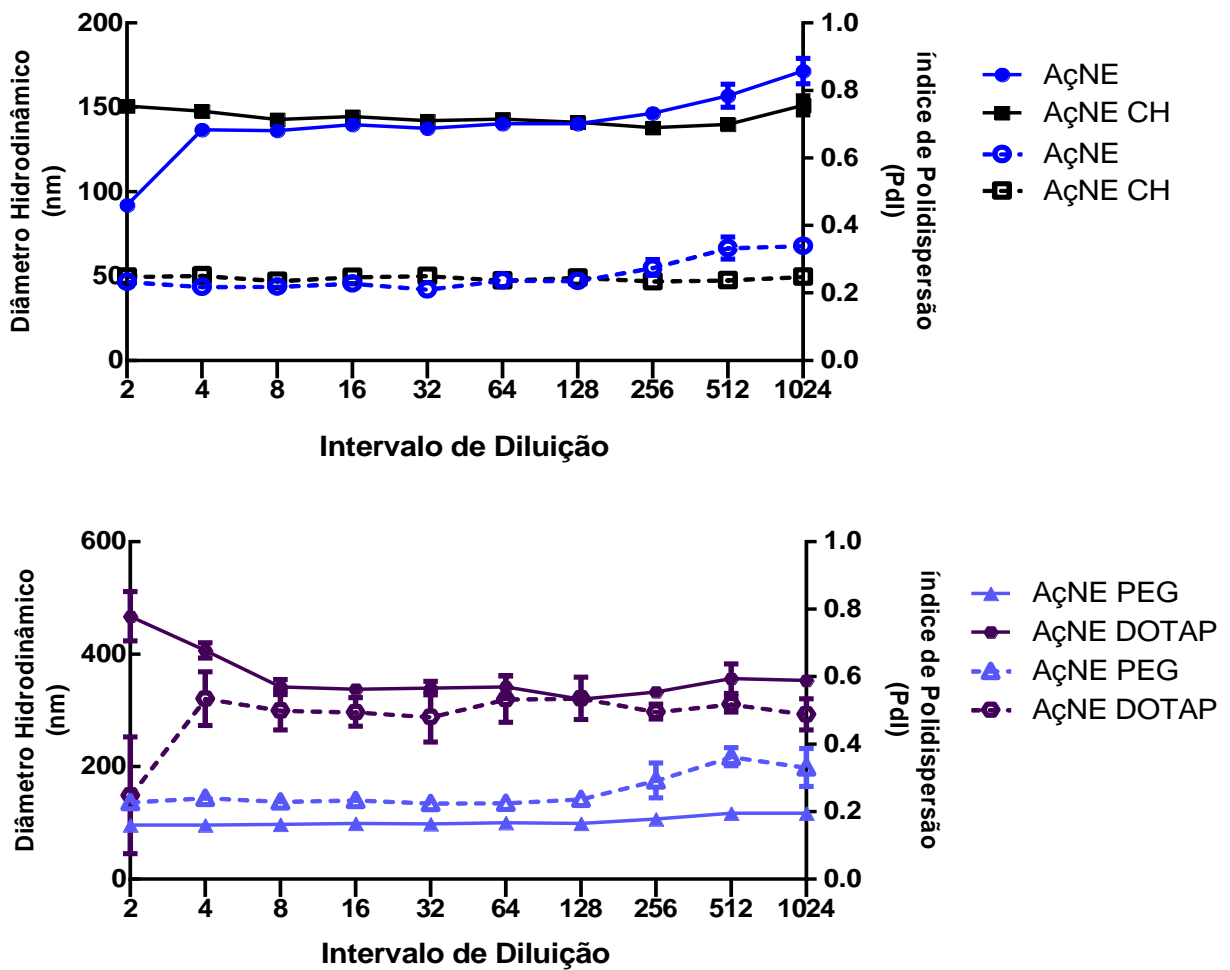


Figura 23. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontinua, da formulação de AçNE (nanoemulsão de açai), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) após diluição seriada.

A avaliação da estabilidade das AçNEs após diluição em série foi feita a partir do pressuposto que grande parte dos tratamentos são administrados por via endovenosa, assim os mesmos passam por diluições para serem aplicados, assim foi utilizado esse estudo para avaliar o comportamento das nanogotículas após diluição.

Os resultados presentes na figura 23 demonstram que as formulações AçNE CH e AçNE PEG apresentam menor mudança no diâmetro hidrodinâmico e PDI com o aumento da diluição. Entretanto, a AçNE apesar de demonstrar uma leve variação em seu diâmetro hidrodinâmico com a diluição seriada, a mesma continua apresentando diâmetro característico de nanoemulsão e com um PDI menor que 0,300 (NAYAK et al., 2015).

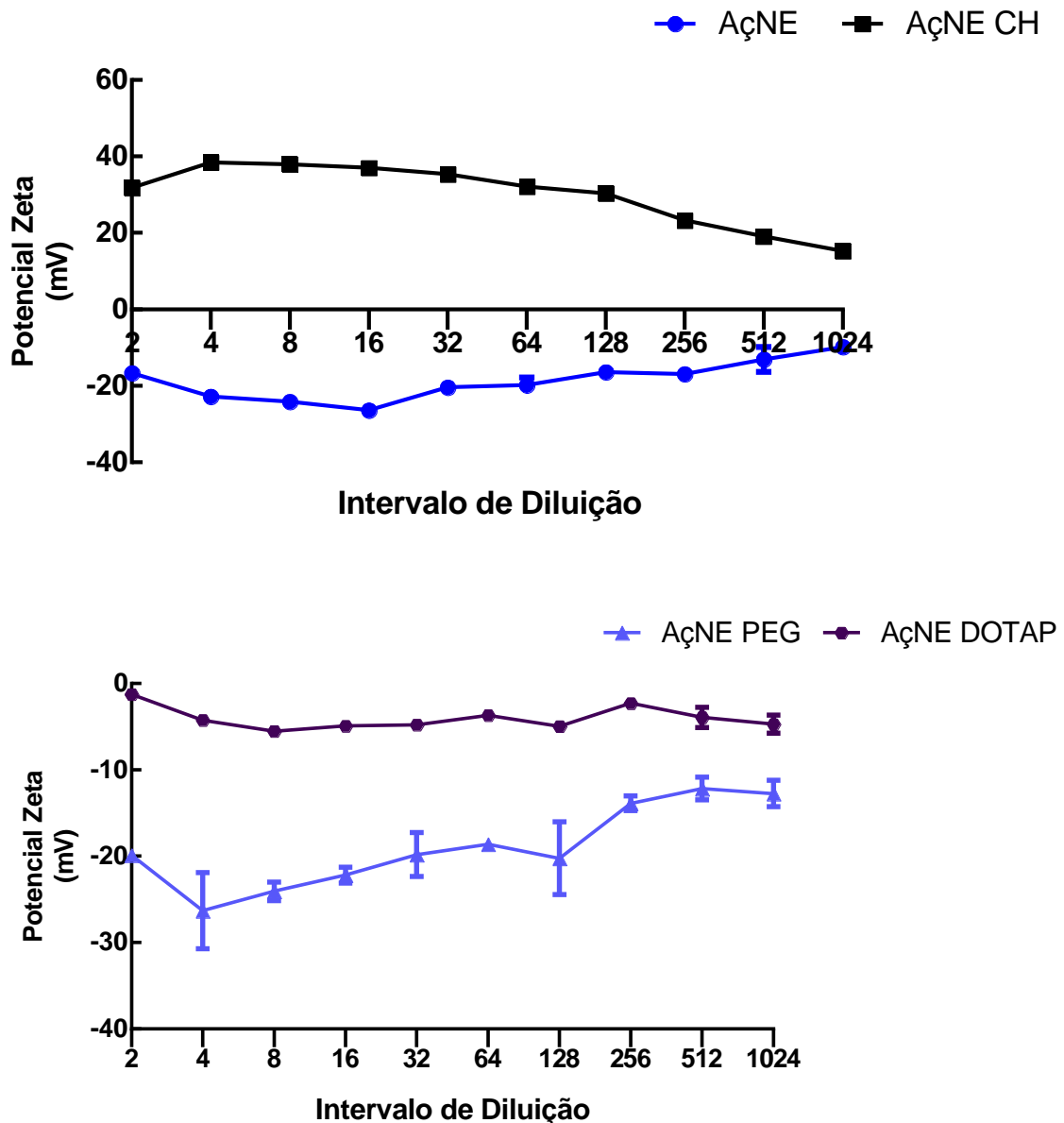


Figura 24. Gráfico comparativo do potencial zeta da formulação de AçNE (nanoemulsão de açai), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol) e AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) após diluição seriada.

O potencial Zeta da AçNE (Fig. 24) diminui progressivamente, ao contrário das AçNE CH e AçNE PEG, que o valor aumenta com a diluição. A AçNE DOTAP apresenta uma carga praticamente nula desde a primeira diluição. Esse evento pode se dar, provavelmente, em decorrência da proporção de DOTAP adicionado na formulação, que com o tempo equilibrou-se com a presença de cargas negativas presentes no diluente utilizado (água ultrapura).

Estas alterações observadas nos parâmetros após as diluições seriadas, excedendo-se da AçNE DOTAP, não alteram os padrões considerados ideais pelo estudo e não desqualificam as formulações como nanoemulsões (NAYAK et al.,

2015). Assim, AçNE, AçNE CH e AçNE PEG evidenciaram ser estáveis no teste de diluição seriada.

Assim no presente estudo, foram escolhidas duas formulações para dar sequência ao estudo de estabilidade após variação de pH, a AçNE e a AçNE CH armazenadas a 4 °C.

5.1.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES APÓS VARIAÇÃO DE PH

Os resultados do diâmetro hidrodinâmico, Pdl e potencial Zeta das nanoemulsões após as alterações no pH se encontram nas figuras 25 e 26. A avaliação foi feita utilizando apenas a AçNE e a AçNE CH.

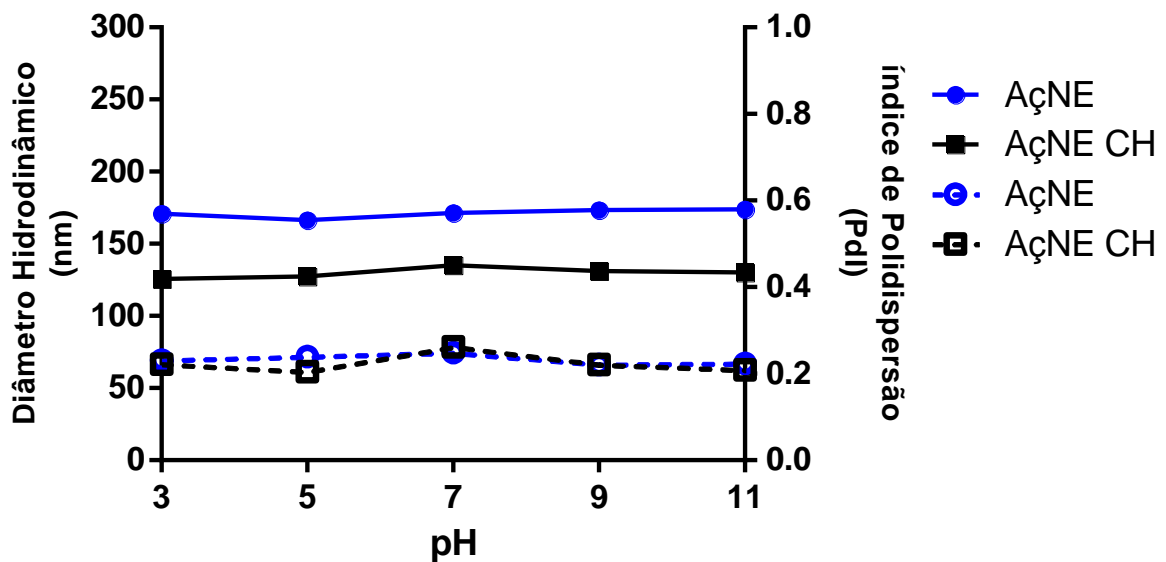


Figura 25. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontinua, da formulação de AçNE (nanoemulsão com óleo de açaí) e AçNE CH (nanoemulsão com quitosana) após variação de pH.

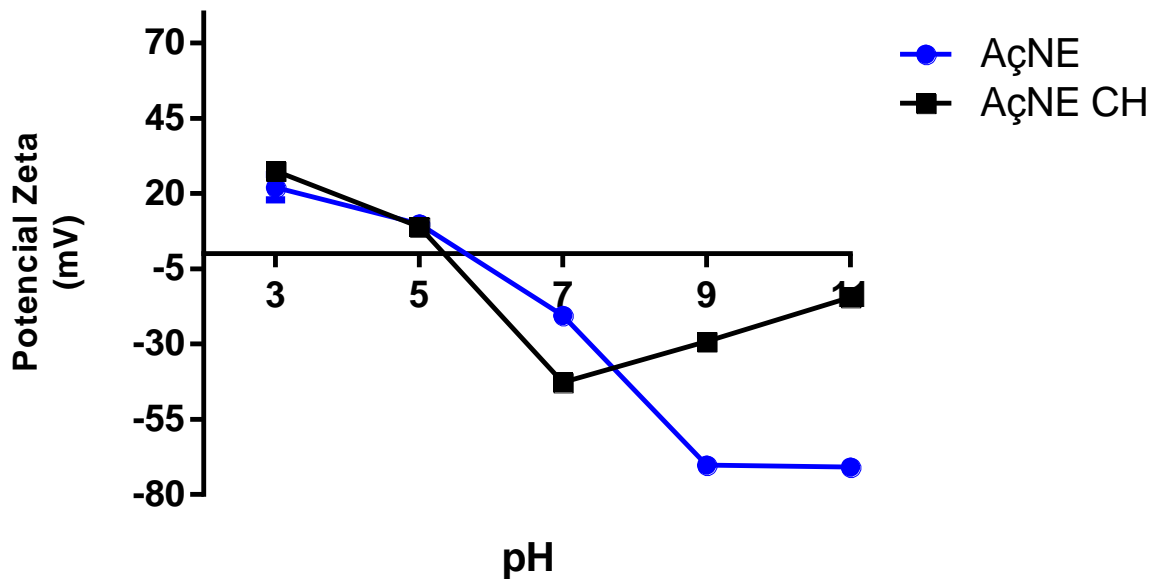


Figura 26. Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, linha contínua, e do índice de polidispersão, linha descontinua, da formulação de AçNE (nanoemulsão com óleo de açaí) e AçNE CH (nanoemulsão com quitosana) após variação de pH.

A avaliação da estabilidade das AçNE após variação de pH foi feita no intuito de observar se as nanogotículas iriam manter sua configuração em ambientes ácidos, em vista que o microambiente tumoral apresenta um pH ácido.

Analisando o diâmetro hidrodinâmico e o Pdl da AçNE e AçNE CH, em vista as alterações de pH feitas nas amostras (Fig. 25), observa-se que não ocorre variações significativas nessas características, ao contrário do potencial Zeta (Fig.26), que em ambas as amostras ocorreram uma inversão em suas cargas, o que é esperado, uma vez que o potencial Zeta varia de acordo com o pH do meio.

5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.2.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR MTT

5.2.2 TRATAMENTO COM A AÇNE LIVRE E RECOBERTAS EM CÉLULAS A431

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi primeiramente executado com o intuito de observar se as AçNEs apresentam efeito contra as células tumorais, melhor tempo para o tratamento, e qual a melhor concentração de tratamento (Fig. 27, 28, 29 e 30).

Foi utilizado as formulações de AçNEs a 4° C para os estudos *in vitro*, por apresentar maior estabilidade com o passar do tempo.

As células da linhagem A431 foram tratadas com AçNE, AçNE CH, AçNE PEG e AçNE DOTAP e seus respectivos controles nas concentrações de 180, 90 e 45 µg/mL nos tempos de 24 e 72 horas. Foi utilizado como controle água ultrapura (H₂O), representando 100% da viabilidade.

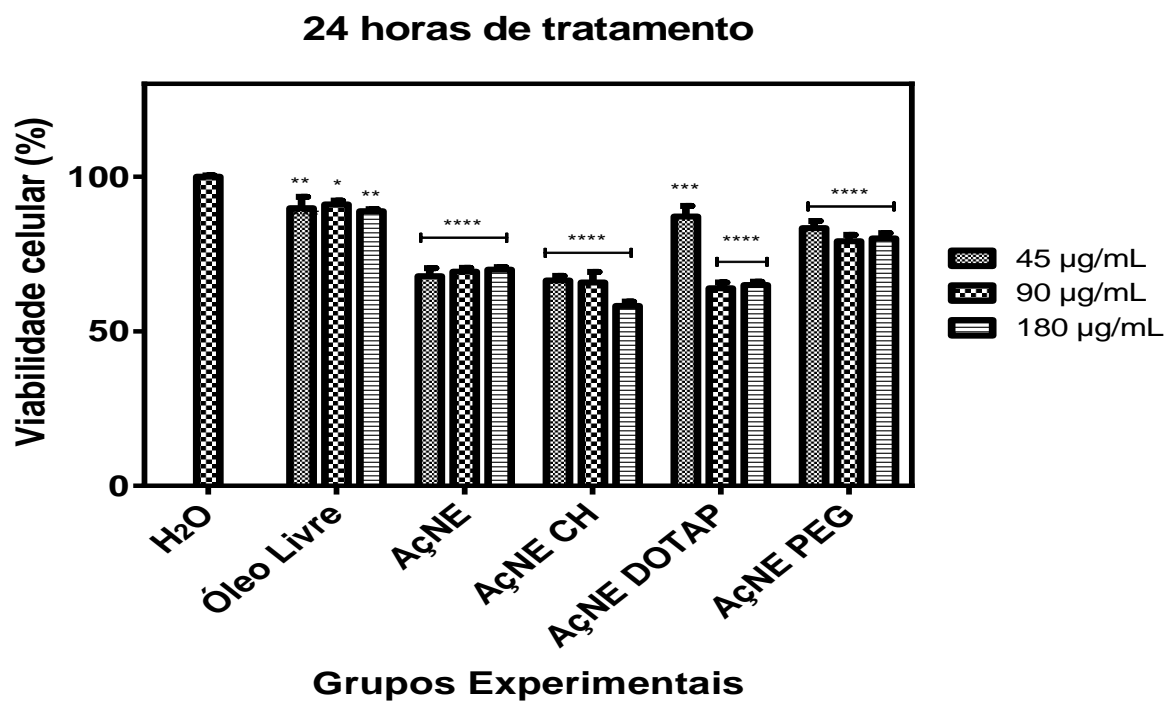


Figura 27. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol), AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) e de óleo livre, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)

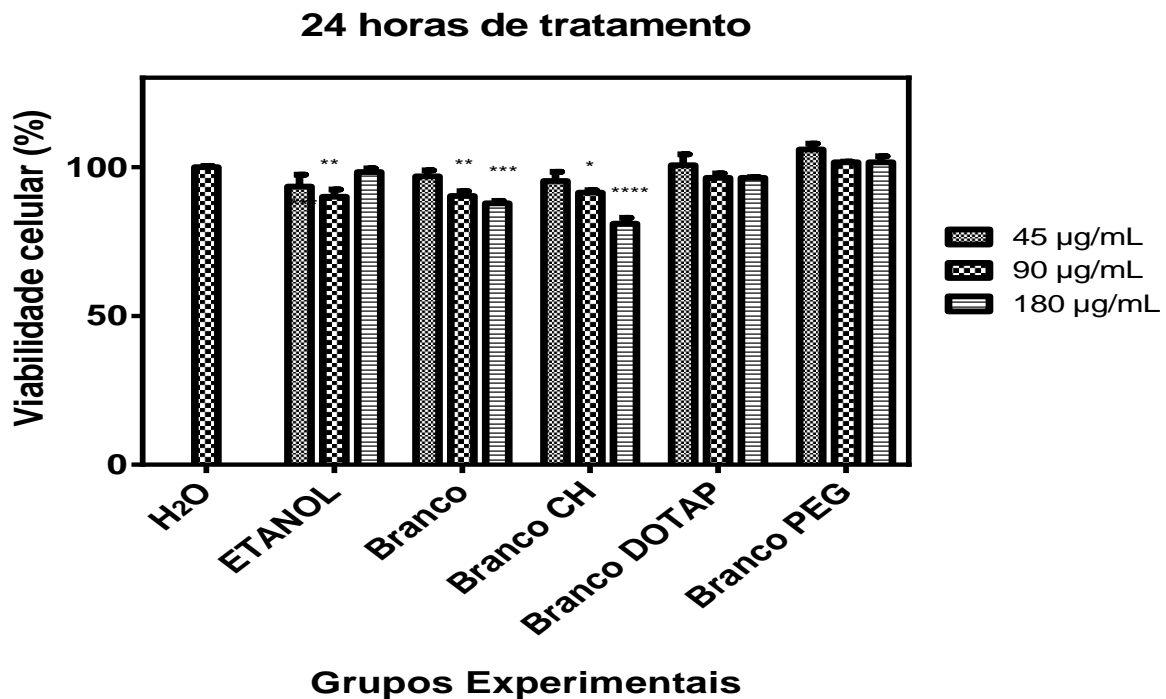


Figura 28. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de Branco (surfactante e água), Branco CH (surfactante e quitosana), Branco PEG (surfactante, água e PEG) e Branco DOTAP (surfactante, água e DOTAP), equivalentes às concentrações de óleo livre e de AçNEs, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)

Monge-Fuentes (2017) investigou a atividade antitumoral de uma nanoemulsão de óleo de açaí associada a TFD, em linhagem tumoral de câncer de pele melanoma murino demonstrando o potencial citotóxico das mesmas. Ramos (2013) avaliou a atividade antitumoral de uma nanoemulsão de óleo de açaí associada a TFD, em linhagem tumoral de câncer de pele não melanoma, observando o potencial citotóxico das mesmas.

Observa-se na figura 27 que todas as formulações de AçNE apresentaram redução significativa na viabilidade celular, quando comparado ao óleo de açaí livre. Foi possível observar que em 24 horas de tratamento (Fig. 27), tanto o óleo livre quanto as AçNEs apresentaram resultados significantes, principalmente quando comparado os resultados das AçNEs com o óleo livre, onde apresentou maior redução da viabilidade, sendo que a AçNE CH 180 µg/mL a que apresentou o melhor resultado, e a AçNEs em todas as concentrações junto da AçNE DOTAP 90 e 180 µg/mL, o segundo melhor resultado, quando avaliamos as 3 concentrações utilizadas. Apesar dos controles (Fig. 28) Branco, Branco CH e Etanol, apresentarem resultados

significativos quando comparados ao controle H₂O, sua redução na viabilidade celular não é maior que 20%.

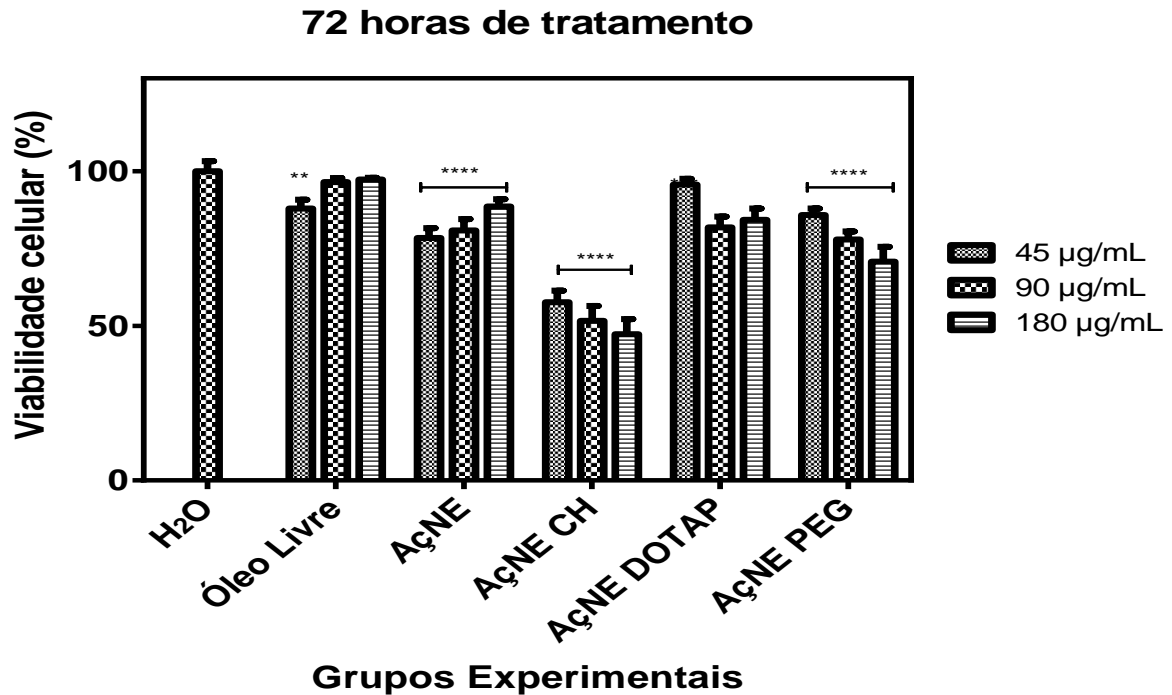


Figura 29. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de AçNE (nanoemulsão de açaí), AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), AçNE PEG (nanoemulsão com polietileno glicol), AçNE DOTAP (nanoemulsão com DOTAP) e de óleo livre, comparando-os com o controle água (H₂O) por 72 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)

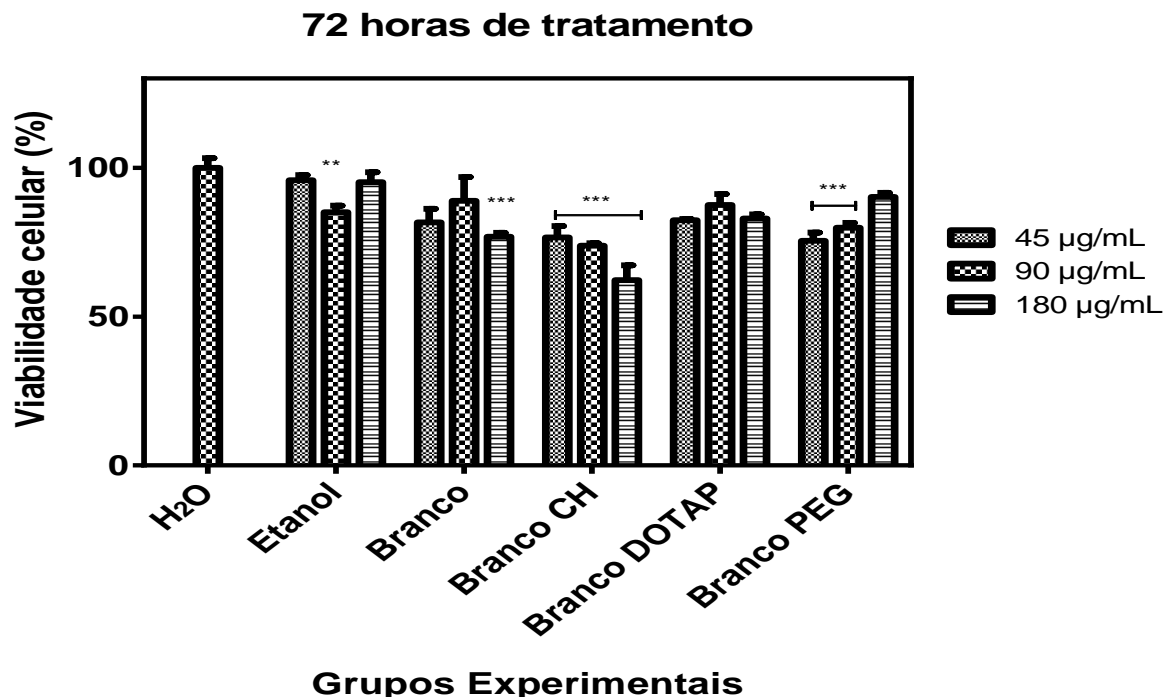


Figura 30. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações de Branco (surfactante e água), Branco CH (surfactante e quitosana), Branco PEG (surfactante, água e PEG) e Branco DOTAP (surfactante, água e DOTAP), equivalentes às concentrações de óleo livre e de AçNEs, comparando-os com o controle água (H₂O) por 72 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001)

Após 72 horas (Fig. 29) foi observado que as nanoemulsões não apresentam tempo dependência, pois todas as nanoemulsões apresentaram menor redução da viabilidade quando comparado com os resultados de 24 horas (Fig. 27), exceto a AÇNE CH. Os Brancos após 72 horas (Fig. 30) apresentaram resultados significativos quando comparados ao controle H₂O, porém sua redução na viabilidade celular não foi maior que 25%, excedendo-se do Branco CH.

Por não apresentar grande diferença nas doses utilizadas e não ser dose dependente, decidiu-se por utilizar apenas as AÇNE e a AÇNE CH na concentração de 45 µg/mL no tempo de 24 horas, para dar continuidade ao estudo e prosseguir para a associação com o ácido anacárdico, pois em um contexto geral, de todas as avaliações feitas, as mesmas foram as que melhor se qualificavam para o estudo.

Tratamento Com Ácido Anacárdico Em Células A431

5.2.2.1

Para os estudos com o AA, as células da linhagem A431 foram tratadas com as concentrações de 200, 175, 150, 125 e 100 µM e seus respectivos controles nos tempos de 24 e 72 horas (Fig. 31), afim de definir uma janela nas concentrações para utilizá-la em associação as AÇNEs. Foi utilizado como controle água ultrapura (H₂O), representando 100% da viabilidade.

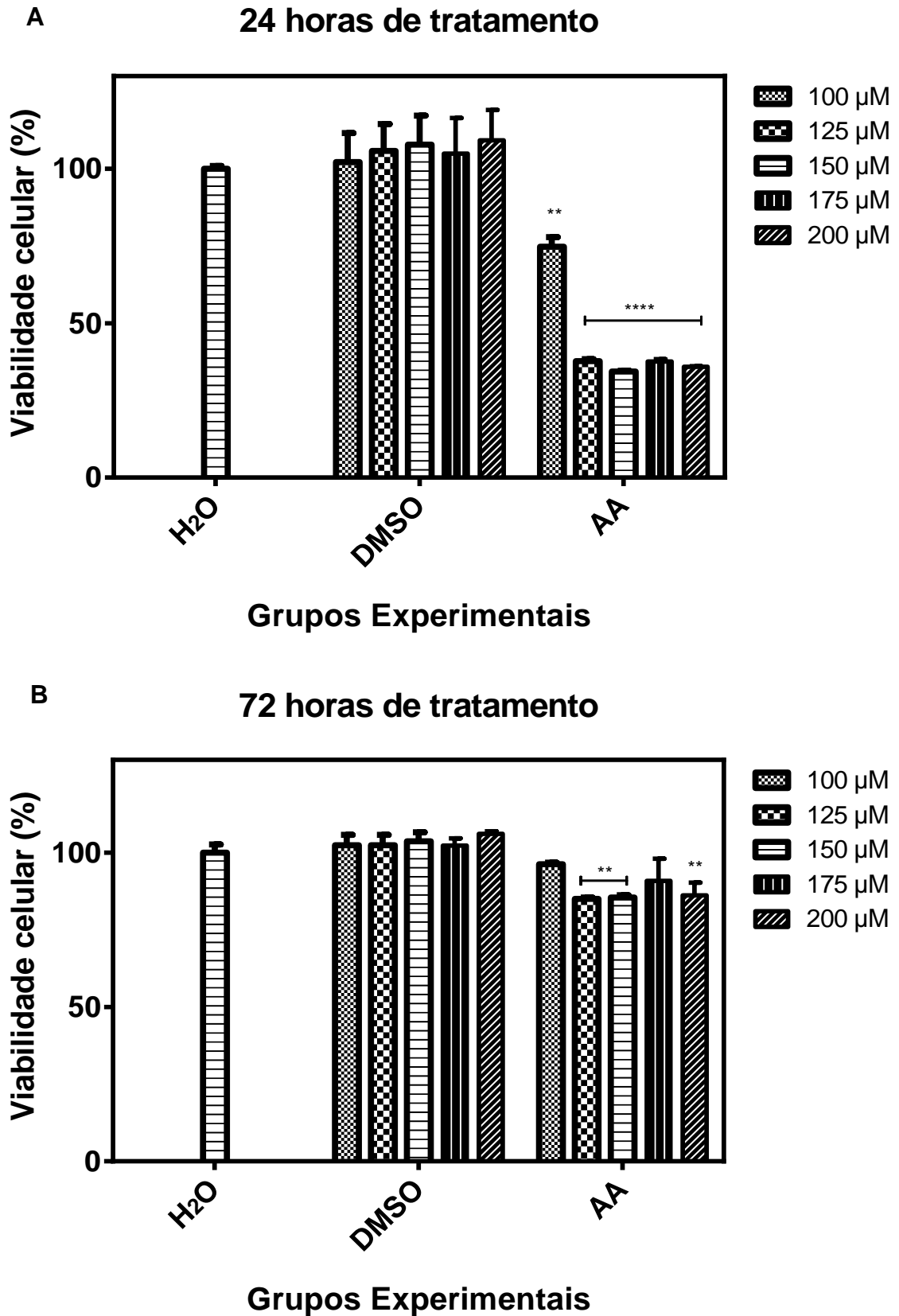


Figura 31. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações (200, 175, 150, 125 e 100 µM) de AA (ácido anacárdico), e seu controle DMSO equivalentes à concentração de AA, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas (A) e 72 horas (B). Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001).

Vários estudos descrevem o uso do AA no tratamento de tumores pulmonares, hipofisários, mamários, melanoma e próstata (AL-HAZZANI et al., 2012; KIM, 2013; LIPKA et al., 2014; SCHULTZ et al., 2010; SUKUMARI-RAMESH et al., 2011; TAN et al., 2012). Ainda não existem estudos com AA em células de câncer de pele não melanoma.

Após 24 horas (Fig.31 **A**) as concentrações de 200 a 125 μM de AA conseguiram reduzir a viabilidade celular em mais de 50%, porém após 72 horas de tratamento (Fig.31 **B**), ocorre um evento interessante, sua eficácia na redução da viabilidade em linhagem A431 diminui. Assim, foi decidido usar o intervalo entre 150 a 100 μM de AA, com o intuito de encontrar a dose exata para se obter o IC 50 do AA, e associar à concentração de 45 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de açaí, que corresponde ao controle de óleo livre das AçNEs 45 $\mu\text{g/mL}$, e observar se ocorre interação dos dois componentes ou não.

5.2.2.2 Tratamento Do Óleo De Açaí Associado Ao Ácido Anacárdico Em Células A431

Para os estudos com o óleo de açaí livre associado ao AA, as células da linhagem A431 foram tratadas com a concentração de 45, 90 e 180 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de açaí, concentrações de 150, 125 e 100 μM de AA, 45 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de açaí associado as concentrações de 150, 125 e 100 μM de AA e seus respectivos controles nos tempos de 24 e 72 horas (Fig. 32), afim de definir uma janela nas concentrações para utilizá-la em associação às AçNEs. Foi utilizado como controle água ultrapura (H_2O), representando 100% da viabilidade.

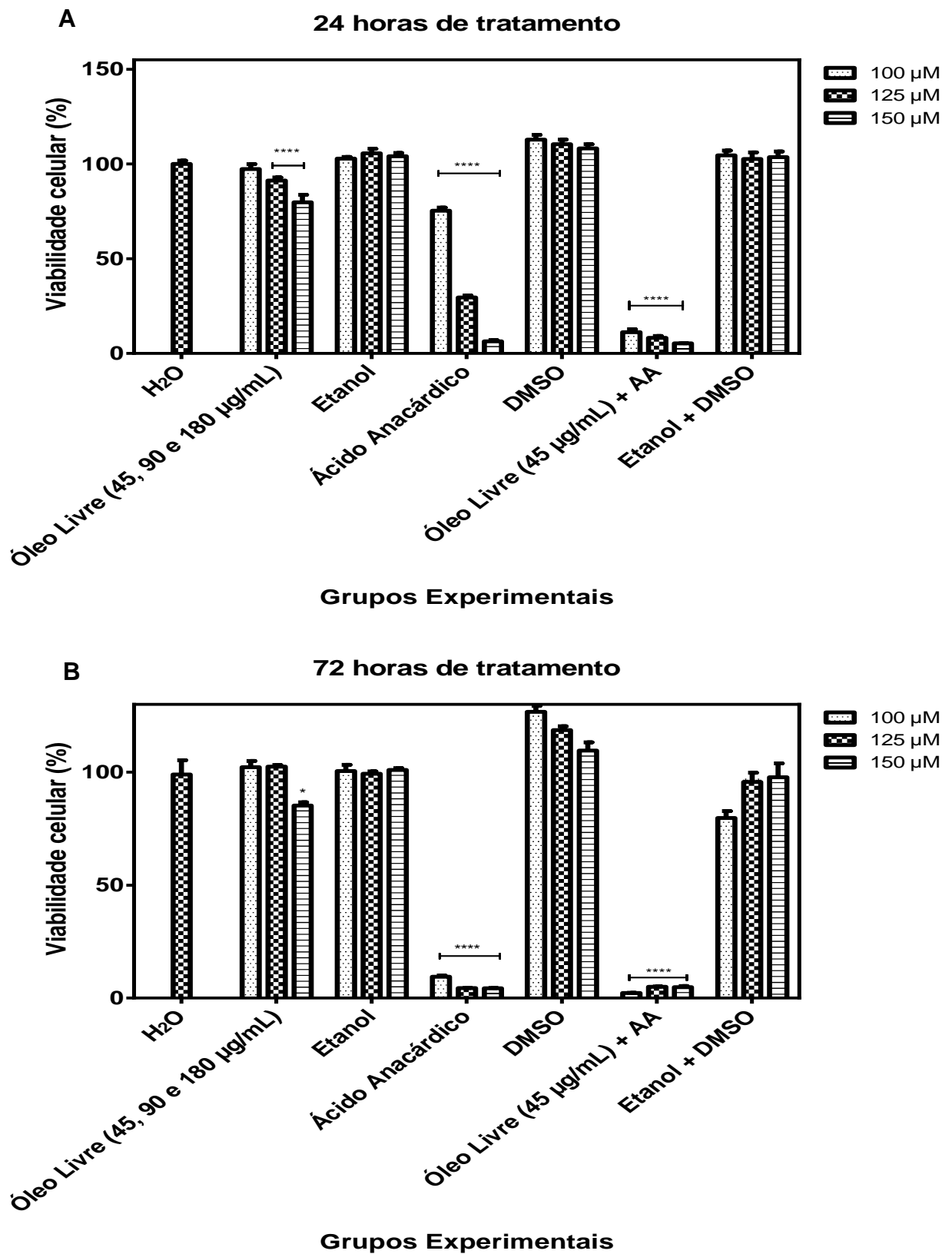


Figura 32. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a diferentes concentrações do óleo livre (45, 90 e 180 µg/mL, respectivamente), de ácido anacárdico (150, 125 e 100 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM) e seus controles equivalentes, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas (**A**) e 72 horas (**B**). Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: $P < 0,0001$).

No presente estudo foi observado que nos dois tempos utilizados a associação do óleo livre de açaí ao ácido anacárdico obtiveram resultados abaixo de 50% (Fig. 32 **A** e **B**). Consegue-se observar bem a interação das diferentes concentrações de ácido anacárdico com o óleo de açaí, mostrando que essa associação é dose dependente (Fig. 32 **A**) e sua ação tempo dependente (Fig. 33 **B**), além de demonstrar o potencial de sinergia entre essa associação, quando comparamos os resultados de 24 horas do Óleo livre 45 µg/mL (97%) e do ácido anacárdico 100 µM (75%) com o Óleo livre (45 µg/mL) + ácido anacárdico 100 µM (11%).

Pelo fato da concentração de 150 µM de ácido anacárdico reduzir muito a viabilidade das células (cerca de 90% em 24 horas) quando associado ao óleo de açaí, foi escolhido utilizar as concentrações de 125, 100 e 75 µM de AA para associar com as AÇNEs em um tempo de tratamento de apenas 24 horas, pensando-se que em volta de um tecido tumoral existem tecidos normais e saudáveis, então por essa combinação ser muito potente ela pode acabar por danificar não só os tecidos malignos, mas também os saudáveis.

5.2.2.3 Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células A431

5.2.2.3.1 Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Na Concentração De 45 µg/mL Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células A431.

Inicialmente as células da linhagem A431 foram tratadas com a concentração de 45 µg/mL do óleo de açaí, 45 µg/mL de AÇNE, 45 µg/mL de AÇNE CH, AA nas concentrações de 125, 100 e 75 µM, 45 µg/mL do óleo de açaí associado as concentrações de 125, 100 e 75 µM de AA, 45 µg/mL de AÇNE associado as concentrações de 125, 100 e 75 µM de AA, 45 µg/mL de AÇNE CH associado as concentrações de 125, 100 e 75 µM de AA e seus respectivos controles por um período de 24 horas (Fig. 33). Foi utilizado como controle água ultrapura (H₂O), representando 100% da viabilidade.

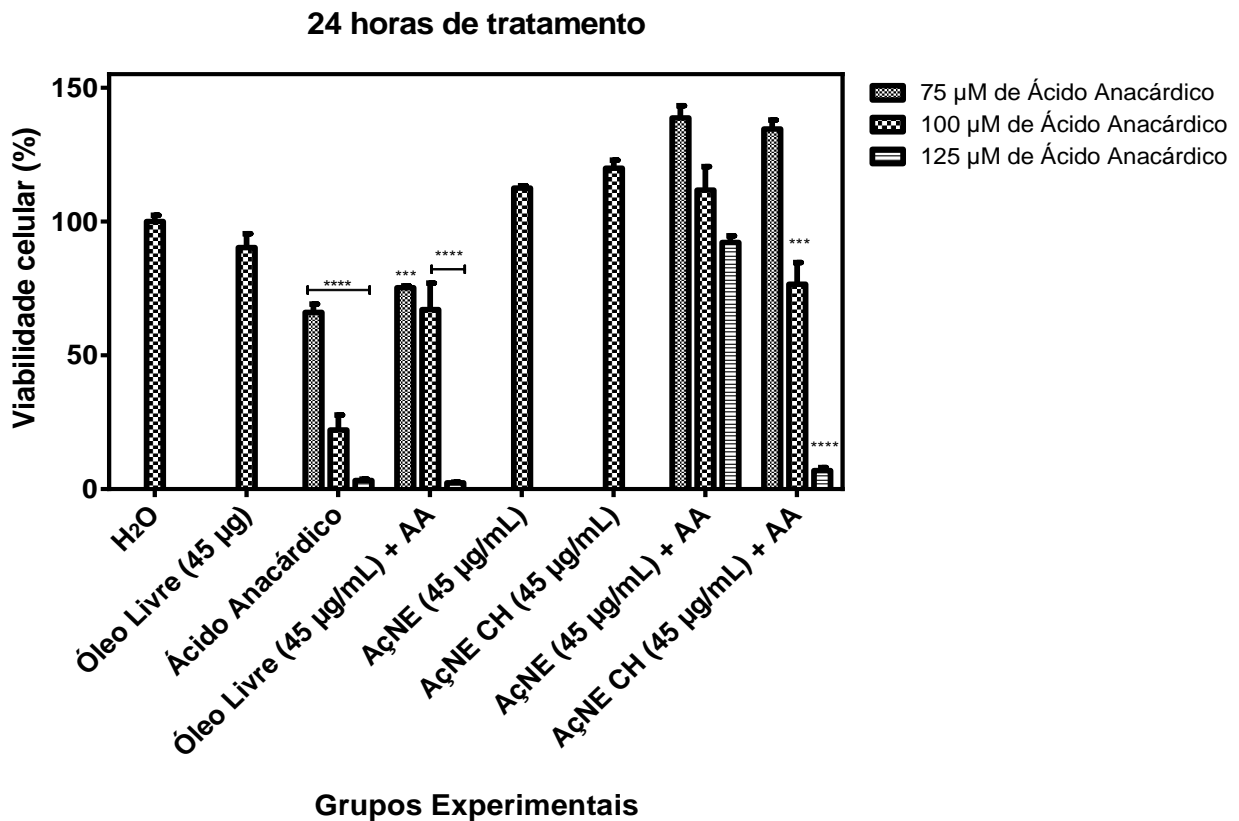


Figura 33. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a concentração de 45 μg/mL do óleo livre, 45 μg/mL de AçNE (nanoemulsão de açaí), 45 μg/mL de AçNE CH (nanoemulsão com quitosana), ácido anacárdico (AA) (125, 100 e 75 μM), óleo de açaí (45 μg/mL) associado ao AA (125, 100 e 75 μM), AçNE (45 μg/mL) associado ao AA (125, 100 e 75 μM) e AçNE CH (45 μg/mL) associado ao AA (125, 100 e 75 μM), comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001).

No presente trabalho, o ensaio de MTT utilizando como tratamento as AçNEs associadas ao AA, demonstraram um efeito pouco eficaz quando utilizamos a apenas a AçNE, e uma resposta um pouco mais significativa quando utilizamos a AçNE CH junto do AA (Fig. 33). Os tratamentos feitos com as AçNEs não obtiveram o resultado esperado. A partir desse fato, acredita-se que aumentando a concentração das AçNEs utilizadas, aumenta também a disponibilidade de nanogotículas de óleo de açaí para interagir com o AA. Partindo desse pressuposto, a concentração das AçNEs foi aumentada para a 90 μg/mL, e as concentrações do AA para 150, 125 e 100 μM, para que fosse possível encontrar uma dose ideal que conseguisse atingir o IC 50. Devido à falta de quitosana para a formulação de AçNE CH, essa formulação não foi mais utilizada.

5.2.2.3.2 Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Na Concentração De 90 µg/mL Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células A431

As células da linhagem A431 foram tratadas com a concentração de 90 µg/mL do óleo de açaí, 90 µg/mL de AçNE, AA nas concentrações de 150, 125 e 100 µM, 90 µg/mL do óleo de açaí associado as concentrações de 150, 125 e 100 µM de AA, 90 µg/mL de AçNE associado as concentrações de 150, 125 e 100 µM de AA e seus respectivos controles por um período de 24 horas (Fig. 34 e 35). Foi utilizado como controle água ultrapura (H₂O), representando 100% da viabilidade.

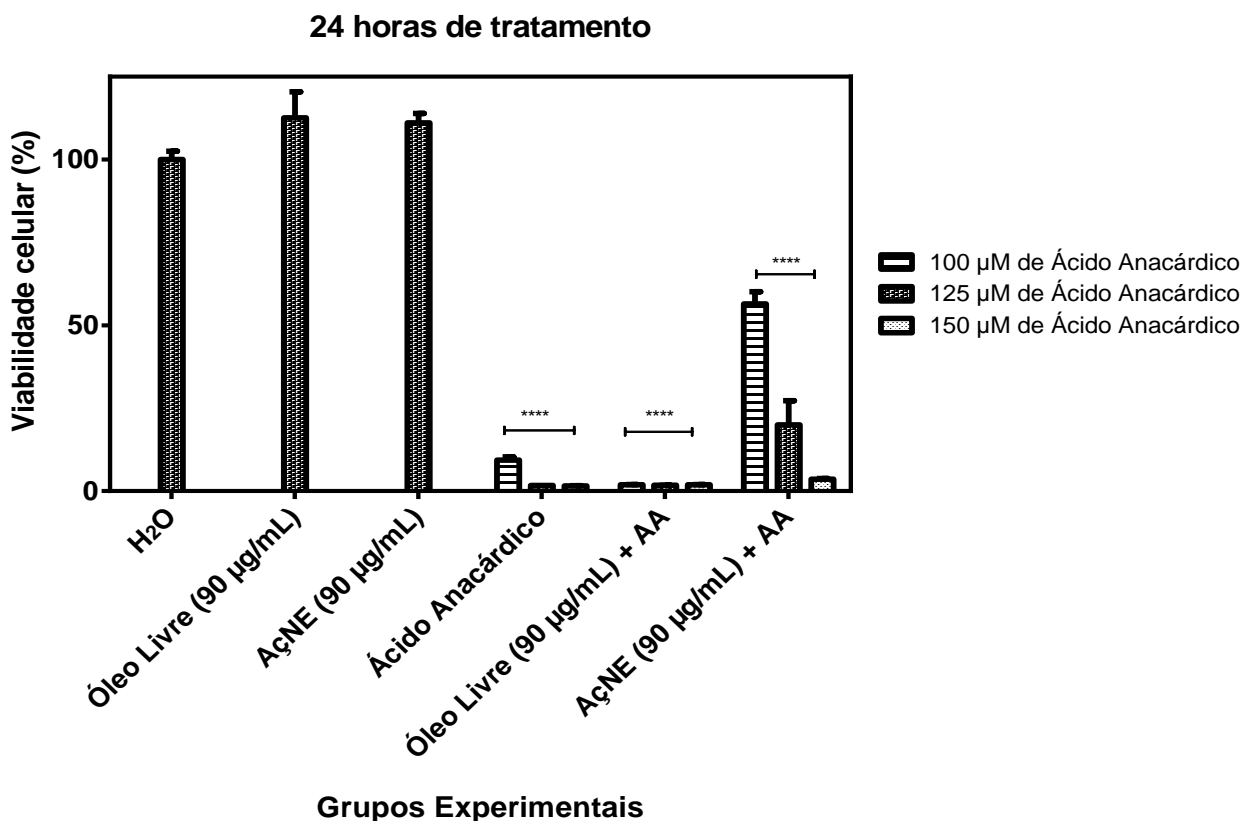


Figura 34. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a concentração de 90 µg/mL do óleo de açaí, 90 µg/mL de AçNE (nanoemulsão de açaí), ácido anacárdico (150, 125 e 100 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), AçNE (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001).

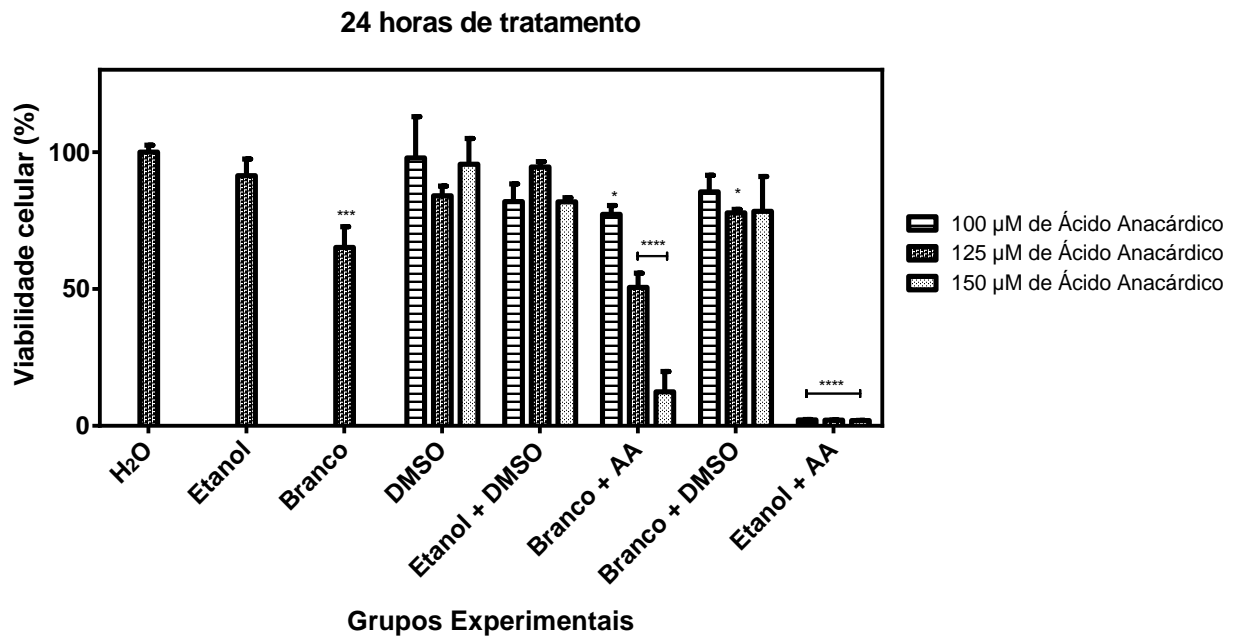


Figura 35. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de carcinoma epidermóide (A431) submetidas a concentração de Branco (surfactante e água) equivalente à concentração de AçNE, etanol equivalente à concentração óleo livre, DMSO equivalentes as concentrações de AA, Branco associado ao AA (150, 125 e 100 μM), etanol associado ao AA (150, 125 e 100 μM), e Branco associado ao DMSO com as concentrações equivalentes ao tratamento AçNE + AA, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001).

Na figura 34, foi possível observar que a presença da AçNE (ou Branco) interfere no efeito do AA, reduzindo sua eficácia. Mais estudos precisam ser feitos para investigar o porquê isso ocorre. Uma provável hipótese é de que o AA fique adsorvido na nanoemulsão e acaba não sendo internalizada pela célula em quantidades suficiente para induzir um efeito citotóxico. Assim seria importante tentar encapsular o AA para que se possa melhorar a entrega e o possível sinergismo com o óleo de açaí.

Enquanto que na figura 35, foi observado que os brancos associados ao AA apresentam efeito semelhante, reforçando a ideia de que o AA pode estar sendo adsorvido no surfactante de alguma forma, impedindo assim sua atuação.

Para descobrir se essas concentrações produzem algum dano ao tecido não tumoral, foi feito o ensaio de MTT utilizando a linhagem HaCaT de queratinócitos humanos normais com as mesmas concentrações usadas no tratamento com a linhagem A431.

5.2.2.3.3 Tratamento Das Nanoemulsões De Açaí Na Concentração De 90 µg/mL Associadas Ao Ácido Anacárdico Em Células HaCaT

As células da linhagem HaCaT foram tratadas com a concentração de 90 µg/mL do óleo de açaí, 90 µg/mL de AçNE, AA nas concentrações de 150, 125 e 100 µM, 90 µg/mL do óleo de açaí associado as concentrações de 150, 125 e 100 µM de AA, 90 µg/mL de AçNE associado as concentrações de 150, 125 e 100 µM de AA e seus respectivos controles por um período de 24 horas (Fig. 36 e 37). Foi utilizado como controle água ultrapura (H₂O), representando 100% da viabilidade.

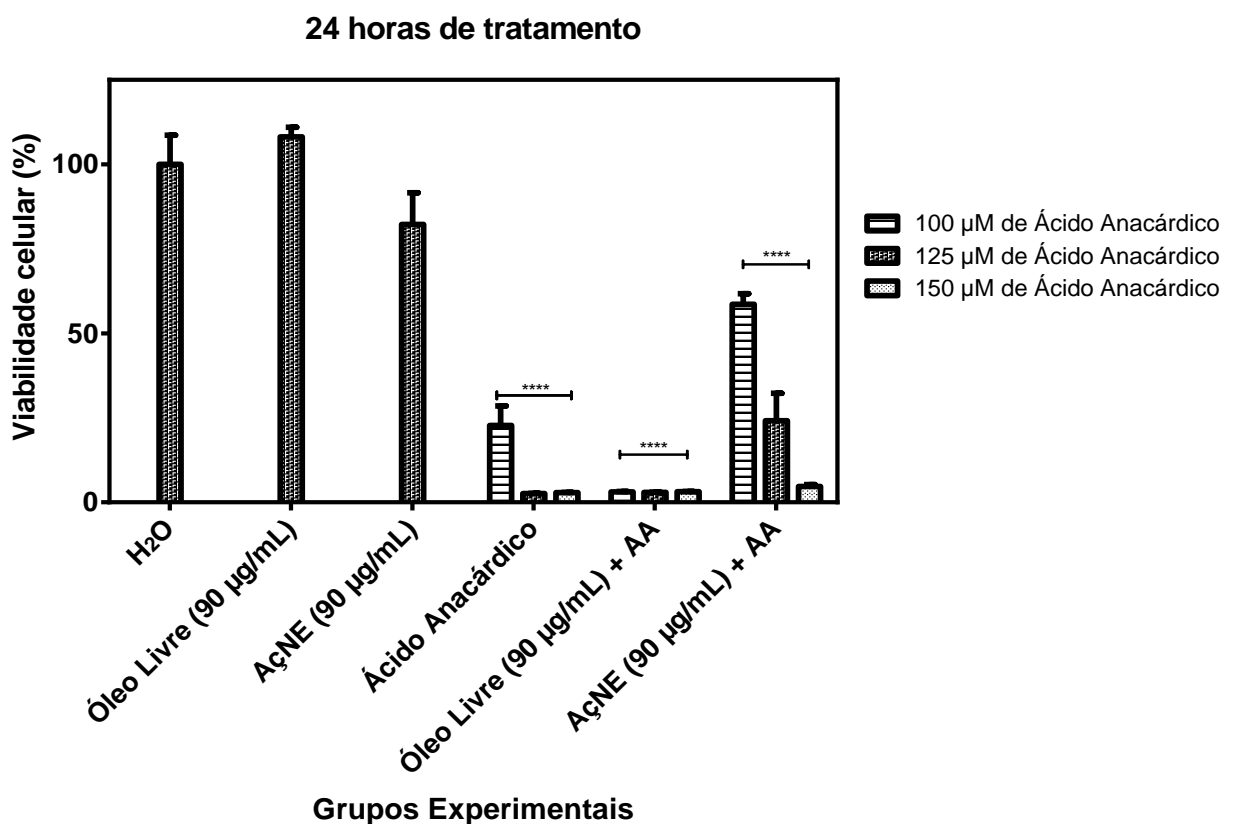


Figura 36. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos humanos (HaCaT) submetidas a concentração de 90 µg/mL do óleo de açaí, 90 µg/mL de AçNE (nanoemulsão de óleo de açaí), ácido anacárdico (150, 125 e 100 µM), óleo de açaí (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), AçNE (45 µg/mL) associado ao AA (150, 125 e 100 µM), comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001).

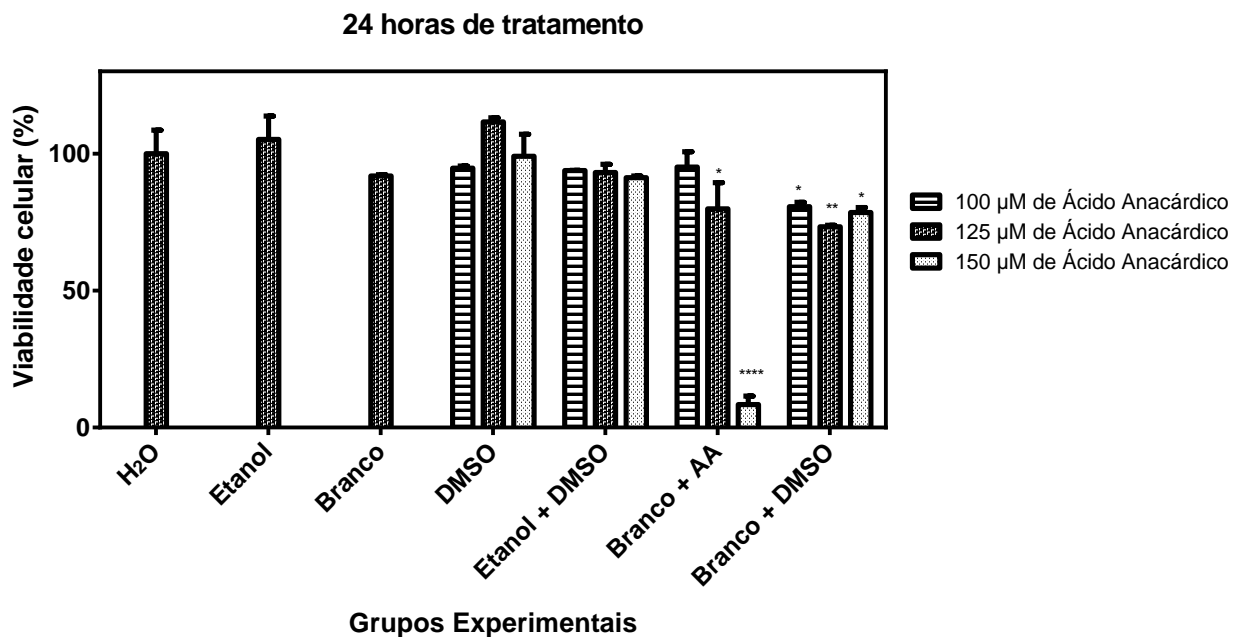


Figura 37. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de queratinócitos humanos (HaCaT) submetidas a concentração de Branco (surfactante e água) equivalente à concentração de AÇNE, etanol equivalente à concentração óleo livre, DMSO equivalentes as concentrações de AA, Branco associado ao AA (150, 125 e 100 µM), etanol associado ao AA (150, 125 e 100 µM), e Branco associado ao DMSO com as concentrações equivalentes ao tratamento AÇNE + AA, comparando-os com o controle água (H₂O) por 24 horas. Teste ANOVA, post-teste Dunnett (****: P < 0,0001).

A AÇNE apresentou uma redução na viabilidade celular de 80% nas células da linhagem de queratinócitos humanos não tumoral HaCaT, não sendo considerada significativo, mas quando associada ao AA, o efeito nas células não tumorais foi ligeiramente maior (28% na concentração de 125 µM) (Fig. 36), porém quando comparado à mesma concentração em células tumorais (Fig. 34) o dano foi ligeiramente maior (24%). Observou-se que os eventos ocorridos nas figuras 34 e 35 se repetiram nas figuras 36 e 37, aonde a presença da nanoemulsão reduziu a eficácia do AA.

Com base nesses resultados, foi utilizada a concentração de 90 µg/mL da AÇNE com a concentração de 125 µM AA, na citometria de fluxo com os ensaios de morte celular, fragmentação e potencial de membrana, para poder melhor entender como ocorre essa redução da viabilidade celular das células da linhagem A431.

5.2.3 AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar os efeitos da AçNE, óleo de açaí, AA, AçNE associado ao AA e óleo de açaí associado ao AA, nas concentrações de 90 µg/mL para a AçNE e óleo, e de 125 µM para o AA, na integridade de membrana e na proliferação celular das células A431 após 24 horas de exposição, foi utilizado o ensaio de azul de tripan. A água ultrapura (H₂O) foi utilizada como controle.

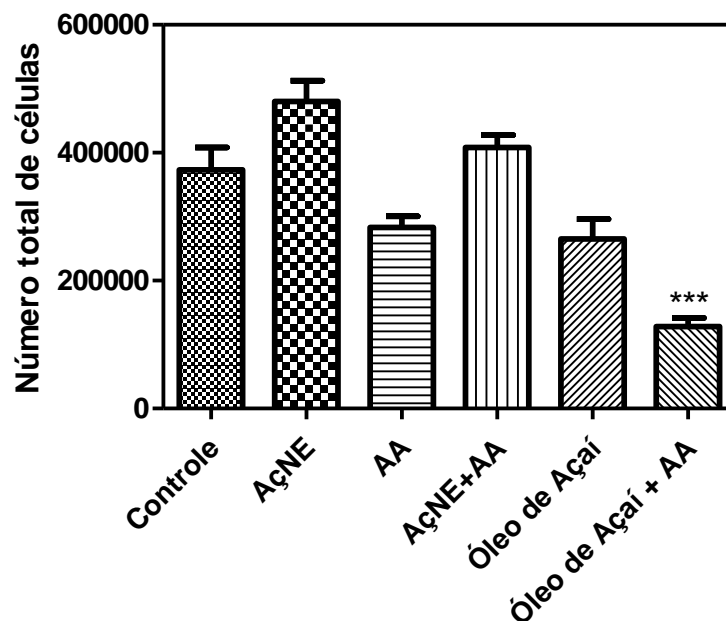


Figura 38. Avaliação por Azul de tripan do número total de células de carcinoma epidermóide após exposição por 24 horas às AçNE (nanoemulsão de açaí) e Óleo de açaí a 90 µg/mL, AA a 125 µM, AçNE a 90 µg/mL associado ao AA a 125 µM, Óleo de açaí a 90 µg/mL associado ao AA a 125 µM, e os controles Paclitaxel (PTX) a 50 nM, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 29,4 µM e água ultrapura (H₂O). Contagem das células em câmara de Neubauer.

Após 24 horas (Fig. 38), foi observado que apenas o Óleo de Açaí + AA diminuiu de forma significativa (65%) o número total de células. Pode-se notar que o AA e o óleo de açaí também diminuiram o número total de células em torno de 20%. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados nos ensaios de MTT realizados.

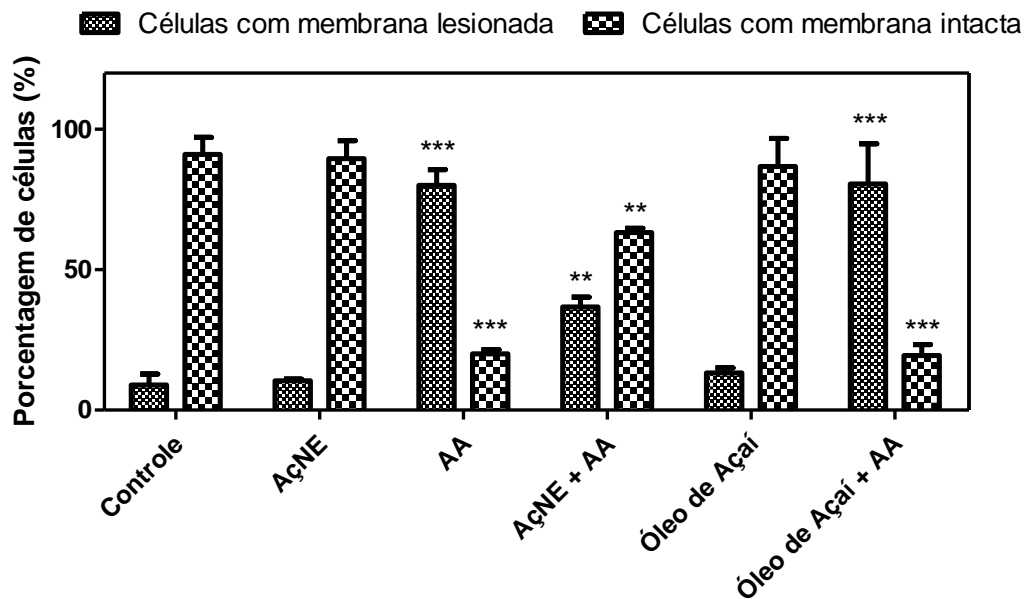


Figura 39. Porcentagem de células A431 com e sem lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às AgNPs, CH-AgNPs a 50 μM e ao controle água ultrapura (H_2O). Test ANOVA e post-teste Bonferroni: (***: $P < 0,0001$ / **: $P < 0,001$ e *: $P < 0,01$).

Foi possível observar que houve um aumento significativo do número de células com membrana lesionada após exposição ao AA, AçNE + AA e óleo + AA (Figura 39). Resultado que corrobora com os achados após os ensaios de MTT que foram realizados.

5.2.4 CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)

A técnica de Citometria de fluxo foi utilizada para estipular os mecanismos de ação das amostras utilizadas no tratamento da linhagem celular A431. Este método permite estabelecer a morfologia das células de acordo com seu tamanho (FSC-C) e granulosidade (SSC-H).

Fragmentação De DNA E Ciclo Celular

As células de carcinoma espinocelular (A431) foram expostas aos diferentes tratamentos (NE, AA, NE+AA, óleo e óleo + AA) na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$ para a AçNE e óleo e de 125 μM para o AA, obtendo assim os resultados da fragmentação de DNA (Fig.40) e do ciclo celular (Fig. 41).

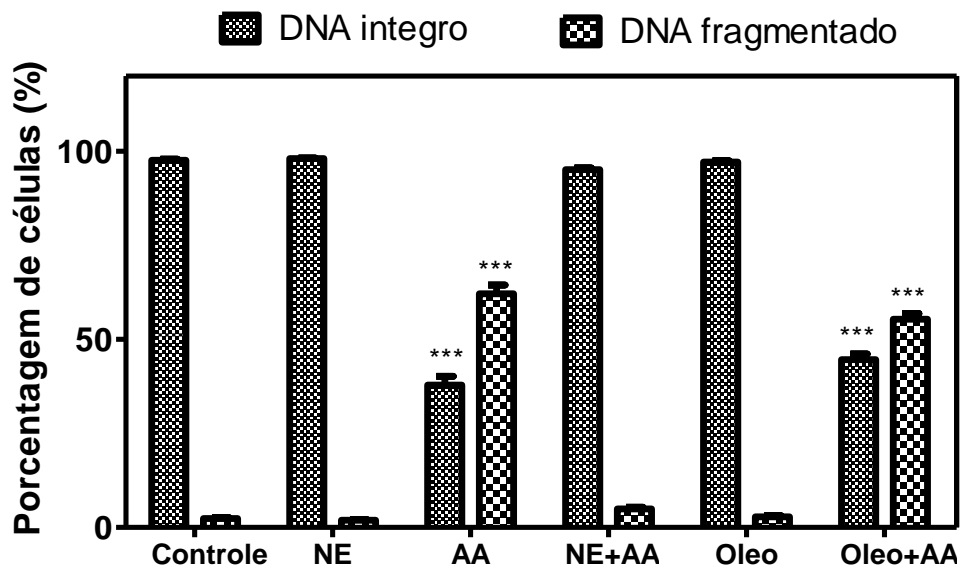


Figura 40. Avaliação da fragmentação de DNA por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AçNE, óleo livre, AA, AçNE + AA e Óleo Livre + AA na concentração de 90 µg/mL para a AçNE e óleo, e de 125 µM para o AA, em linhagem de Carcinoma epidermóide (A431). Teste ANOVA e pós-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: P < 0,0001).

No presente estudo, foi possível observar um aumento significativo da proporção de DNA fragmentado de 62 e 55%, em comparação com o controle, em células expostas ao AA e ao óleo + AA, respectivamente (Fig. 40). Não houve diferença significativa para as demais amostras após 24 horas de exposição.

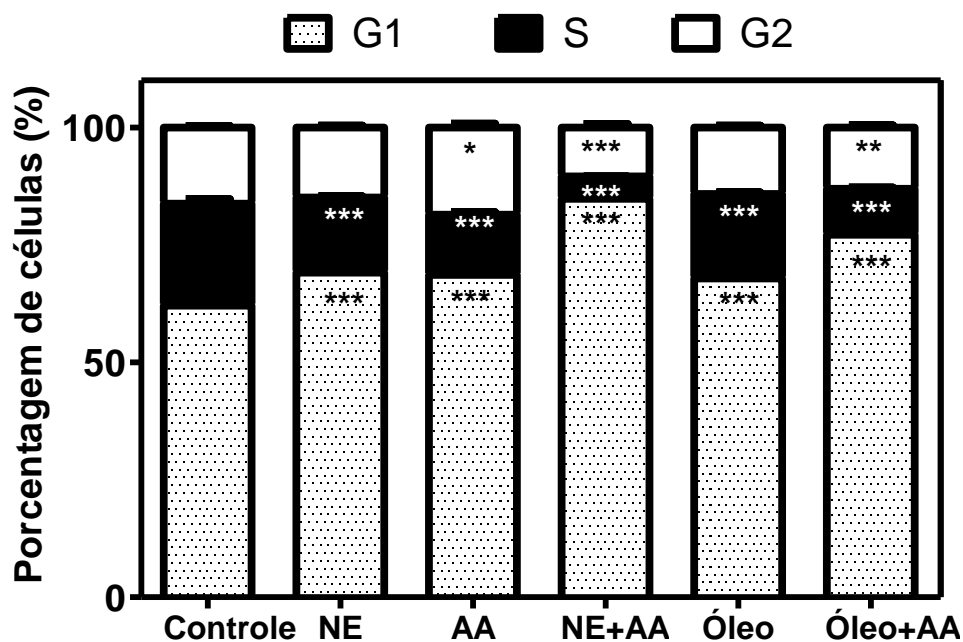


Figura 41. Avaliação do ciclo celular por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às NE, óleo, AA, NE + AA e Óleo + AA na concentração de 90 µg/mL para a AçNE e óleo, e de 125 µM para o AA em linhagem de carcinoma epidermóide (A431). Teste ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: P < 0,0001 / **: P < 0,001 e *: P < 0,01).

Após 24 horas de exposição, foi possível notar alterações do perfil do ciclo celular em todas as amostras testadas (Fig. 41). De fato, a proporção de células em fase G1 aumentou de forma significativa, principalmente após exposição ao NE + AA e ao óleo + AA, onde o aumento foi de 22 e 15%, respectivamente. Em paralelo, o número de células em fase S diminuiu de forma significativa em todas as amostras de 5 até 15% em comparação com o controle. No caso do AA, houve um aumento significativo do número de células em fase G2 de 5%. Para o NE + AA e o óleo + AA, houve uma diminuição significativa do número de células em fase G2 de 7 e 5%, respectivamente. Resultado semelhante foi descrito por SCHULTZ et al., (2010) e TAN et al., (2012) aonde os tratamentos utilizando AA resultaram em um aumento significativo das células em fase G1. O AA possui papel bem descrito como inibidor de HAT e de p300, fazendo assim com que induza as células a morte por apoptose (LIPKA et al., 2014).

5.2.4.2 Potencial De Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

As células de câncer epidermóide (A431) foram expostas aos diferentes tratamentos (NE, AA, NE+AA, óleo e óleo + AA) na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$ para a NE e óleo e de 125 μM para o AA, obtendo assim os resultados sobre o potencial de membrana mitocondrial (Fig.42).

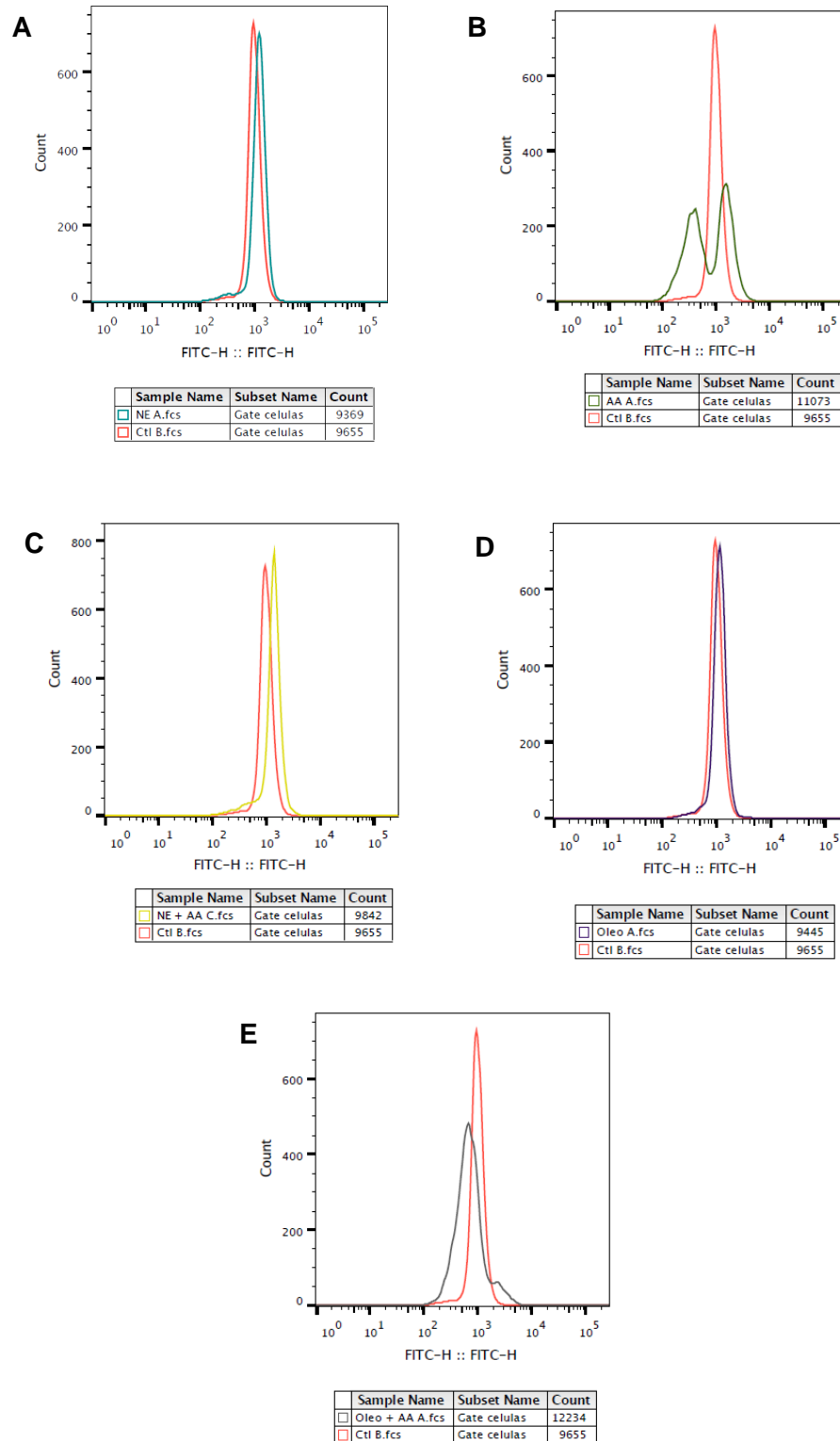


Figura 42. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) avaliado por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição das células de Carcinoma epidermóide (A431) às NE (**A**), AA (**B**), NE + AA (**C**), Óleo (**D**) e Óleo + AA (**E**) na concentração de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a NE e óleo, e de 125 μM para o AA.

Após 24 horas de exposição (Fig. 42), foi possível relatar que houve diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial em células expostas ao AA (Fig.

42 **B**) e ao óleo + AA (Fig. 42 **E**). É normal encontrar potenciais de membranas despolarizados, normais e hiperpolarizados durante o ciclo celular, mas quando existe uma despolarização excessiva, como é o caso do tratamento com o AA e óleo + AA, pode conferir por sinais mitocondriais que vão levar as células a morte por apoptose.

Foi feito uma representação do $\Delta\psi_m$ a partir da média geométrica, para observar melhor os eventos apresentados na figura 42.

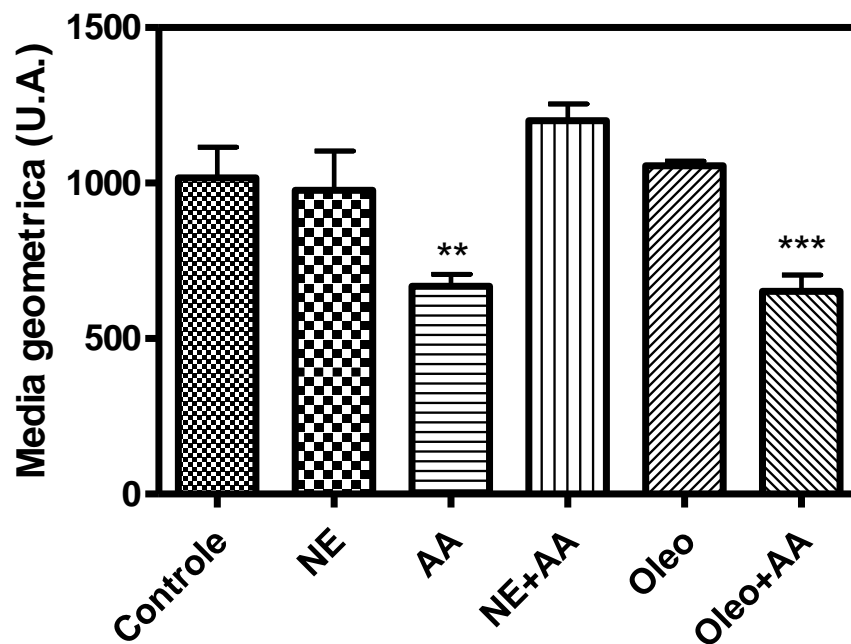


Figura 43. Representação do $\Delta\psi_m$ a partir da média geométrica após os diferentes tratamentos. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: $P < 0,0001$ e **: $P < 0,001$).

Observou-se que apenas os tratamentos com AA e óleo+AA apresentaram a despolarização do potencial de membrana, sendo consideradas significativas. Enquanto a NE+AA apresentaram um aumento no potencial de membrana, porém não foi estatisticamente significativo.

Exposição A Fosfatidilserina

Após 24 horas de exposição às NE, AA, NE + AA, óleo e óleo + AA, as células foram marcadas por Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI) e analisadas por citometria de fluxo (Fig. 45). O ajuste dos parâmetros do equipamento para a detecção adequada dos dois marcadores foi realizado utilizando células controle negativo (água) sem

marcação (Fig. 44 **A**), células tratadas por H_2O_2 e marcada apenas por anexina V – FITC (Fig. 44 **B**), células tratadas por H_2O_2 e marcadas apenas por PI (Fig. 44 **C**) e células tratadas por H_2O_2 e marcadas por ambos marcadores (Fig. 44 **D**), por 24 horas. A detecção da marcação por Anexina-V é representada pelo eixo X (FITC-A) e a detecção do PI corresponde ao eixo Y (*Propidium Iodide*-A). Cada *Dot plot* está dividido 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 (Fig. 44). Essa divisão foi utilizada como padrão para determinar a marcação das células após os diferentes tratamentos (Fig. 45).

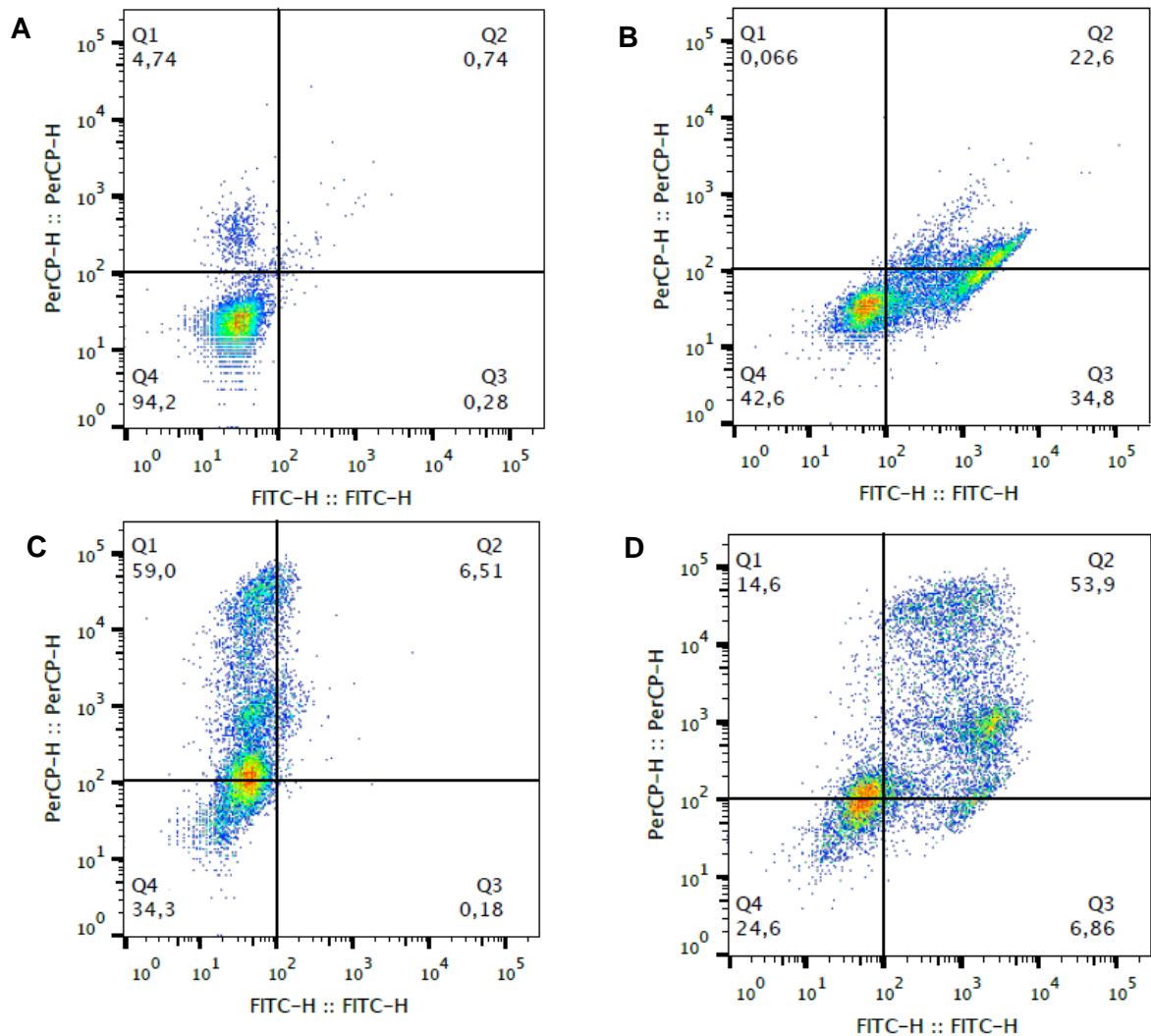


Figura 44. *Dot plot* dos ajustes dos parâmetros para a detecção dos marcadores após o tratamento das células de Carcinoma epidermóide (A431) com controle negativo (água) sem marcação (**A**), H_2O_2 e marcada apenas por anexina V – FITC (**B**), H_2O_2 e marcadas apenas por PI (**C**) e por H_2O_2 e marcadas por ambos marcadores (**D**).

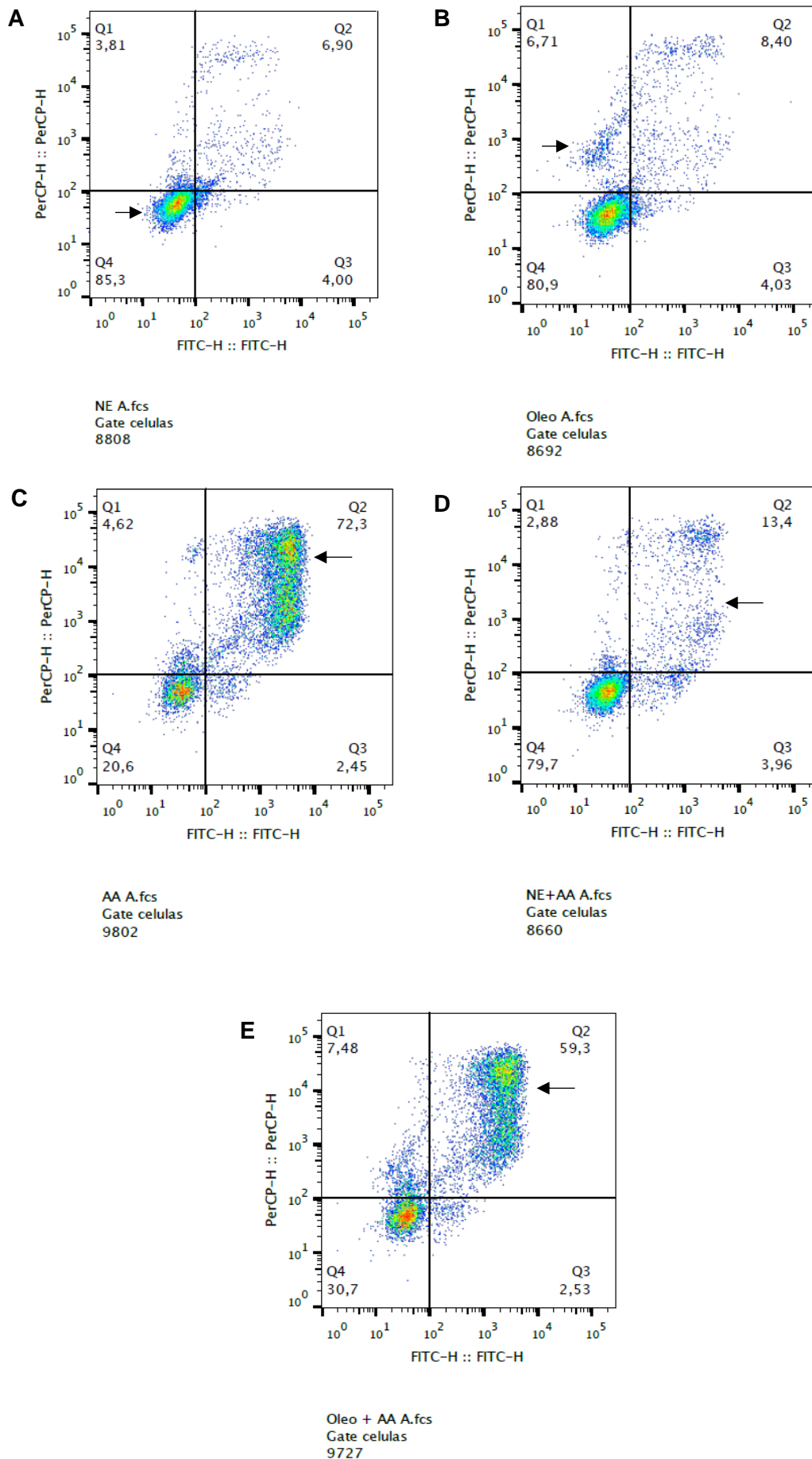


Figura 45. Dot plot da avaliação de morte celular de células carcinoma epidermóide A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (PI), por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição a NE (A), Óleo (B), AA (C), NE + AA (D) e Óleo + AA (E) na concentração de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a NE e óleo, e de 125 μM para o AA.

A NE e óleo apresentam um perfil muito similar com o controle negativo (água) (Fig.45 **A** e **B**), enquanto que a NE + AA (Fig. 45 **D**), duas populações começam a se formar no quadrante Q2 mas não foi significativo. Já para AA (Fig. 45 **C**) e óleo + AA (Fig. 45 **E**) houve marcação dupla bem forte sugerindo morte celular por apoptose tardia e/ou necrose, resultado que se assemelha ao descrito no trabalho de TAN et al., (2012).

Cada gráfico ilustrado na figura 46 representa um dos quadrantes dos *Dot Plots* expostos na figura 45.

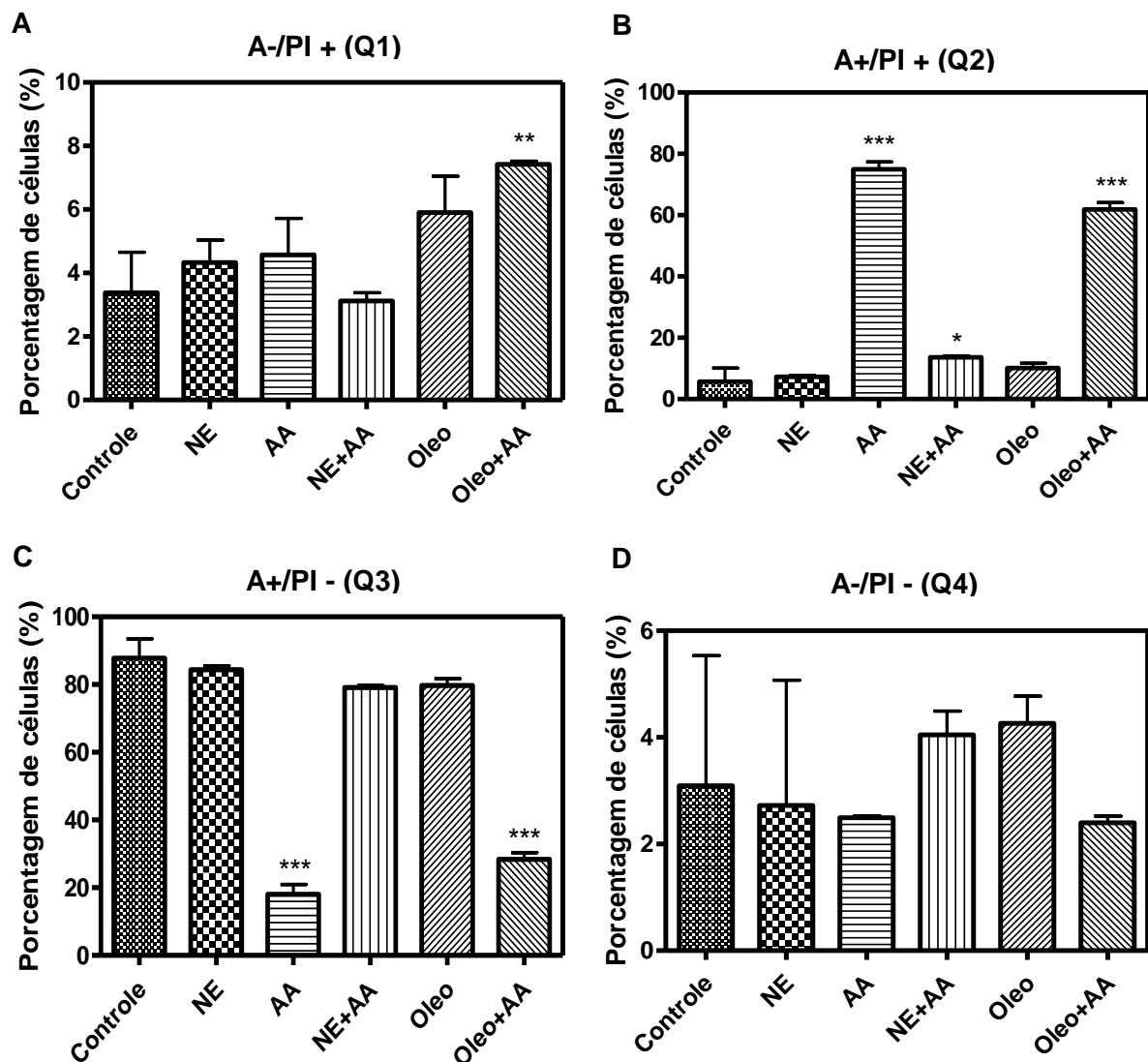


Figura 46. Avaliação da morte celular em linhagem de Carcinoma epidermoide-A431 através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por Citometria de fluxo após exposição a NE (**A**), Óleo (**B**), AA (**C**), NE + AA (**D**) e Óleo + AA (**E**) na concentração de 90 µg/mL para a NE e óleo, e de 125 µM para o AA. 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 (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**). A água ultrapura (H₂O), o Paclitaxel (PTX) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram utilizados como controles. Test ANOVA e post-teste Bonferroni, diferença significativa quando comparado com o controle (***: P < 0,0001 / **: P < 0,001 e *: P < 0,01).

Com os gráficos da Figura 46, foi possível observar melhor as diferenças que ocorrem entre os tratamentos. Aumento da marcação por PI para o óleo + AA e dupla marcação para AA e óleo + AA, sugerindo morte celular por apoptose tardia e/ou necrose. Resultado semelhante ao encontrando por Monge-Fuentes et al., (2017) e Ramos (2013) Os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa.

Os resultados dos ensaios biológicos em células de CE (A431) após 24 horas de exposição a AçNE, AA, AçNE + AA, Óleo de Açai e Óleo de Açai + AA, foram compilados na tabela 5.

Tabela 5. Compilação dos resultados dos ensaios biológicos em células de Carcinoma epidermóide (A431) após 24 horas de exposição a AçNE, AA, AçNE + AA, Óleo de Açai e Óleo de Açai + AA na concentração de 90 µg/mL para a AçNE e óleo de açai, e de 125 µM para o AA.

	Controle	AçNE	Óleo de Açai	Ácido Anacárdico	AçNE + AA	Óleo de Açai + AA
Viabilidade Celular – MTT	100%	> 100%	> 100%	< 2%	< 20%	< 2%
Lesão de Membrana	8%	10,5%	13,2%	80%	36,7%	80,5%
Proliferação Celular	Considerado como 100%	NA	20%	20%	NA	65%
Fragmentação de DNA	2,3%	1,8%	2,7%	62,1%	4,9%	55,3%
Ciclo Celular	G1: 62%	G1: 69,1%	G1: 67,8%	G1: 68,57%	G1: 84,7%	G1: 77,1 %
	S: 21,7%	S: 15,9%	S: 17,9%	S: 12,8%	S: 4,7%	S: 9,7%
	G2: 16,2%	G2: 14,8%	G2: 14,1%	G2: 18,5%	G2: 10,4%	G2: 13%
Potencial de Membrana Mitocondrial	Normal	NA	NA	Diminuiu	Aumentou	Diminuiu
Marcação por PI	3,3%	4,3%	5,9%	4,5%	3,1%	7,4%
Marcação por Anexina - V	3%	2,7%	4,2%	2,4%	4%	2,3%
Marcação por PI/Anexina V	5,7%	7,2%	10%	74,9%	13,6%	61,8%

*NA = Não houve alteração

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- 1- A síntese da AçNE depende de diversos parâmetros e as condições otimizadas foram: armazenamento adequado do óleo protegido da luz e do calor, proporção de surfactante:óleo, tempo de sonicação, preservação de todo o material em banho de gelo e conservação do material formulado a 4 °C.
- 2- As AçNEs 2:1 apresentaram os menores diâmetro hidrodinâmico, menor variação do potencial zeta, Pdl e do diâmetro após 180 dias em comparação às AçNE 1:1 e AçNE 1:2.
- 3- A AçNE formulada nas condições otimizadas apresentou um diâmetro hidrodinâmico de $140,0 \pm 2,2$ nm. As nanoemulsões apresentaram uma homogeneidade moderada com um Pdl de 0,229, junto de uma moderada estabilidade coloidal em conformidade com o potencial Zeta de $-17,6 \pm 0,5$ mV, com um pH neutro de 7.
- 4- As nanoemulsões AçNEs CH e PEG apresentaram os menores diâmetros hidrodinâmicos em comparação às AçNE e a AçNE DOTAP.
- 5- Todas as AçNEs armazenadas a 4 °C apresentaram uma melhor estabilidade ao longo de 120 dias.
- 6- No início dos estudos a AçNE assim como o óleo de açaí, apresentaram potencial citotóxico no ensaio de viabilidade celular (MTT) nos tempos de 24 e 72 horas contra a linhagem de câncer de pele não melanoma humano (A431), porém com o decorrer dos estudos, sua atividade diminuiu.
- 7- O óleo do açaí livre associado ao ácido anacárdico, apresenta efeito combinatório não específico na redução da viabilidade de células de câncer de pele não-melanoma (A431) e células de queratinócitos humanos (HaCaT) após 24 horas de exposição em todas as concentrações testadas.
- 8- O ensaio de viabilidade celular (MTT) demonstrou que no tempo de 24 horas a AçNE associada ao ácido anacárdico diminui o potencial citotóxico do ácido

anacárdico contra a linhagens de células de câncer de pele não melanoma humano (A431) e queratinócitos humanos (HaCaT).

- 9- A AçNE não foi capaz de induzir lesão de membrana plasmática, alterar a proliferação celular, aumentar a taxa de DNA fragmentado, alterar o potencial de membrana mitocondrial após 24 horas de exposição a 90µg.
- 10-A AçNE associada ao ácido anacárdico não foram capazes de induzir lesão de membrana plasmática, alterar a proliferação celular, aumentar a taxa de DNA fragmentado, porém aumentou a proporção de células em fase G1 e do potencial de membrana mitocondrial após 24 horas de exposição a 90µg de AçNE com 125 µM de ácido anacárdico.
- 11-O óleo de açaí livre associado ao ácido anacárdico foram capazes de induzir lesão de membrana plasmática, diminuir a proliferação celular, aumentar a taxa de DNA fragmentado, aumentar a proporção de células em fase G1, diminuir o potencial de membrana mitocondrial e induzir morte celular por apoptose após 24 horas de exposição a 90µg de óleo de açaí com 125 µM de ácido anacárdico.

7 REFERÊNCIAS

- AL-HAZZANI, A. et al. Formulation of cashew nut shell liquid (CSNL) nanoemulsion, a potent inhibitor of human MCF-7 breast cancer cell proliferation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 7, p. 1384–1388, 12 jul. 2012.
- AL-LAZIKANI, B.; BANERJI, U.; WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 679–692, 10 jul. 2012.
- APALLA, Z. et al. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. S1, p. 5–19, 1 jan. 2017.
- BERNARDI, D. S. et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 44, 2011.
- BHANDARI, P. R.; PAI, V. V. Novel medical strategies combating nonmelanoma skin cancer. **Indian journal of dermatology**, v. 59, n. 6, p. 531–46, nov. 2014.
- CAMPOS, J.; VARAS-GODOY, M.; HAIDAR, Z. S. Physicochemical characterization of chitosan-hyaluronan-coated solid lipid nanoparticles for the targeted delivery of paclitaxel: a proof-of-concept study in breast cancer cells. **Nanomedicine**, v. 12, n. 5, p. 473–490, mar. 2017.
- CATHER, J. C.; CROWLEY, J. J. Use of Biologic Agents in Combination with Other Therapies for the Treatment of Psoriasis. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 15, n. 6, p. 467–478, 6 dez. 2014.
- CHIN, Y.-W. et al. Lignans and Other Constituents of the Fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with Antioxidant and Cytoprotective Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7759–7764, 10 set. 2008.
- CONG, Z. et al. Design and optimization of thermosensitive nanoemulsion hydrogel for sustained-release of praziquantel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 5 jan. 2017.

CORREIA, S. DE J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287–1300, dez. 2006.

DAHER, C. C. et al. Development of O/W emulsions containing Euterpe oleracea extract and evaluation of photoprotective efficacy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 639–652, set. 2014.

DE LIMA, S. G. et al. Effects of immature cashew nut-shell liquid (*Anacardium occidentale*) against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae* and inhibition of acetylcholinesterase activity. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 7, n. 3, p. 806–18, 9 set. 2008.

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

DE SOUZA, L. R. et al. PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 32, 23 dez. 2014.

DEILSON, E. DE O. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2002.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539–1545, mar. 2004.

DIAS, M. M. DOS S. et al. Pro-Apoptotic Activities of Polyphenolics From Açai (*Euterpe oleracea* Martius) in Human SW-480 Colon Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 8, p. 1394–1405, 17 nov. 2014.

FELLER, L. et al. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. **Head & Face Medicine**, v. 12, n. 1, p. 11, 5 dez. 2016.

FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P. A. DA. Multiple emulsions containing amazon oil: açai oil (*Euterpe oleracea*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p.

737–743, ago. 2011.

FORGIARINI, A. et al. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, abr. 2001.

FORTUNA, I. Dinâmica de Crescimento de Espumas Molhadas. p. 161, 2010.

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

FRYD, M. M.; MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 493–518, 5 maio 2012.

GALLORI, S. et al. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, n. 11–12, p. 739–743, 3 jun. 2004.

GANTA, S.; AMIJI, M. Coadministration of Paclitaxel and Curcumin in Nanoemulsion Formulations To Overcome Multidrug Resistance in Tumor Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 928–939, jun. 2009.

GERHAUSER, C. Cancer Chemoprevention and Nutri-Epigenetics: State of the Art and Future Challenges. In: **Natural Products in Cancer Prevention and Therapy**. [s.l: s.n.]. p. 73–132.

GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. **British Journal of Dermatology**, p. 1–9, fev. 2017.

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717–721, 2009.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 16 abr. 2015.

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

HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122–132, fev. 2012.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

KIM, G.-D. Anacardic acid induces mitochondrial-mediated apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 3, p. 1045–1051, 8 jan. 2013.

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

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

MIGNANI, S. et al. Advances in Combination Therapies Based on Nanoparticles for Efficacious Cancer Treatment: An Analytical Report. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 1, p. 1–27, 12 jan. 2015.

MONGE-FUENTES, V. et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (Euterpe oleracea Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 301–310, jan. 2017.

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

MORAIS, T. C. et al. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 1, p. 264–269, jan. 2010.

NAYAK, D. et al. Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431

carcinoma. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 457, p. 329–338, 2015.

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

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, dez. 2007.

OMBREDANDE, A. S. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de Curcuma longa L. associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral in vitro em câncer de pele não melanoma (linhagem A431)**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.

PDQ CANCER GENETICS EDITORIAL BOARD. **Genetics of Skin Cancer (PDQ®): Health Professional Version**. [s.l.: s.n.].

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

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span 20/Tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, n. 1–3, p. 241–254, maio 2003.

SCHULTZ, D. J. et al. Anacardic Acid Inhibits Estrogen Receptor -DNA Binding and Reduces Target Gene Transcription and Breast Cancer Cell Proliferation. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 594–605, 1 mar. 2010.

SEONG, Y.-A. et al. Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Human Lung Carcinoma A549 Cells by Anacardic Acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 369–377, 17 mar. 2014.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24, 2010.

SILVA, A. E. DA; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625–633, abr. 2004.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, fev. 2015.

SRIRAMAN, S. K.; ARYASOMAYAJULA, B.; TORCHILIN, V. P. Barriers to drug delivery in solid tumors. **Tissue Barriers**, v. 2, n. 3, p. e29528, 22 jul. 2014.

SUKUMARI-RAMESH, S. et al. Anacardic acid induces caspase-independent apoptosis and radiosensitizes pituitary adenoma cells. **Journal of Neurosurgery**, v. 114, n. 6, p. 1681–1690, jun. 2011.

TAN, J. et al. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 24, n. 4, p. 275–83, dez. 2012.

USHANANDINI, S. et al. The anti-ophidian properties of *Anacardium occidentale* bark extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 31, n. 4, p. 607–615, 30 dez. 2009.

WANG, L. et al. Formation and stability of nanoemulsions with mixed ionic–nonionic surfactants. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 42, p. 9772, 2009.

WU, Y. et al. Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Src/FAK/Rho GTPases Signaling Pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, n. 2, p. 403–411, 1 nov. 2011.

YUN, C.; BAE, C.; AHN, T. Cargo-Free Nanoparticles Containing Cationic Lipids Induce Reactive Oxygen Species and Cell Death in HepG2 Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 8, p. 1338–1346, 2016.