



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DA CEILÂNDIA**

**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ANACÁRDICO À NANOEMULSÃO A BASE DE
ÓLEO DE PEQUI E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS DE
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10)**

PATRÍCIA LEITE COSTA

CEILÂNDIA-DF

MAR/2020

PATRÍCIA LEITE COSTA

**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ANACÁRDICO À NANOEMULSÃO A BASE DE
ÓLEO DE PEQUI E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS DE
MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10)**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti

CELÂNDIA-DF

MAR/2020

PATRICIA LEITE COSTA

**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ANACÁRDICO À NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO
DE PEQUI E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PARÂMETROS DE MIGRAÇÃO
DE CÉLULAS DE MELANOMA (B16F10)**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti

Orientadora

Profa Dr^a. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Examinadora

Dr^a. Bruna Cândido Guido

Examinadora

Profa Dr^a Jaqueline Rodrigues da Silva

Examinadora suplente

Gostaria de dedicar este trabalho a Deus, à minha família e a todos os cientistas que enfrentam dificuldade por meio do seu trabalho tornar o mundo melhor. Que nós tenhamos força e não desistamos da ciência e de honrar aqueles que se confiam em nós.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, o Senhor da vida e da história, que tem me conduzido por caminhos incríveis afim de chegar a este momento. Obrigada Senhor por ter me carregado nos braços nos momentos que pensei que não conseguiria. Somente por Ti foi possível a realização deste trabalho.

Agradeço à minha família, principalmente meus pais, Sérgio e Roberta, por todo amor, carinho, dedicação e lições de que a vida é muito mais que títulos que você acumula e o conhecimento vai muito além de sala de aulas. Vocês me ensinaram primeiramente a ser o melhor que consiga ser e que a vida pode te dar muitos desafios, mas que nada é impossível quando se tem Deus e a família. Às minhas irmãs Rebeka e Alice obrigada por me ensinarem a sair um pouco de mim e olhar ao redor as necessidades do próximo.

Agradeço aos meus irmãos de comunidade pelas orações e paciência a me escutarem e estarem sempre comigo. Obrigada por entenderem minha ausência.

Gostaria de agradecer aos meus amigos que torceram por mim durante todo o período de mestrado, estiveram ajudando por meio de orações e conselhos. Obrigada por entender minha ausência em momentos importantes.

Agradeço aos meus amigos de mestrado e de vida: Ana Flávia, Beatriz, Lucas e Maria, pelos muitos momentos compartilhados de alegrias, risos, comidas, experimentos e tudo que partilhamos. Vocês tornaram o laboratório uma ambiente agradável e a experiência do mestrado momentos incríveis quando estava difícil. Muito obrigada pela força e pelas ajudas científicas tanto nos experimentos como em discussões sobre resultados. Quero levar a amizade de vocês para toda a vida, sou orgulhosa dos profissionais que vocês se tornaram.

Agradeço aos meus colegas de grupo de pesquisa, muito obrigada pela ajuda nos experimentos e discussões científicas, desejo sucesso a todos vocês.

Agradeço também e não menos importante à minha professora orientadora Graziella, uma mulher que me inspira tanto a ser uma mulher melhor quanto ser cientista melhor. Obrigada por ter me aceitado desde o segundo semestre de faculdade como a uma filha, por ter tido paciência comigo e nunca ter deixado eu desistir. Agradeço por ter me acolhido nos momentos difíceis, ter tido abertura a me escutar e nunca ter abandonado o barco junto comigo. Minha querida professora, nunca teria conseguido sem você.

A todos os professores que passaram por minha vida acadêmica até o momento, lembrarei de todos sempre com muito carinho pelas lições sobre o “ser farmacêutico” e sobre “ser pessoa”. Vocês são de verdade mestres, tentarei sempre honrá-los e ser um pouco como vocês.

Aos professores da banca examinadora, obrigada por terem aceitado o convite com prontidão.

**Tudo que fazemos é um meio para um fim, mas o amor é um fim em si mesmo,
porque Deus é Amor”.**

(Santa Edith Stein)

RESUMO

O melanoma é o subtipo mais agressivo dos cânceres de pele, apresentando perfil de resistência a múltiplas drogas e expressiva capacidade de metástase, que é a habilidade de invasão e colonização de outros tecidos por células cancerosas. Inúmeros trabalhos relacionaram atividade antiproliferativa, antimetastática, pró-apoptótica e reguladora de ciclo celular de compostos naturais em células cancerosas. O ácido anacárdico (AA) é um composto bioativo, derivado do líquido da casca de castanha de caju, com atividade antitumoral descrita contra vários tipos de câncer, incluindo melanoma. O óleo de pequi tem apresentado atividade antioxidante e antitumoral em câncer de mama. A utilização de nanoemulsões aperfeiçoa a aplicação de compostos hidrofóbicos em aumentando sua biodisponibilidade. No entanto, estudos que abordam os efeitos do AA (análogo 15:0) isolado e em combinação com nanoemulsão de óleo de pequi na proliferação celular (a curto e longo prazo), nas principais estruturas celulares (mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, membrana plasmática) e em características metastáticas (migração e invasão) das células de melanoma (B16F10) ainda não foram realizados; portanto, esse é o objetivo do presente trabalho. A formulação de nanoemulsão de óleo de pequi (PeNE) em combinação com AA foi realizada por ultrassonicação e os parâmetros de características físico-químicas foram analisado por DLS. A PeNE+AA apresentou parâmetros de diâmetro hidrodinâmico igual a $166,24 \pm 38,27$ nm, índice de polidispersão igual a $0,261 \pm 0,024$ e potencial zeta de $-47,5 \pm 10,6$ mV. Os ensaios de viabilidade, invasão e migração foram realizados pelas técnicas MTT, xCELLigence RTCA e “*scratch assay*” respectivamente. Alterações nas organelas celulares e na membrana celular foram determinadas por citometria de fluxo. As células expostas ao tratamento com PeNe, AA, PeNe+AA por 24 e 48 horas mostraram uma redução dose- e tempo-dependente significativa da viabilidade celular; inclusive com o grupo PeNe+AA sugerindo efeito de sinergismo nesse ensaio. AA e PeNe+AA afetaram a proliferação celular, reduziram tamanho celular, despolarização induzida da membrana mitocondrial, permeabilidade da membrana do lisossomo e aumento da produção de ERO; no entanto, nenhum estresse no retículo endoplasmático foi observado. Esses dados sugerem que o AA induz a morte celular em células de melanoma por apoptose ou autofagia. Houve diferença na porcentagem de células com membrana lesionada no grupo tratado com PeNe+AA, indicando sinal de morte celular por apoptose tardia. Além disso, o tratamento com AA e PeNe+AA interferiu significativamente nos padrões de migração e invasão das células B16F10. Em resumo, nossos dados destacam o poder dos fitoquímicos como moléculas adjuvantes na terapia do câncer e evidenciam o AA e

a combinação com PeNE como uma estratégia promissora a ser melhor estudada para aplicação clínica no futuro.

Palavras-chave: melanoma, nanoemulsão, ácido anacárdico, óleo de pequi, metástase, invasão.

ABSTRACT

Melanoma is a subtype of skin cancer that represents only 1% of skin cancer cases, however it corresponds to 60% of skin cancer deaths. Melanoma is the most aggressive subtype of skin cancers, as it has a great capacity for metastasis and resistance profile to multi-drugs. Metastasis is the ability to invade and colonize other tissues by cancer cells and is responsible for 90% of cancer deaths. Countless studies have related antiproliferative, antimetastatic, pro-apoptotic and cell cycle regulating activity in cancer cells. Anacardic acid (AA) is a bioactive compound, derived from the cashew nut shell, with anticancer activity described against several types of cancer, including melanoma. Pequi oil has demonstrated antioxidant and antitumor activity in breast cancer. The use of nanoemulsions improves the application of hydrophobic compounds in increasing their bioavailability. However, as far as we know, studies that address the effects of AA (15: 0) alone and in combination with pequi oil nanoemulsion on cell proliferation (short and long term), on the main cell structures (mitochondria, lysosomes, reticulum endoplasmic, plasma membrane) and metastatic characteristics (migration and invasion) of melanoma cells have not yet been performed; therefore, this is the objective of the present work. The formulation of pequi oil nanoemulsion in combination with anacardic acid was carried out by ultrasound and the parameters of physical-chemical characteristics were analyzed by DLS. Nanoformulation of anacardic acid in pequi oil nanoemulsion showed parameters of hydrodynamic diameter equal to 166.24 ± 38.27 nm, polydispersion index equal to 0.261 ± 0.024 and zeta potential of -47.5 ± 10.6 mV. Proliferation, invasion and migration evaluation were carried out using the MTT, xCELLigence RTCA and scratch assay techniques. Changes in cell organelles and cell membrane were determined by flow cytometry. The cells exposed to treatment with OL Pe, PeNe, AA, PeNe + AA for 24 and 48 hours showed a significant reduction in cell viability, dependent on dose and time. The combination of AA with pequi oil in a nanoemulsion formulation suggested a synergistic effect in reducing cell viability. AA and PeNe + AA affected cell proliferation, reduced cell size, induced depolarization of the mitochondrial membrane, permeability of the lysosome membrane and increased ROS production; however, no stress on the endoplasmic reticulum was observed. These data suggest that AA induces cell death in melanoma by apoptosis or autophagy. There was a difference in the percentage of cells with damaged membrane in the group treated with PeNe + AA, indicating a sign of cell death due to late apoptosis. In addition, treatment with AA and PeNe + AA significantly interfered with the migration and invasion patterns of B16F10 cells. In summary, our data highlights the power of phytochemicals as adjuvant molecules in cancer

therapy and highlights AA and the combination with pequi oil nanoemulsion as a promising strategy to be used for future anticancer clinical use.

Key words: melanoma, nanoemulsion, anacardic acid, pequi oil, metastasis, invasion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido anacárdico

ANOVA – Análise de variância

ATCC – American Type Culture Collection

B16F10- linhagem de câncer de pele melanoma murino

DLS – Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FACS – Citometria de fluxo

INCA – Instituto Nacional de Câncer

L- - Nanoemulsão “vazia” contendo água e surfactante

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

OL Pe - óleo de pequi

PdI – Índice de polidispersão

PeNe - nanoemulsão à base de óleo de pequi

PeNe +AA - nanoemulsão à base de óleo de pequi associada a ácido anacárdico

pH - Atividade do íon hidroxônio

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

UnB – Universidade de Brasília

UV – Radiação ultravioleta

WHO – World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** "Hallmarks of cancer", representação das principais características das células cancerosas. Adaptado de: Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74..... 1
- Figura 2** Fases de desenvolvimento de tumor maligno e potenciais locais de ação. Adaptado de: Iqbal J, Abbasi BA, Ahmad R, Batool R, Mahmood T, Ali B, et al. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. Biomed Pharmacother [Internet]. 2019 Jan;109(June 2018):1381–93..... 3
- Figura 3** Processo de metástase e invasão de células cancerosas. Adaptado de: Labbé D. Les flavonoïdes d’origine alimentaire et le cancer : inhibition de l’angiogénèse tumorale et du potentiel invasif des médulloblastomes. 2008;148..... 4
- Figura 4** Partes do fruto do caju (*Anacardium occidentale L.*) e da castanha. Adaptado de: 1. Nasrollahzadeh M, Sajjadi M, Sajadi SM, Issaabadi Z. Green Nanotechnology. In: Interface Science and Technology [Internet]. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2019. p. 145–98..... 8
- Figura 5** Estrutura química de ácido anacárdico (ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico) 15:0. Fonte: https://www.chemsrc.com/en/cas/16611-84-0_1109645.html 9
- Figura 9** Fruto de pequi *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). Adaptado de: <http://supernutricao.com.br/2018/01/24/pequi-para-que-serve-beneficios/> 10
- Figura 10** Principais nanossistemas utilizados na terapia e diagnóstico do câncer. Adaptada de: Cryer AM, Thorley AJ. Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. Pharmacol Ther [Internet]. 2019 Jun;198:189–205..... 13
- Figura 11** Representação esquemática de nanoemulsões óleo em água (O/A). Adaptado de: McClements DJ. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. Ther Deliv [Internet]. 2013 Jul;4(7):841–57. 14
- Figura 12** Fluxograma de desenho experimental..... 18
- Figura 13** Efeito citotóxico do ácido anacárdico em células de melanoma. Ensaio de MTT em células de melanoma (B16F10) tratadas com ácido anacárdico. As células foram expostas ao tratamento por 24 (A) e 48 horas (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os os grupos (**** = $p < 0,0001$), pós-teste Tukey. Valor de IC_{50} e R^2 calculado a partir de regressão não-linear. 30
- Figura 14** Efeito citotóxico de nanoemulsão à base de óleo de pequi associado ao ácido anacárdico (15:0) em células de melanoma. As células foram expostas ao tratamento por 24

horas (A) e 48 horas (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos (**** = $p < 0,0001$), pós-teste Tukey. Valor de IC 50 e R2 calculado a partir de regressão não linear. 32

Figura 15 Perfil de proliferação de células de melanoma. O ensaio de adesão celular de RTCA foi realizado durante o tratamento com nanoemulsão à base de óleo pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA). As experiências foram realizadas em triplicado. Teste One-way ANOVA (***) = $p < 0,001$). 33

Figura 16 Ensaio de formação de colônias. Fração de sobrevivência de células de melanoma tratadas com nanoemulsão de óleo de pequi (PeNe), nanoemulsão de óleo de pequi conjugada com ácido anacárdico (PeNe + AA) e ácido anacárdico livre (AA). One-way ANOVA (pós-teste Tukey) *** $p = 0,003$ 34

Figura 17 Aspecto morfológico do B16F10 por microscópio de contraste de fase 20x. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico a 64 μ M (PeNE + AA) por 24 horas 90 μ g/mL Barra de escala: 200 μ m 35

Figura 18 Dot plot de morfologia das células da linhagem de câncer de pele melanoma (B16F10) por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com controle PBS 1X, nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico PeNE + AA) por 24 horas 90 μ g/mL e 64 μ M para AA. 35

Figura 19 Análise morfológica de células de melanoma (B16F10). As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas 90 μ g/mL e 64 μ M para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. Legenda: tamanho (FSC-H) e granularidade (SSC-H). ANOVA unidirecional: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. 36

Figura 20 Acidez lisossômica de células de melanoma (B16F10). As células foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugada com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a 90 μ g/mL e 64 μ M para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. O estado funcional do lisossomo foi medido por laranja de acridina (LA) com representação da porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência da LA (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os

grupos $p < 0,05$ (pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos..... 36

Figura 21 Detecção de espécies reativas intracelulares de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a $90 \mu\text{g/mL}$ para Ne e $64 \mu\text{M}$ para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. As EROs intracelulares analisadas com CM-H2DCFDA são representadas como porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência de DCF (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey)..... 37

Figura 22 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial por citometria de fluxo. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a $90 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $64 \mu\text{M}$ para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. A permeabilização da membrana mitocondrial foi avaliada pela média geométrica e pela intensidade de fluorescência da rodamina 123. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey)..... 38

Figura 23 Avaliação de nível de Ca^{2+} intracelular por citometria de fluxo. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a $90 \mu\text{g} / \text{mL}$. O tampão fosfato foi usado como controle. A intensidade da fluorescência do éster acetoximetílico foi utilizada como parâmetro e avaliada pela média geométrica. One-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey). 39

Figura 24 Porcentagem de células de câncer de pele melanoma B16F10 intactas e com lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico associado e livre a $90 \mu\text{g/mL}$ e $64 \mu\text{M}$ para AA em comparação ao controle PBS (CTL). Análise de Two-way ANOVA e pós teste Tukey (***= $p < 0,0001$). 39

Figura 25 Avaliação por coloração de Azul de tripan do número total de células de câncer de pele melanoma B16F10 após exposição por 24 horas às PENE (nanoemulsão de pequi), PENE+ AA (nanoemulsão de óleo de pequi associada a ácido anacárdico) e AA (ácido anacárdico livre). Análise de Two-way ANOVA e pós teste Tukey (***= $p < 0,0001$). 40

Figura 26 Migração de B16F10 medida pelo ensaio Scratch. As células de melanoma foram previamente tratadas com nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugada com

ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas. As imagens arranhadas foram adquiridas com 0 e 24 horas. Linhas azuis representam a área da ferida (Escala de 200 μ M). Quantificação da porcentagem de fechamento da ferida em relação ao controle medida pela Imagem J. One-way ANOVA (***) $p < 0,05$; $p < 0,001$). 41

Figura 27 Quantificação da taxa de fechamento de cicatriz em ensaio de "Scratch Assay" em células de câncer de pele melanoma murino (B16F10) após tratamento de 24 horas com nanoemulsão de óleo de pequi (PENE), nanoemulsão de óleo de pequi associada a ácido anacárdico (PENE + AA) e ácido anacárdico livre (AA). Imagens analisadas em programa de processamento de imagens Image J 41

Figura 28 Avaliação de migração por ensaio de CIM-RTCA ("Cell invasion-migration real time cell analysis") de células de câncer de pele melanoma murino (B16F10) durante e pós-tratamento com nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico em concentração de 90 μ g/mL para nanoemulsões e 64 μ M para AA. ANOVA unidirecional: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. 42

Figura 29 Avaliação de perfil de invasão por ensaio de CIM-RTCA ("Cell invasion-migration real time cell analysis") de células de câncer de pele melanoma murino (B16F10) durante e pós-tratamento com nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico em concentração de 90 μ g/mL para nanoemulsões e 64 μ M para AA. ANOVA unidirecional: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER DE PELE MELANOMA	1
1.2 PROCESSO DE METÁSTASE	3
1.3 TERAPIA COMBINATÓRIA	5
1.4 BIOCOMPOSTOS EM TERAPIA ANTITUMORAL	6
1.5 ÁCIDO ANACÁRDICO	8
1.6 ÓLEO DE PEQUI	10
1.7 NANOTECNOLOGIA	12
1.7.1 Nanoemulsões	13
2. OBJETIVOS	17
2.2 GERAL:	17
2.2 ESPECÍFICOS:	17
3. MÉTODOS	18
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	18
3.2 FORMULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA	18
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	19
3.4 CULTURA DE CÉLULAS	19
3.5 TRIPSINIZAÇÃO DAS CÉLULAS	19
3.6 PLAQUEAMENTO DE CÉLULAS	20
3.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	21
3.8 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE CELULAR – “ <i>SCRATCH ASSAY</i> ”	22
3.9 “REAL-TIME CELL ANALYSIS” (RTCA)	23
3.9.1 Ensaio de adesão e proliferação celular	23
3.9.2 Ensaio de migração	23
3.9.3 Ensaio de invasão	24
3.10 ENSAIO DE CLONOGENICIDADE	24
3.11 CITOMETRIA DE FLUXO	25
3.11.1 Potencial da membrana mitocondrial e aspectos morfológicos das células	25

3.11.2	Permeabilização da membrana lisossômica.....	26
3.11.3	Nível de espécies reativas de oxigênio	26
3.11.4	Determinação do nível intracelular de Ca ²⁺ +	26
3.12	ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN	27
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS DE PEQUI E ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDO ANACÁRDICO	28
4.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT).....	29
4.2.1	Avaliação da citotoxicidade de ácido anacárdico (15:0) e determinação do valor de IC ₅₀ em linhagem de câncer de pele melanoma murino (B16F10).	29
4.2.2	Avaliação da citotoxicidade de ácido anacárdico (15:0) em combinação com nanoemulsão de óleo de pequi e determinação do valor de IC ₅₀ em linhagem B16F10...30	
4.3	PERFIL DE PROLIFERAÇÃO E ADESÃO CELULAR	32
4.4	ENSAIO DE CLONOGENICIDADE.....	33
4.5	CITOMETRIA DE FLUXO	34
4.5.1	Morfologia celular	34
4.5.2	Permeabilização da membrana lisossômica.....	36
4.5.3	Espécies reativas de oxigênio intracelulares.....	37
4.5.4	Potencial de membrana mitocondrial	37
4.5.5	Determinação do nível intracelular de Ca ²⁺	38
4.6	ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN	39
4.7	AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR DE CÂNCER DE PELE MELANOMA POR ENSAIO DE “ <i>SCRATCH ASSAY</i> ”.	40
4.8	"CELL INVASION-MIGRATION REAL TIME CELL ANALYSIS" (CIM- RTCA).....	42
4.8.1	Ensaio de migração por RTCA.....	42
4.8.2	Ensaio de invasão por RTCA.....	43
5.	DISCUSSÃO	45

6. CONCLUSÕES	56
7. PERSPECTIVAS.....	58
6- REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE PELE MELANOMA

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pela mutação genética em diferentes mecanismos celulares que levam as células a apresentarem perfil de crescimento e proliferação distintos de células normais. Os produtos de mutações celulares que diferenciam as células normais das células tumorais são a resistência a morte celular, a sinalização de proliferação celular intermitente, a evasão de supressores de crescimento, a indução de angiogênese, a permissão de imortalidade replicativa e a ativação de invasão e metástase. Estas características, ou simplesmente marcas-registradas do câncer, são chamados de “*hallmarks of cancer*” propostas por Hanahan e Weinberg¹ (Figura 1).

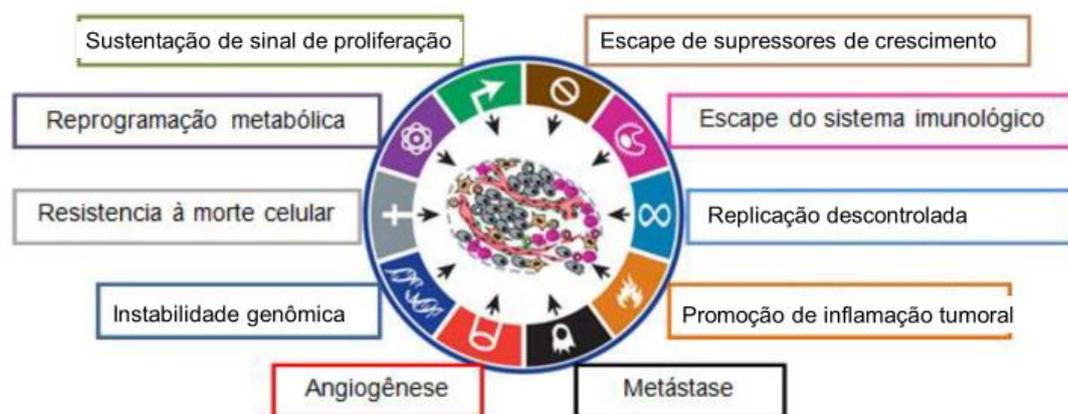


Figura 1 "Hallmarks of cancer", representação das principais características das células cancerosas. Adaptado de: Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74.

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no mundo, apresentando risco igual a 80,12 casos novos a cada 100 mil homens e 86,65 casos novos a cada 100 mil mulheres². O melanoma é um subtipo de câncer de pele que representa apenas 1% dos casos de câncer de pele, no entanto corresponde a 60% das mortes por câncer de pele³. O melanoma é o subtipo mais agressivo dos cânceres de pele, pois apresenta grande capacidade de metástase e perfil de resistência a multi-drogas⁴.

A estimativa da Organização Mundial da Saúde câncer de pele melanoma é de aproximadamente 132.000 casos por ano. A exposição à radiação ultravioleta é responsável

pelo aumento dos casos, tratando-se de um dos principais fatores de risco. Além disso, acredita-se que a diminuição da camada de ozônio poderá proporcionar uma maior exposição à raios ultravioletas e, conseqüentemente, aumentar o número de casos de câncer de pele melanoma⁵.

O melanoma surge nos melanócitos, células produtoras de melanina (pigmento da pele) e originárias da crista neural. A melanina é uma molécula protetora dos queratinócitos contra o dano de DNA causados por raios ultravioleta absorvendo e dispersando-os. A incidência de raios ultravioleta e o dano causado aos queratinócitos influencia diretamente a produção de melanina⁶.

Os principais tratamentos aplicados no melanoma em fase precoce são a remoção do tumor por cirurgia e a quimioterapia. Ambos os tratamentos apresentam diversos efeitos adversos como risco de permanência de células remanescente que iniciam metástase; alopecia, distúrbios gastrointestinais, infertilidade entre outros. A dacabazina, IL-2 e agentes imunogênicos apresentam eficácia de 10-16% dos casos e são os principais quimioterápicos no tratamento do melanoma^{4,7}.

Durante o desenvolvimento do tumor maligno existem alguns pontos críticos que podem ser alvos de agentes terapêuticos quimiopreventivos. "Quimioprevenção" geralmente refere-se ao uso de agentes farmacológicos ou naturais (também conhecidos como agentes quimiopreventivos que inibem a iniciação, promoção e progressão do câncer⁸.

O primeiro estágio, na iniciação do tumor, ocorre dano ao DNA, estresse oxidativo, inflamação, e alterações epigenéticas associados à exposição de agentes cancerígenos às células (Figura 2). Os agentes cancerígenos associados ao câncer de pele geralmente são produtos químicos, temperatura, agentes patógenos e principalmente radiação ultravioleta. A segunda etapa, denominada promoção do câncer é uma fase longa associada à proliferação de células cancerígenas, formando o tumor primário onde se observa expressão de oncogenes e de genes promotores de tumor, além da repressão de genes supressores de tumor. O terceiro estágio, a progressão tumoral, é caracterizada pelo crescimento, metástase e invasão do tumor nas células circundantes, onde há expressão de genes promotores de invasão, metástase e angiogênese .

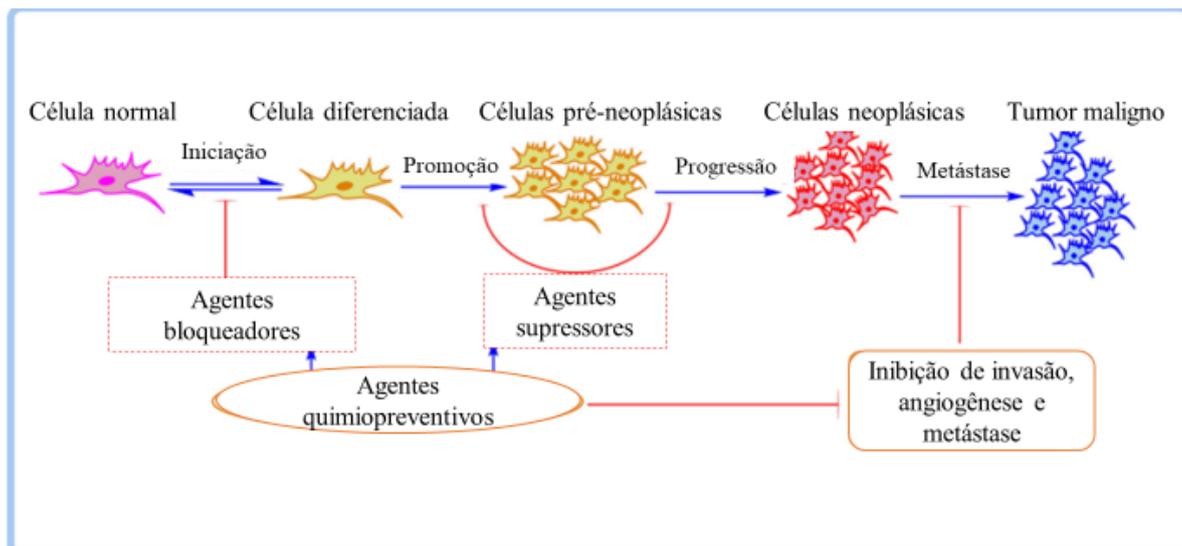


Figura 2 Fases de desenvolvimento de tumor maligno e potenciais locais de ação. Adaptado de: Iqbal J, Abbasi BA, Ahmad R, Batool R, Mahmood T, Ali B, et al. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Jan;109(June 2018):1381–93.

A resistência das células tumorais aos quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma vem sendo mais relatada. Resultante de alteração de mecanismos celulares, a resistência a quimioterápicos apresentam modificação na via de morte celular por apoptose e em algumas moléculas pró-apoptóticas; além de aumento no número de bombas de efluxo de fármacos reduzindo a concentração do quimioterápico na célula. Fatores intrínsecos aos medicamentos antineoplásico tais como biodisponibilidade, distribuição e metabolismo também estão relacionados com resistência a quimioterápicos^{7,9}.

Diante das dificuldades encontradas no tratamento convencional empregado para o tratamento do câncer de pele melanoma, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para essa patologia se tornou uma necessidade.

1.2 PROCESSO DE METÁSTASE

Uma das principais características da letalidade do câncer de pele melanoma é a capacidade de metástase, sendo responsável por 90% das mortes por câncer¹⁰. A metástase é a habilidade de invasão e colonização em outros tecidos por células cancerosas. O processo de metástase é complexo e depende de vários processos tais como perda da adesão célula-célula, modificação das matrizes extracelulares e aumento da motilidade celular. Para tal fim, estas células alteram sua morfologia e moléculas de

adesão, alcançam corrente sanguínea e vasos linfáticos e escapam de mecanismos do sistema imunitário. Quando chegam aos chamados órgãos-alvo se extravasam dos vasos e se proliferam no local, dando origem a um tumor, denominado de metástase ⁴. (Figura 3)

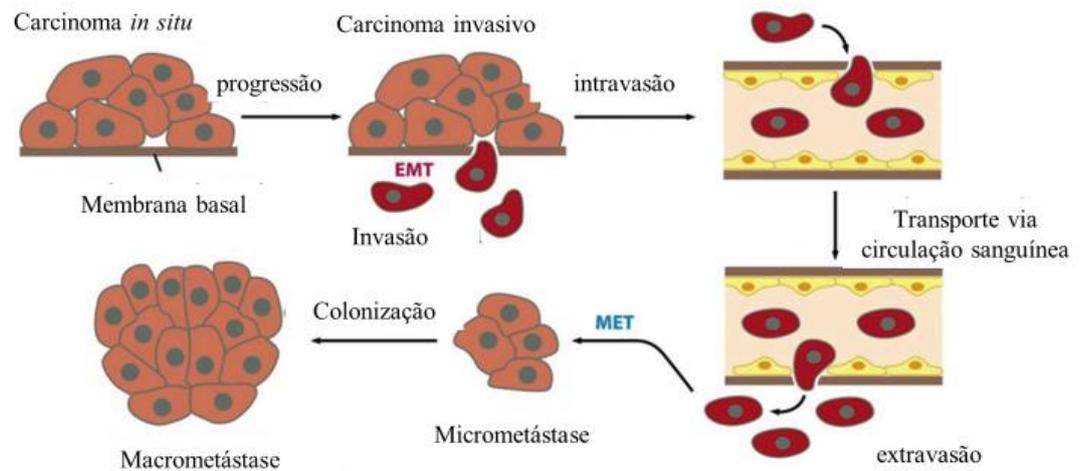


Figura 3 Processo de metástase e invasão de células cancerosas. Adaptado de: Labbé D. Les flavonoïdes d'origine alimentaire et le cancer: inhibition de l'angiogénèse tumorale et du potentiel invasif des médulloblastomes. 2008;148

A organização das camadas das células epiteliais em tecidos normais é incompatível com a mobilidade e a invasividade apresentadas por células de carcinoma¹¹. Para que ocorra os processos de metástase as células precisam adquirir um fenótipo de células mesenquimais, ou seja, indiferenciadas. A diferenciação de fenótipo epitelial para mesenquimal é denominada de transição epitélio-mesenquimal (TEM), e o caminho inverso é denominada transição mesenquimal-epitelial (TME), ambos os processos são essenciais para a formação do embrião e dos sistemas nas fases embrionárias, mas também para o processo de metástase de carcinomas¹².

Uma característica da TME é a perda da E-caderina, molécula responsável pela adesão célula-célula e célula-matriz extracelular que ao ser perdida ativa liberação de β -catenina que por sua vez, induz expressão de genes promotores de invasão e inibição de invasão¹³.

No caso do câncer de pele melanoma, o perfil metastático é resultante de mutações somáticas em sinalizações intracelulares, principalmente nos genes BRAF e NRAS que ativam a via de MAPK. Outros genes também estão envolvidos com esse processo tais como TWIST e SLUG que reprime a expressão de E-caderina⁴. Os principais órgãos-alvo de metástase para o melanoma são ossos, pulmões, linfa e cérebro¹⁴.

1.3 TERAPIA COMBINATÓRIA

Com os diversos benefícios de produtos naturais encontrados em nossa biodiversidade pode-se tratar o câncer em uma nova forma com a terapia combinatória, onde se utiliza dois ou mais compostos com alvos de ação diferentes. Por se tratar de uma doença complexa, onde os tumores são formados por tipos celulares diferentes e com interações intercelulares, acontecem casos de multi-resistência a quimioterápicos que não são específicos para células tumorais¹⁵.

Essa heterogeneidade entre células cancerígenas individuais muitas vezes limita a eficácia de um único medicamento anticâncer para erradicar completamente o tumor. Uma abordagem para superar a resistência à terapia é combinando vários medicamentos.. Tais abordagens foram comprovadamente bem-sucedidas em células de cultura e na clínica ¹⁶.

Como o câncer é o processo de vários estágios, é necessária uma abordagem com múltiplos objetivos, o que seria possível quando usada terapia combinatória com fármacos disponíveis ou compostos moduladores epigenéticos ¹⁵.

A terapia combinatória tem o objetivo de combinar compostos diferentes que consigam atingir maior grupo de células tumorais, reduzindo a dose de medicamento aplicado e eventuais efeitos adversos, utilizando-se de sinergismo entre fármacos em diferentes alvos celulares de forma simultânea.¹⁷

Alguns pontos são críticos para o desenho de terapia combinatória tais como a compreensão das alterações nos estados celulares após cada medicamento, dinâmica das moléculas de sinalização para avaliar as alterações nos estados celulares, adaptação da

sinalização devido ao controle de feedback que pode ser contida por combinação de dois compostos, entre outros ¹⁶.

Na clínica já são utilizados protocolos de terapia combinatória entre fármacos em comercialização, por exemplo, 5-fluorouracil (5-FU) e a leucovorina com irinotecano ou oxaliplatina são utilizados no tratamento de pacientes com câncer colorretal¹⁸. Apesar de se utilizar e estudar possíveis terapias combinatórias, ainda existe a crescente resistência ao tratamento, a reincidência da doença e efeitos colaterais dos medicamentos utilizados clinicamente na terapia do câncer¹⁹.

Numerosos componentes de denominados coletivamente fitoquímicos, biocompostos ou bioativos estão sendo cada vez mais relatados na literatura com atividades benéficas a saúde e esses compostos são agora amplamente reconhecidos como potenciais compostos terapêuticos. De fato, substâncias derivadas de produtos naturais, especialmente compostos polifenólicos com muito pouco efeito tóxico em células normais, têm se demonstrado agentes terapêuticos em potencial na oncologia devido às suas atividades quimiopreventivas, antitumorais, radiosensibilizantes e quimiossensibilizadoras contra vários tipos de cânceres agressivos e recorrentes¹⁹.

1.4 BIOCÓMPOSTOS EM TERAPIA ANTITUMORAL

Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura das Nações Unidas (FAO/ONU), cerca de 50.000 espécies de plantas comestíveis estão disponíveis em todo o mundo; no entanto, 90% das demandas de energia dos seres humanos são supridas por apenas 15 espécies, especialmente arroz, milho e trigo. O Brasil é responsável por 18% de toda a biodiversidade vegetal no planeta²⁰.

Nos últimos tempos a pesquisa utilizando produtos derivados de planta para o tratamento de câncer tem aumentado, sendo inúmeros trabalhos relacionando atividade antiproliferativa, antimetastática, pró-apoptótica e reguladora de ciclo celular. Biocompostos regulam ou inibem a expressão de diferentes proteínas, enzimas e vias de sinalização para prevenir ou tratar o câncer de pele ⁸.

Alguns quimioterápicos já amplamente utilizados são derivados de plantas tais como vincristina, vinblastina, taxol, camptotecina²¹. Vários outros compostos derivados de plantas estão sendo avaliados em estudos clínicos como *Allium sativum* (alho), camptotecina, curcumina, chá verde, *Panax ginseng* (ginseng), resveratrol, *Rhus verniciflua* (laca-japonesa), *Viscum álbum* (visgo)²².

Em estudo detectou-se 51 compostos fenólicos (entre flavonóides e ácidos fenólicos), 8 iridoides, 23 carotenóides e 2 antocianinas em nove frutos da biodiversidade brasileira, dentre eles o pequi com maior nível de carotenóides. Isso mostra um excelente recurso com potencial tecnológico e econômico ainda inexplorado nos frutos da biodiversidade brasileira, principalmente para os setores nutricional e farmacêutico²⁰.

A viabilidade das células A375 e B16F10 (câncer de pele melanoma humano e murino, respectivamente) foram diminuídas quando tratadas com os polifenóis de chá numa resposta dose-dependente. suprimindo a expressão de TLR4 em células de melanoma em dose-dependência também. A taxa de migração e invasão das células de melanoma foi diminuída²³. Em outro estudo, o óleo de café diminui a expressão de p53, p21, ciclina B e ciclina A e CDK1 e CDK2 em células de melanoma diminuindo a viabilidade celular e ativando a via de apoptose por caspases 3 e 8²⁴.

Um ponto limitante da aplicabilidade dos fitoquímicos é a baixa biodisponibilidade de alguns compostos. Por exemplo, a curcumina que mostra baixa biodisponibilidade em estudos anteriores. Para melhorar isso, nanotecnologia, lipossomas, micelas, vários materiais de revestimento e complexos fosfolipídicos foram aplicados para aumentar sua solubilidade em água e melhorar sua biodisponibilidade²⁵.

Frente à variedade da biodiversidade brasileira e potenciais biocompostos de interesse a serem explorados, estudos são necessários para descobertas de novas fontes de tratamentos, diagnósticos e prevenção de doenças como o câncer. Alguns óleos derivados de plantas da biodiversidade brasileira possuem efeitos biológicos detalhados em estudos.

Em estudo o açaí foi eficaz na inibição da carcinogênese da bexiga urinária, reduzindo o dano ao DNA e reduzindo a expressão do p63 e do antígeno nuclear de proliferação celular PCNA²⁶. No estudo utilizando nanoemulsões de óleo de açaí combinadas com terapia fotodinâmica foi observada diminuição da viabilidade celular de linhagem de melanoma B16F10 (*in vitro*); e do tamanho do tumor *in vivo*²⁷.

O óleo de buriti apresenta compostos com potenciais antioxidante, quimiopreventivos, antiplaquetárias e anti-trombogênicas, antimicrobianas, entre outras atividades²⁸.

A ação antitumoral de diferentes compostos do extrato de buriti foram capazes de reduzir a viabilidade celular de câncer de mama, carcinoma coloretal e leucemia²⁹. Em trabalho realizado observou-se que o óleo de buriti nanoestruturado apresentou redução da viabilidade celular de células de câncer de mama³⁰.

Dentro desse contexto, os compostos naturais: o óleo de pequi além do ácido anacárdico foram investigados nesse estudo quanto à atividade anticâncer e antimetástase desses compostos. Informações a seguir sobre os compostos citados estão nas seções a seguir.

1.5 ÁCIDO ANACÁRDICO

O caju é um fruto da espécie *Anacardium occidentale L.* dividido em duas partes: a castanha (verdadeiro fruto) e o pedúnculo (pseudofruto) (Figura 4). Nas cascas da castanha de caju possui um líquido escuro e viscoso denominado líquido da casca da castanha do caju (LCCC)³¹.



Figura 4 Partes do fruto do caju (*Anacardium occidentale L.*) e da castanha. Adaptado de: 1. Nasrollahzadeh M, Sajjadi M, Sajadi SM, Issaabadi Z. Green Nanotechnology. In: Interface Science and Technology [Internet]. 1st ed. Elsevier Ltd.; 2019. p. 145–98

Ácido anacárdico (ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico) é o composto majoritário, cerca de 60-65% do líquido da casca da castanha do caju (LCCC). Formado por um grupo alifático (saturado ou insaturado) e outro aromático tendo uma estrutura lipídio fenólico. (Figura 5)

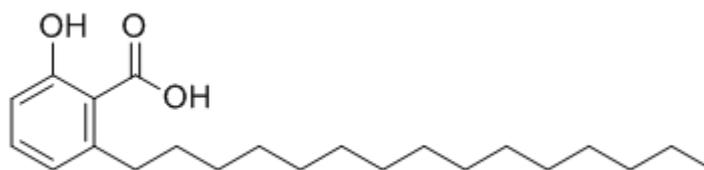


Figura 5 Estrutura química de ácido anacárdico (ácido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzóico) 15:0. Fonte: https://www.chemsrc.com/en/cas/16611-84-0_1109645.html

A casca da castanha de caju não apresentavam valor econômico, mas últimas descobertas tem apresentado atividades biológicas como antitumoral, gastroprotetora e antibiótica para o ácido anacárdico. Sua ação antitumoral comprovada em linhagens de leucemia mieloblástica aguda, câncer de mama e câncer de colo de útero, foi explicada por sua ação inibitória da histona acetiltransferase p300^{32,33}.

O ácido anacárdico induziu apoptose de células de câncer de próstata por processo de autofagia e estresse oxidativo e pelas vias de sinalização DAPK3 e Akt³⁴. Em outro estudo, o ácido anacárdico induziu uma mudança genética que acarreta inibição da produção de ácidos graxos monossaturados e aumenta estresse do retículo endoplasmático em células de câncer de mama³⁵.

AA se mostrou um composto em potencial para uso em materiais nanométricos. A formulação lipossomal de mitoxantrona e ácido anacárdico aumentou a citotoxicidade de mitoxantrona quando comparado ao fármaco sozinho. O ácido ascórbico foi utilizado na formulação para proteger as células normais e este efeito foi comprovado, diminuindo o efeito da mitoxantrona nessas células³⁶. O modelo de carreamento conjugado de gemcitabine e docetaxel com ácido anacárdico proporcionou uma liberação sustentada e internalização celular com localização nuclear dos fármacos. Esse modelo diminuiu significativamente o IC₅₀ dos fármacos³⁷.

O ácido anacárdico também apresentou ação anti-metastática em linhagem U-87 de glioblastoma, através da supressão da via VEGF na transição eptélio-mesenquimal³⁸. Apesar da promissora atividade antitumoral

1.6 ÓLEO DE PEQUI

Pequi é um fruto da espécie *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*) do Cerrado brasileiro (Figura 9). A árvore é conhecida por ser resistente a longos períodos de seca e solos de baixa fertilidade³⁹. Culturalmente o fruto é utilizado na gastronomia regional, mas seu óleo tem mostrado potencial em aplicações biológicas.

A amêndoa Pequi apresenta alta energia, lipídios, proteínas e conteúdo de fibra alimentar, enquanto o óleo de pequi (polpa e amêndoa) apresenta altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados, especialmente o ácido oleico. A casca do pequi (exocarpo e mesocarpo externo) é o maior componente da fruta e um sólido resíduo do processamento do pequi, que é rico em fibras e compostos fenólicos⁴⁰.

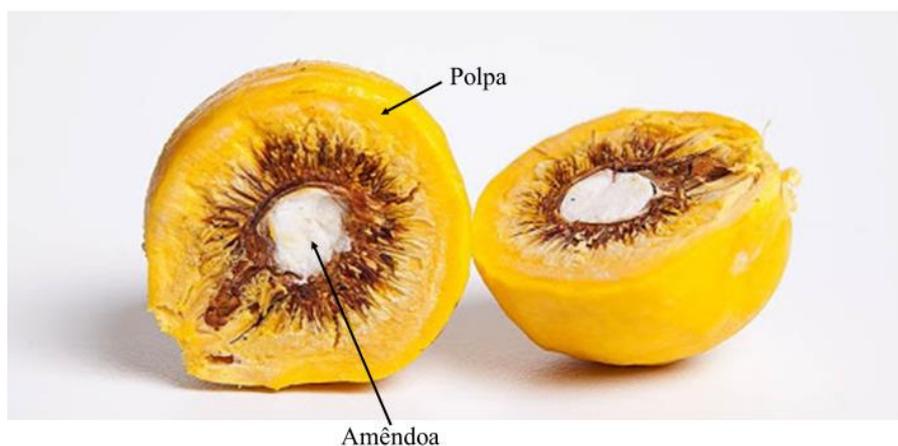


Figura 6 Fruto de pequi *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*). Adaptado de: <http://supernutricao.com.br/2018/01/24/pequi-para-que-serve-beneficios/>

O óleo de pequi é composto predominantemente por ácidos graxos insaturados, sendo estes 52,17% do óleo da amêndoa e 61,35% do óleo da polpa. Há diferença entre a composição dos óleos da polpa e da amêndoa, o ácido graxo em maior concentração na polpa, com 55,87%, é o ácido oleico sendo seguido pelo ácido palmítico (35,17%). Na amêndoa, no entanto, as quantidades de ácido oleico e palmítico são 43,76% e 43,59%, respectivamente. Outros ácidos graxos presentes nos óleos são o ácido linoleico, esteárico e palmitoléico⁴¹.

Estudo de Oliveira e colaboradores (2017) indicou que o óleo de pequi foi capaz de melhorar a função cardíaca *ex vivo* de ratos, aumentando o relaxamento e a contratilidade cardíacos, apesar de não haver alterações significativas nos fatores de risco cardiovascular sistêmicos. A maior disponibilidade de lipídios associada ao maior teor de ácidos oleico e palmítico e carotenóides fornecidos pela dieta com óleo de pequi pode estar relacionada, pelo menos em parte, a esses achados⁴².

O óleo de pequi não teve efeitos genotóxicos ou clastogênicos e aumentou significativamente os linfócitos e diminuiu os neutrófilos e monócitos nas fêmeas de 11 a 12 meses, removendo as diferenças significativas observadas entre os controles de 6 a 7 e 11 a 12 meses. Os resultados sugeriram que a suplementação com óleo de pequi pode proteger contra anemia, inflamação e estresse oxidativo relacionados ao envelhecimento, ajudando a prevenir doenças degenerativas crônicas relacionadas ao envelhecimento, principalmente para mulheres⁴³.

A suplementação com óleo de pequi teve efeito protetor nas células hepáticas contra os danos causados pelos radicais livres de oxigênio durante os exercícios exaustivos, conforme exposto pelo indicador de peroxidação lipídica. A suplementação com óleo de pequi teve efeito protetor nas células hepáticas contra os danos causados pelos radicais livres de oxigênio durante os exercícios exaustivos, conforme mostrado pelo indicador de peroxidação lipídica⁴⁴.

O óleo de amêndoa do pequi, especialmente o óleo prensado a frio, atenuou as alterações induzidas por CCl₄ no tecido sérico e hepático em ratos devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias⁴⁵.

A suplementação prévia com óleo de pequi ou seu extrato (60 dias) reduziu significativamente o estresse oxidativo induzido pelo uretano. Um efeito protetor contra danos no DNA foi associado à modulação da peroxidação lipídica e à baixa expressão proteica e gênica da óxido nítrico sintase. Esses achados sugerem que o consumo de pequi pode proteger contra a genotoxicidade *in vivo* e o estresse oxidativo¹⁴.

O óleo de pequi resultou em efeitos anti-inflamatórios e reduziu o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade na faixa etária acima de 45 anos, principalmente para homens. Os resultados mostraram uma tendência geral de redução da pressão arterial, sugerindo que o óleo de pequi pode ter um efeito hipotensor⁴⁵.

1.7 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a ciência multidisciplinar que se refere ao estudo de instrumentos que são ou possuem componentes essenciais na faixa dimensional de 1 a 1.000 nm (ou seja, do tamanho de alguns átomos ao tamanho subcelular)⁴⁶. A modulação de materiais em escala nanométricas alteram as propriedades físico-químicas dos compostos, além da farmacologia de fármacos aplicados.

A nanotecnologia não é estranha à clínica; mais de 40 nanoterapêuticos chegaram a pacientes, incluindo drogas anticâncer e agentes de imagem⁴⁷, por exemplo, doxorubicina lipossômica, paclitaxel com albumina Abraxane[®] 48. Os lipossomas são exemplos iniciais de nanoterapêuticos para câncer e os agentes de contraste por ressonância magnética direcionados à nanoescala ilustram a aplicação da nanotecnologia ao diagnóstico que já chegaram à clínica⁴⁹.

A utilização de carreadores em escala nanométricas para agentes terapêuticos em câncer alteram a farmacocinética de compostos utilizando-se do fenômeno chamado EPR (*enhanced permeability and retention*), ou seja, a capacidade aumentada de permeação e retenção de moléculas no tumor⁵⁰. No ambiente tumoral o processo de angiogênese é irregular, devido ao ambiente de hipóxia que resulta em secreção de fatores de crescimento, formando fenestras nos vasos sanguíneos que permitem a permeação de macromoléculas e nanocarreadores. As fenestras resultantes nos capilares podem atingir tamanhos variando de 200 a 2000 nm, dependendo do tipo de tumor e sua localização⁵¹.

Na terapia do câncer, as nanopartículas mediam a administração controlada de medicamentos, aumentando a eficácia de um medicamento contra o câncer e diminuindo o efeito colateral do medicamento. Esses nanomateriais são usados como um veículo que pode facilmente atravessar muitas barreiras biológicas⁵².

Diz-se que os nanossistemas têm quatro propriedades únicas que os distinguem de outras terapêuticas contra o câncer: podem possuir propriedades terapêuticas ou de diagnóstico e podem ser projetados para transportar uma grande "carga útil" terapêutica; podem ter ligantes de direcionamento multivalentes, que produzem alta afinidade e especificidade para as células alvo; podem carrear múltiplas moléculas de medicamentos

que permitem a terapia combinatória do câncer e podem esquivar-se dos mecanismos tradicionais de resistência aos medicamentos⁵¹.

Nanossistemas ou nanopartículas compreende uma grande variedade de estruturas em escala nanométrica. Na figura 10 estão representadas as principais formas e estruturas dos nanossistemas utilizados em terapia e diagnóstico de câncer. Tendo como parâmetro a composição de nanopartículas, estas podem ser divididas genericamente em nanopartículas orgânicas (polímeros, lipídios, dendrímeros, proteínas, nanoemulsão) ou inorgânicas (quantum dots, nanotubos de carbono, nanopartícula metálica, etc). As propriedades físico-químicas das nanopartículas determinam seu comportamento *in vitro* e *in vivo*, o que significa que elas podem ser projetadas para superar as barreiras do corpo e atingir efetivamente o local da doença⁵³.

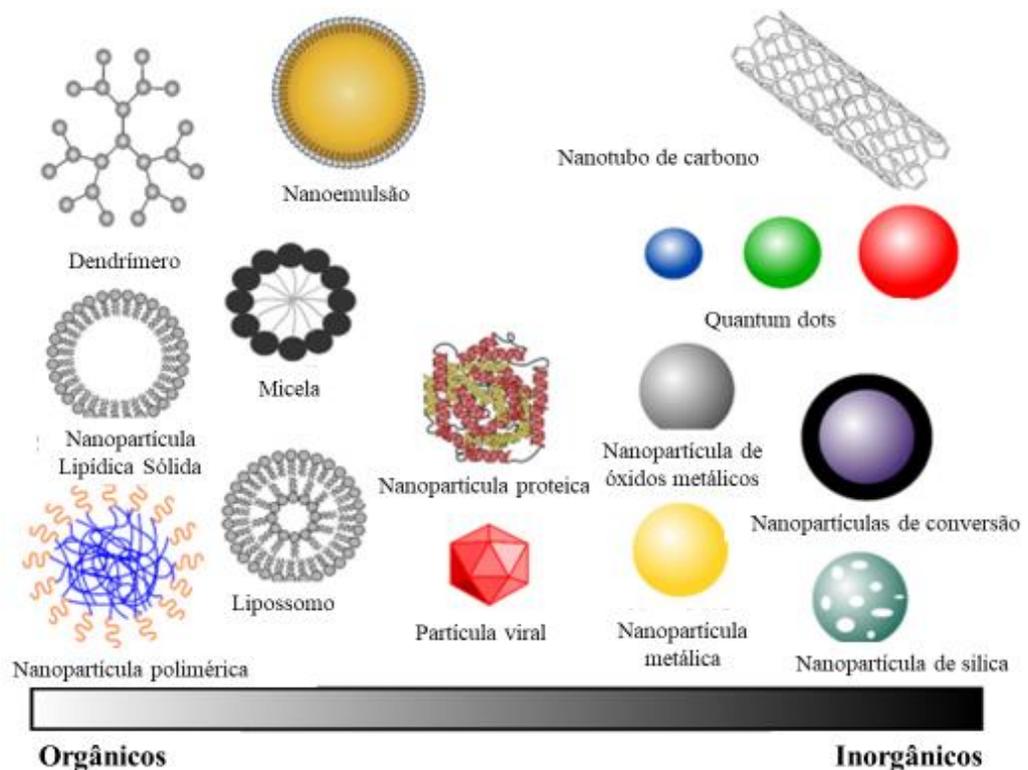


Figura 7 Principais nanossistemas utilizados na terapia e diagnóstico do câncer. Adaptada de: Cryer AM, Thorley AJ. Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2019 Jun;198:189–205.

1.7.1 Nanoemulsões

Nanoemulsão é definida como um sistema coloidal de dois líquidos imiscíveis, uma dispersão termodinamicamente instável onde um dos líquidos está disperso em forma de gotículas em outro líquido (Figura 11)¹⁷.

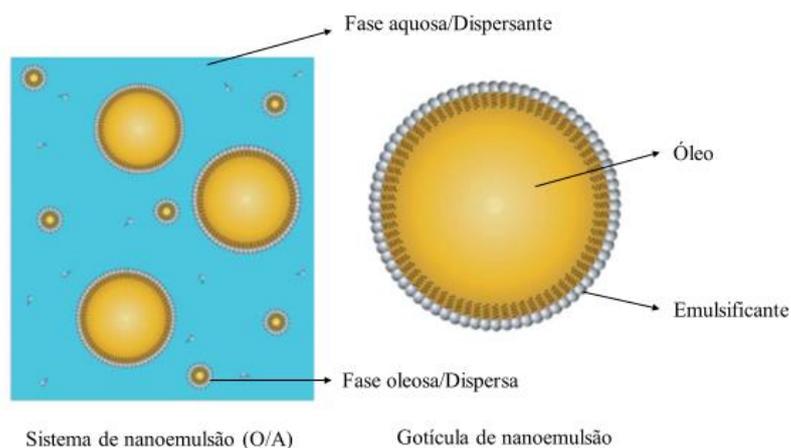


Figura 8 Representação esquemática de nanoemulsões óleo em água (O/A). Adaptado de: McClements DJ. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. *Ther Deliv* [Internet]. 2013 Jul;4(7):841–57.

Apesar de ser termodinamicamente instável, ou seja, possuir energia livre maior do que as fases (óleo e água) separadamente, e assim tender a retornar ao estado de menor energia, as nanoemulsões são cineticamente estáveis⁵⁴. No entanto, uma nanoemulsão pode ser cineticamente estável e permanecer assim por um longo período sem separação de fases devido às forças repulsivas esteáricas ou eletrostáticas entre as partículas⁵⁵

As nanoemulsões são um tipo de nanossistemas formados por três componentes principais: uma fase hidrofílica onde pode estar dispersa constituintes hidrossolúveis, uma fase oleosa ou hidrofóbica onde se pode incorporar compostos hidrofóbicos, e um agente emulsificante, capaz de prevenir o colapso e estabilização das gotículas formadas no processo de emulsificação¹⁷. As gotículas das nanoemulsões O/A têm um núcleo hidrofóbico constituído por moléculas de óleo e uma camada hidrofílica constituída por moléculas emulsificantes. O núcleo hidrofóbico pode ser constituído por um ou mais ingrediente não polar, de modo a se adicionar compostos de interesse no núcleo hidrofóbico⁵⁶

Um emulsificante largamente utilizado por sua característica de biocompatibilidade é a lecitina. Em termos químicos, lecitina se denomina o composto sn-3-fosfatidilcolina, no entanto, em termos gerais se denomina uma mistura de fosfolipídios com glicolipídios aderentes e óleo. A fosfatidilcolina é um dos compostos anfífilos mais abundantes na membrana celular, por tal motivo é um dos emulsificantes mais seguros, apresentando baixa incidência de reações alérgicas. Sua aplicabilidade se estende em formulações cosméticas, fármacos dermatológicos, fármacos intravenosos e de uso ocular⁵⁷.

Tem-se demonstrado interesse pelo uso de nanoemulsões como sistemas de carregamento de fármacos por apresentar vantagens da utilização de nanoemulsões como veículo de bicompostos:

- Podem ser fabricados a partir de componentes reconhecidos como seguros usando operações de processamento simples;
- Podem aumentar a biodisponibilidade de bioativos lipofílicos encapsulados devido ao seu pequeno tamanho de partícula;
- Têm boa estabilidade quanto à separação e agregação gravitacional (comparadas a emulsões convencionais)⁵⁸.

Alguns compostos derivados de plantas obtiveram atividade anticâncer eficiente em formulações de nanoemulsão. Astaxanthin-alpha tocopherol nanoencapsulado se mostrou potente agente cicatrizante em ensaio “*scratch assay*” e antibactericida. As nanoemulsões também foram tóxicas em atividade dose dependente em células de câncer⁵⁴. As nanoemulsões contendo Lawsone apresentaram liberação sustentada com atividade citotóxica maior que o Lawsone livre em células de câncer de mama⁵⁹. A mitamicina C juntamente com os óleos essenciais possui maior potencial apoptótico em células de câncer do que o fármaco livre. Esse sistema de nanoemulsão provoca alterações morfológicas nas células que estava relacionadas ao processo de apoptose⁶⁰.

Mesmo diante das promissoras pesquisas utilizando nanoemulsões em tratamento do câncer e dos potenciais usos terapêuticos dos óleos da biodiversidade brasileira e do ácido anacárdico, ainda não existem trabalhos relatando a atividade citotóxica, antimetastática e efeitos em organelas em células de câncer de pele melanoma. O melanoma é o subtipo mais agressivo dos cânceres de pele, pois apresenta grande

capacidade de metástase e perfil de resistência a multi-drogas⁴. Perante as dificuldades encontradas no tratamento convencional empregado para o tratamento do câncer de pele melanoma, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para essa patologia se tornou uma necessidade.

Diante do exposto, o presente trabalho propõe estudos de efeitos terapêuticos do ácido anacárdico (AA) e dos óleos da biodiversidade brasileira, livres ou utilizando-se de nanoemulsões como carreadores para potenciais terapias adjuvantes e compostos de interesse no tratamento do câncer de pele melanoma.

2. OBJETIVOS

2.2 GERAL:

Avaliar os efeitos terapêuticos do ácido anacárdico (AA) e do óleo de pequi (OL Pe), livres ou associados a nanoemulsões, na viabilidade celular, alterações em organelas e no processo de metástase de células de melanoma *in vitro*.

2.2 ESPECÍFICOS:

(a) Caracterizar nanoemulsões de óleos de pequi quanto a aspectos macroscópicos, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta;

(b) Investigar os efeitos na viabilidade celular do ácido anacárdico e do óleo de pequi, livres ou associados a nanoemulsões em células de câncer de pele melanoma, *in vitro*;

(c) Analisar alterações em organelas de células de câncer de pele melanoma tratadas com nanoemulsões de óleo de pequi e óleo de pequi em associação a ácido anacárdico e ácido anacárdico livre, *in vitro*;

(d) Comparar os efeitos de combinações do ácido anacárdico e do óleo de pequi, livres ou associados a nanoemulsões, no processo de migração e invasão/metástase de células de câncer de pele melanoma *in vitro*;

3. MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

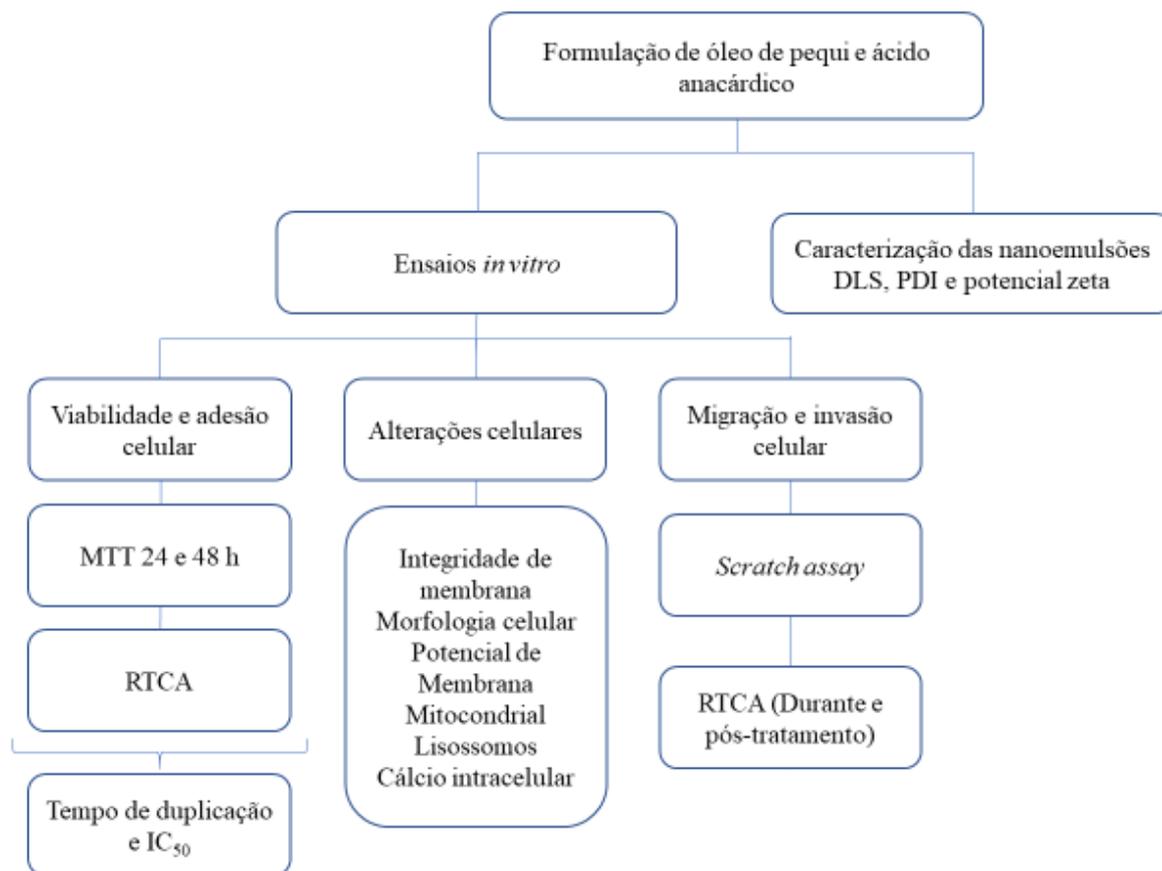


Figura 9 Fluxograma de desenho experimental

3.2 FORMULAÇÃO DAS NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Para formulação das nanoemulsões a base de óleos da biodiversidade brasileira foi utilizado método de ultrassonicação. As amostras foram feitas em duas etapas.

Primeiramente foi pesados o óleo e adicionado o ácido anacárdico (solução a 50 mM em DMSO) quando o caso, e estes foram solubilizados em etanol absoluto. DMSO foi utilizado como controle na formulação sem AA. A solução de óleo + etanol + DMSO ou AA foi transferido para balão de rotaevaporação e o etanol foi removido com auxílio de rotaevaporador em banho a 45°C por 10 minutos.

Para ressuspender o filme formado no balão, dissolveu-se lecitina de ovo (LIPOID E 80, Alemanha) em PBS 1X aquecido a 45°C em proporção de 1:2 (óleo:lecitina) e logo em seguida esta solução de lecitina-PBS foi transferida para o balão de rotaevaporação. Após retirar o filme da parede do balão ressuspendendo-o com auxílio de vórtex e banho de ultrassom, transferiu-se o conteúdo do balão para um Falcon de 50 mL.

A emulsão foi submetida a ultrasonicação (Branson Sonifier 450 Sonicator, Fisher Scientific, USA) por 3 minutos em banho de gelo, 40 % de amplitude, 20 kHz e pulso alternado, obtendo nesse processo a amostra concentrada.

A amostra concentrada foi diluída em PBS 1X (temperatura ambiente) a fim de atingir concentração em relação ao óleo de 1,44 mg/mL. Após diluição foi realizada mais uma sonicação seguindo os mesmos parâmetros anteriores.

As formulações foram armazenadas em abrigo de luz e umidade, e conservadas a temperatura de 4°C. Os ensaios *in vitro* foram realizados com amostras recém-formuladas, sendo utilizadas em até 15 dias.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Para caracterização básica das nanoemulsões foi utilizada técnica de espalhamento de luz dinâmico e movimentação eletroforética para mensuração dos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga superficial das gotículas através do equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern, UK).

3.4 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de melanoma murino B16F10 (ATCC CRL-6475) foi utilizada como modelo *in vitro*, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life, EUA) e 1% de antibiótico (Penicilina – Streptomicina, Life, EUA), e mantidas em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂.

3.5 TRIPSINIZAÇÃO DAS CÉLULAS

Para soltar as células aderentes do fundo da garrafa de cultura, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1X (Tampão PBS pH 7,2 Laborclin, Brasil) e posteriormente, 4 mL de tripsina (Tripsina 0,25%, Life, EUA) foram adicionados. As células foram incubadas por 5 minutos. Após observar por microscopia de luz que todas as células estavam soltas, 5 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. Após 3 minutos de centrifugação a 1341 g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura e utilizado nos passos descritos a seguir. Para manutenção da cultura celular foi colocado quantidade de meio necessária para cada garrafa e adicionados 100 µL de suspensão de células de modo a obedecer a proporção de 1:10.

3.6 PLAQUEAMENTO DE CÉLULAS

Para a contagem de células foram transferidos 10 µL da suspensão de células para eppendorf 50 µL e adicionados 90 µL de azul tripan para contagem em câmara de Neubauer.

Os cálculos foram feitos a partir da fórmula:

$$\text{Células: } \frac{\text{células contadas}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Foram plaqueadas **z** quantidade de células em cada poço, então:

$$\begin{array}{l} z \text{ células} \text{ ----- } 1\text{mL ou } 10^3 \mu\text{L} \\ \text{Células contadas} \text{ ----- } x \text{ mL} \end{array}$$

Z células= quantidade de céls por poço, dependendo da linhagem e do tamanho da placa.

Células = quantidade de poços x x mL

DMEM= quantidade de poços x y µL- céls

Y= quantidade de μL necessários para o plaqueamento dependendo do tamanho da placa.

Foram adicionadas as quantidades acima em um recipiente e colocados y μL em cada poço de placa de cultivo celular. Incubar por 24 horas na estufa 5% CO_2 e 37°C.

3.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular, as células de câncer de pele melanoma foram incubadas na densidade de 2000 células por poço, em placa de cultura de 96 poços. Esperou-se o tempo de 24 horas incubando a placa em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , para que as células fossem aderidas na placa de cultura. Em seguida, as células foram expostas às nanoemulsões de óleos da diversidade brasileira por um período de 24 e 48 horas. As concentrações de nanoemulsões (em relação ao óleo) e seus respectivos brancos foram as seguintes: 22,5 $\mu\text{g/mL}$; 45 $\mu\text{g/mL}$; 67,5 $\mu\text{g/mL}$; 90 $\mu\text{g/mL}$; 180 $\mu\text{g/mL}$ e 360 $\mu\text{g/mL}$. Para o tratamento de óleo livre (não- nanoestruturado) foi preparada solução de óleo diluído em etanol absoluto (Etanol Absoluto PA, J.T. Baker, México) na mesma concentração de óleo presente nas nanoemulsões, sendo a concentração de etanol por poço menor que 1%. Para os ensaios contendo ácido anacárdico, o mesmo foi ressuspendido em DMSO (Dimetilsulfóxido P.A., Dinâmica, Brasil), sendo a concentração de DMSO por poço menor que 1%.

Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol). Para tanto, o meio de cultura contendo as formulações foi descartado e as células tratadas foram expostas ao MTT (15 μL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 μL de DMEM), por período de 2 horas na estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e 100 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido P.A., Dinâmica, Brasil) foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em equipamento espectrofotômetro a 595 nm.

A partir desse ensaio foi determinada concentração de IC_{50} das amostras de tratamento e esta foi utilizada para realização dos ensaios posteriores. Os grupos de tratamento utilizados nos ensaios estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Grupos de tratamentos experimentais

Sigla	Amostra referente
CTL	DMEM e PBS 1X (pH=7)
Branco	PBS 1X (pH=7) e lecitina
DMSO	Dimetilsufóxido (1% volume do poço)
AA	Ácido anacárdico diluído em DMSO (1% volume do poço)
OL Pe	Óleo de pequi diluído em etanol (1% volume do poço)
PeNe	Nanoemulsão de óleo de pequi em PBS 1X (pH=7)
PeNe + AA	Nanoemulsão de óleo de pequi associada a ácido anacárdico em PBS 1X (pH=7)

3.8 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE CELULAR – “*SCRATCH ASSAY*”

Se realizou o ensaio de “*Scratch assay*” para verificar a capacidade das células de migrarem à ferida feita com uma ponteira de p200 na monocamada de células. Para este ensaio foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ células por poço em placa de 24 poços. Após período de incubação de 24 horas em estufa a 37°C a 5% de CO_2 , as células foram tratadas com os respectivos tratamentos nas concentrações referentes ao IC_{50} por 24 horas.

Após o tratamento, retirou-se o meio e as células foram lavadas com PBS 1x. Com o auxílio de uma ponteira de p200 um risco foi feito no fundo do poço formando uma ferida na monocamada de células. As células que se soltaram neste processo foram removidas com a lavagem com PBS 1x. Meio com 1% de soro fetal bovino foi adicionado a cada poço e as fotos do tempo 0h foram tiradas em microscópio de luz invertida EVOS Las EZ. Após 24 horas o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x novamente e levadas ao microscópio para avaliação da migração celular e captura de imagens de 24 horas.

As imagens foram analisadas em software Image J 1.X (Wayne Rasband, NIMH, NIH, EUA) para mensuração da área de migração, considerando a área livre sem presença de células. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A redução percentual da área da ferida foi determinada a partir da fórmula:

$$\text{Porcentagem de fechamento da ferida} = \frac{(\text{área final} - \text{área inicial})}{\text{área inicial}} \times 100\%$$

A redução percentual da área da ferida em relação ao controle foi determinada a partir da fórmula:

$$\text{Porcentagem em relação ao controle} = \frac{\text{porcentagem do fechamento}}{\text{porcentagem do controle}} \times 100\%$$

3.9 “REAL-TIME CELL ANALYSIS” (RTCA)

3.9.1 Ensaio de adesão e proliferação celular

As células foram tripsinizadas e plaqueadas em placa E-plate 16 (ACEA Biosciences Inc., EUA) em densidade de 5000 células/poço e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ tendo o “*cell index*” medido a cada 15 minutos. Passado esse período, o experimento foi pausado no software, os tratamentos com valor de IC₅₀ foi adicionado aos poços e novamente as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ tendo o “*cell index*” medido a cada 15 minutos por 48 horas. Os tempos de duplicação foram calculados por linha de tendência exponencial da curva.

3.9.2 Ensaio de migração

Para o experimento de pós-tratamento, as células foram tripsinizadas conforme mencionado acima, e plaqueadas em placa de 12 poços em densidade de 1,5 x 10⁵ células por poço. Após 24 horas de incubação, as células receberam o tratamento em concentração referente ao IC₅₀ durante 24 horas. Após tempo de modulação do tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas, centrifugadas e contadas por grupos separadamente.

As células foram coradas com azul de tripan e somente as células consideradas viáveis foram plaqueadas em placas de RTCA “*CIM -plate*” (ACEA Biosciences Inc., EUA) na densidade de 5 x 10⁴ células por poço. Como quimioatrativo na câmara inferior

foi utilizado meio com 10% de soro fetal bovino, enquanto as células foram plaqueadas com meio 1% e mantidas em redução de soro. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ tendo o “*cell index*” medido a cada 15 minutos e foi considerado como a taxa de migração em tempo real.

Para o experimento durante o tratamento, as células foram ressuspensas em meio com 1% de soro fetal bovino e o tratamento na concentração de IC₅₀. O restante do experimento se seguiu conforme mencionado anteriormente.

3.9.3 Ensaio de invasão

Os ensaios de invasão foram realizados igualmente aos ensaios de migração, contudo, os poços superiores da placa “*CIM -plate*” (ACEA Biosciences Inc., EUA) foram cobertos com 50 µL de matriz matrigel (800 µg/mL) (Corning Life Sciences, EUA) em meio sem soro. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ por 4 horas para que a matriz ficasse firme. Após esse período, o experimento se seguiu como o de migração.

3.10 ENSAIO DE CLONOGENICIDADE

A fim de mensurar a capacidade das células formarem colônias após serem tratadas com as nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico e o mesmo livre, foi realizado o ensaio de clonogenicidade. Este ensaio consiste em detectar a capacidade das células formarem colônias após determinado tratamento. Para tanto, foram plaqueadas placa de 12 poços com densidade celular de 25 x 10³ células por poço. Após período de incubação para células aderirem, o meio foi substituído por meio com tratamento em concentração igual ao IC₅₀ e as células foram incubadas por 24 horas.

Após período de incubação do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e tripsinizadas e as células viáveis foram plaqueadas novamente em placas de 6 poços em densidade de 1 x 10³ células por poço. As células foram incubadas em estufa de 5 % de CO₂ a 37 °C por 4 dias sem troca de meio.

Em seguida as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com metanol gelado por 5 minutos e coradas com cristal violeta 0,5% (25% metanol + 75% água destilada) por 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada para retirar excesso de

corante; levadas ao estereomicroscópio (Leica EZ4 HD, Alemanha) para a contagem de células e determinadas a formação de colônia, consideradas quando o número de células for superior a 50.

A taxa de eficiência de plaqueamento (EP) foi calculada a partir do controle pela equação:

$$\text{Eficiência de plaqueamento} = \frac{\text{número de colônias formadas}}{\text{número de células plaqueadas}} / 100$$

Para a fração de sobrevivência (FS) foi utilizado:

$$\text{Fração de sobrevivência} = \frac{\text{número de colônias formadas}}{\text{número de células plaqueadas}} \times \text{EP}$$

3.11 CITOMETRIA DE FLUXO

Para os ensaios de citometria de fluxo descritos abaixo, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços com quantidade de 5×10^4 células por poço e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C umidificada com 5 % de CO_2 . As células foram tratadas com a concentração de IC50 de PENE, PENE+AA e AA por 24 horas. O tampão PBS 1x foi utilizado como controle negativo, enquanto o peróxido de hidrogênio como controle positivo. Após período de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos.

3.11.1 Potencial da membrana mitocondrial e aspectos morfológicos das células

A análise do potencial da membrana mitocondrial foi realizada para avaliar o mecanismo associado à apoptose, usando Rhodamine 123, uma sonda fluorescente catiônica capaz de se acumular especificamente nas mitocôndrias devido ao potencial transmembranar negativo dessa organela nas células vivas (Carvalho et al., 2015; Ronot Benel, Adolphe e Mounolou, 1986). Para esta análise após a tripsinização, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X por centrifugação e 300 μL de Rhodamine 123 (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ em PBS 1x, Thermo Fisher, EUA) foram adicionados a cada amostra e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X por centrifugação e analisadas utilizando citômetro de fluxo (BD FACSVerse TM, EUA). Um total de 10.000 eventos

foram analisados por amostra. Os parâmetros relacionados ao tamanho e granularidade das células tratadas foram obtidos por citometria de fluxo (BD FACSVersé TM, EUA), utilizando os canais FSC e SSC, respectivamente. Um total de 10.000 eventos foram analisados por amostra.

3.11.2 Permeabilização da membrana lisossômica

O laranja de acridina (LA) é um fluorocromo metacromático lisossoma-trópico. Quando excitado com luz azul, o LA emite fluorescência vermelha em altas concentrações quando presente nos lisossomos (Boya e Kroemer, 2008). As células foram expostas a 50 μ M de LA por 30 minutos protegidos da luz à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, a permeabilização da membrana lisossômica foi analisada por citometria de fluxo (BD FACSVersé TM, EUA). Um total de 10.000 eventos foram analisados por amostra.

3.11.3 Nível de espécies reativas de oxigênio

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) foi analisado usando H2DCFDA (5-(e-6)-clorometil-29,79-diclorodi-hidrofluoresceindiacetato, éster etílico). A esterase não específica clivou o H2DCFDA no DCFDA que se transforma em molécula fluorescente do DCF com a presença de ERO intracelular. As células foram expostas a 100 μ L de H2DCFDA na concentração final de 10 μ M por 40-60 minutos, protegidas da luz à temperatura ambiente. O nível de ERO foi então analisado por citômetro de fluxo (BD FACSVersé TM, EUA). Foram analisados 10.000 eventos por amostra.

3.11.4 Determinação do nível intracelular de Ca²⁺

O Fluo-4 verde fluorescente ligado ao éster acetoximetílico (Fluo-4 / AM) foi utilizado para determinar o nível intracelular de Ca²⁺. O AM não fluorescente é clivado pela esterase e liberta o Fluo-4 para ligar o Ca²⁺ e emitir um sinal fluorescente (Gee et al., 2000). As células foram expostas a 2 μ L de Fluo-4/AM por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. O nível de Ca²⁺ intracelular foi analisado por citômetro de fluxo (BD FACSVersé TM, EUA). Foram analisados 10.000 eventos por amostra.

3.12 ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN

O plaqueamento para o teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular foi realizado da mesma maneira que a citometria, em placa de 12 poços contendo $2,5 \times 10^4$ células por poço. Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o pellet obtido foi ressuspensionado em meio de cultura. As células foram coradas com uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA). O número de células totais foi determinado em câmara de Neubauer, contando-se células coradas ou não coradas. Foi considerado como células com membrana intacta, aquelas não coradas; e as coradas de azul, como células com membrana plasmática lesionada.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de ensaios biológicos e caracterização das nanoemulsões foram realizados em triplicata. A representação da triplicata foi apresentada como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas em programa Graphpad Prism 6.01 (EUA). Diferenças estatísticas realizadas por análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores dependente da análise, e pós-teste Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo valor de p menor que 0,05 ($\alpha=0,05$) e intervalo de confiança de 95%.

Para cálculo de IC_{50} foi utilizada análise de regressão não-linear do log da concentração dos tratamentos em questão. Para cálculo de índice de combinação (CI) e índice de redução de dose (DRI) foi utilizado modelo de ⁵⁹ em software Compusyn (EUA)⁶¹.

4. RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS DE PEQUI E ASSOCIAÇÃO COM ÁCIDO ANACÁRDICO

Macroscopicamente, as nanoemulsões apresentaram um aspecto homogêneo e translúcido. Não foi observada floculação, cremação ou separação de fases durante o período em que o estudo foi realizado.

Para caracterização das nanoemulsões à base de óleo de pequi, os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, carga superficial (potencial zeta) e índice de polidispersão foram avaliados.

A tabela 1 expõe os parâmetros físico-químicos das nanogotículas das nanoemulsões formuladas.

Tabela 1 Características físico-químicas das nanogotículas presentes em nanoemulsões à base de óleo de pequi (PeNe) e em combinação com ácido anacárdico (PeNe+AA). Valores representados em média \pm desvio padrão.

Formulação	Diâmetro		Potencial Zeta (mV)	pH
	Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (IPD)		
Branco	90,04 \pm 21,06	0,300 \pm 0,027	-7,5 \pm 5,3	7
PeNe	150,66 \pm 20,66	0,271 \pm 0,026	-40,3 \pm 8,5	6
PeNe+AA	166,24 \pm 38,27	0,261 \pm 0,024	-47,5 \pm 10,6	6

As nanogotículas apresentaram características físico-químicas compatíveis com nanoemulsões, tendo como diâmetro hidrodinâmico menor que 200 nm, índice de polidispersão menor que 0,3 e valores de potencial zeta negativos⁶⁰.

O Branco da formulação (lipossomas de lecitina vazios) obteve valor de diâmetro hidrodinâmico igual a 90,04 \pm 21,06 nm. Ao se acrescentar os óleos formando uma nanoemulsão o diâmetro hidrodinâmico aumenta dependendo da adição de cada

componente. O valor de diâmetro hidrodinâmico encontrado foi igual a $150,66 \pm 20,66$ nm para nanoemulsão de óleo de pequi (Tabela 1).

A encapsulação de ácido anacárdico (AA) nas formulação de óleo de pequi modificou o diâmetro hidrodinâmico quando comparado a nanoemulsão sem AA. No caso de nanoemulsão de óleo de pequi associada a ácido anacárdico (PeNe+AA), o diâmetro hidrodinâmico obteve valor de $166,24 \pm 38,27$ (Tabela 1).

Ao que diz respeito ao índice de polidispersão (IPD) das nanoemulsões, os valores ficaram abaixo de 0,3 o que classifica as amostras como monodispersas⁶².

Os valores de potencial zeta variaram de acordo com os componentes utilizados para cada formulação. O sistema de lipossomas formado no branco (lecitina e tampão PBS) apresentou valor de potencial zeta igual a $-7,5 \pm 5,3$ mV, sendo maior em módulo esse valor para as nanoemulsões com óleo. As formulações de óleo de pequi e em associação com ácido anacárdico obtiveram valores de potencial zeta maiores em módulo em torno de -40 mV.

Como as formulações foram dispersas em tampão PBS (pH =7), o valor de pH das formulações se manteve próximo a este valor, diferenciando apenas as formulações de pequi que tiveram valor de pH igual a 6.

4.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

4.2.1 Avaliação da citotoxicidade de ácido anacárdico (15:0) e determinação do valor de IC₅₀ em linhagem de câncer de pele melanoma murino (B16F10).

O ácido anacárdico apresentou resposta dependente da dose e do tempo nas células de melanoma (B16F10) como apresentado na Figura 13. O valor de IC₅₀ de AA encontrado foi igual a $64,61 \mu\text{M}$ ou $22 \mu\text{g/mL}$ em 24 horas e $46,68 \mu\text{M}$ ou $16 \mu\text{g/mL}$ em 48 horas.

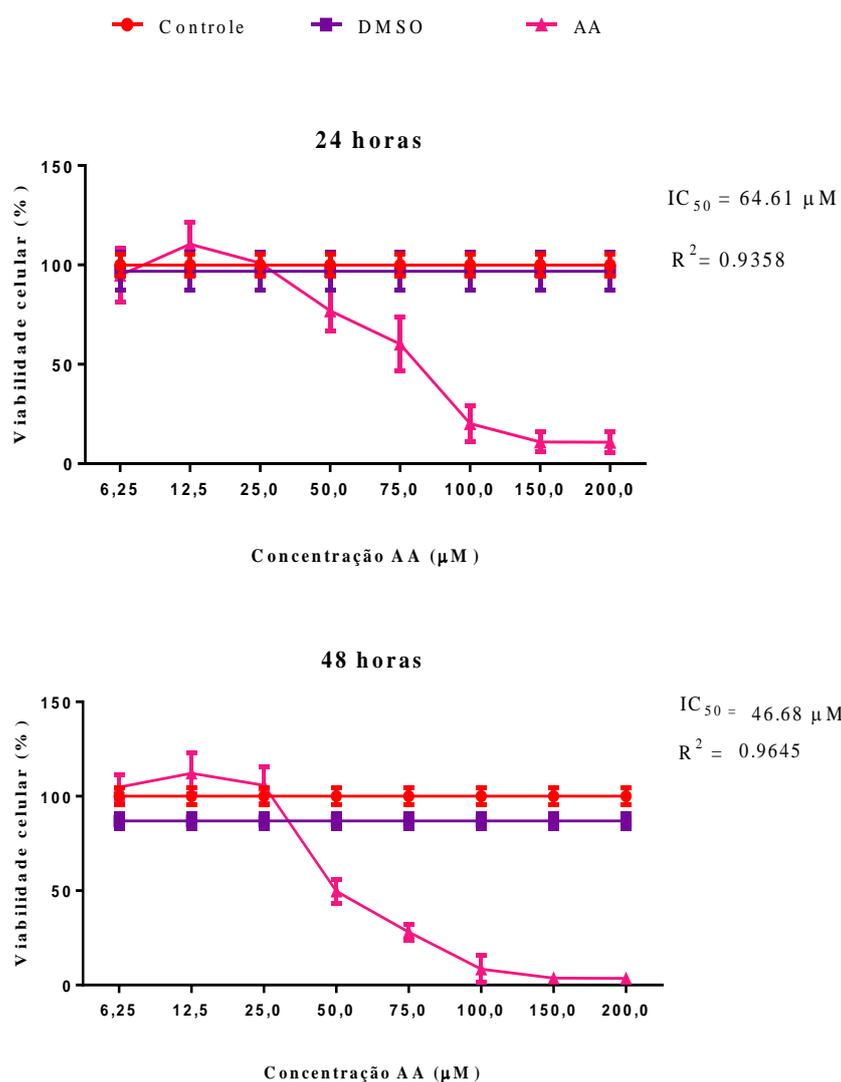


Figura 10 Efeito citotóxico do ácido anacárdico em células de melanoma. Ensaio de MTT em células de melanoma (B16F10) tratadas com ácido anacárdico. As células foram expostas ao tratamento por 24 (A) e 48 horas (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os os grupos (**** = $p < 0,0001$), pós-teste Tukey. Valor de IC₅₀ e R² calculado a partir de regressão não-linear.

4.2.2 Avaliação da citotoxicidade de ácido anacárdico (15:0) em combinação com nanoemulsão de óleo de pequi e determinação do valor de IC₅₀ em linhagem B16F10.

A redução da viabilidade celular de células de câncer de pele melanoma foi possível de ser observada nos tempos de 24 e 48 horas. A formulação em branco não interferiu significativamente na viabilidade celular, mostrando que os compostos das formulações eram atóxicos.

As amostras de óleo de pequi (óleo e nanoemulsão) reduziram a viabilidade celular de maneira tempo e dose-dependente. Em 24 horas, as células tratadas com óleo de pequi apresentaram redução da viabilidade celular igual a 75%. O valor de IC₅₀ encontrado foi de 109,3 µg/mL para OL Pe. A nanoemulsão de óleo de pequi apresentou atividade citotóxica de aproximadamente 66% em redução da viabilidade celular no tempo de 24 horas e 80% no tempo de 48 horas na concentração de 360 µg/mL. O valor de IC₅₀ da nanoemulsão com óleo de pequi foi igual a 102,6 µg/mL para PeNe.

O encapsulamento de AA reduziu significativamente ($p < 0,0001$) seu valor de IC₅₀ de 64,61 ou 22 µg/mL µM (AA) para 48,78 µM ou 16,1 µg/mL (PeNe+ AA) em um período de 24 horas, enquanto em 48 horas de exposição a diferença estava entre 46,68 µM (AA) ou 16 µg/mL a 39,80 µM ou 14 µg/mL (PeNe + AA). Esses dados sugerem que o encapsulamento do ácido anacárdico aumentou sua citotoxicidade nas células de melanoma (B16F10). O valor de IC₅₀ em relação ao óleo de pequi foi de 135,1 µg/mL para o óleo de pequi; 102,6 µg/mL para PeNe; e 68,60 µg/mL para PeNe+AA em 24 horas de exposição. Em 48 horas, o valor de IC₅₀ foi reduzido para todos os tratamentos, sendo 108,6 µg/mL de óleo de pequi, 100,4 µg/mL (PeNe) e 55,98 µg/mL para PeNe+ AA (Figura 14).

As formulações utilizadas foram recém-formuladas (utilizadas em até 15 dias). Adicionalmente, os resultados apresentados correspondem a repetições de diferentes lotes de formulações que apresentaram reprodutibilidade na redução da viabilidade celular.

Concentração de AA: 11 µg/mL, 17 µg/mL, 22 µg/mL, 45 µg/mL, 89 µg/mL
 Concentração de NE/OL: 45 µg/mL, 67.5 µg/mL, 90 µg/mL, 180 µg/mL, 360 µg/mL

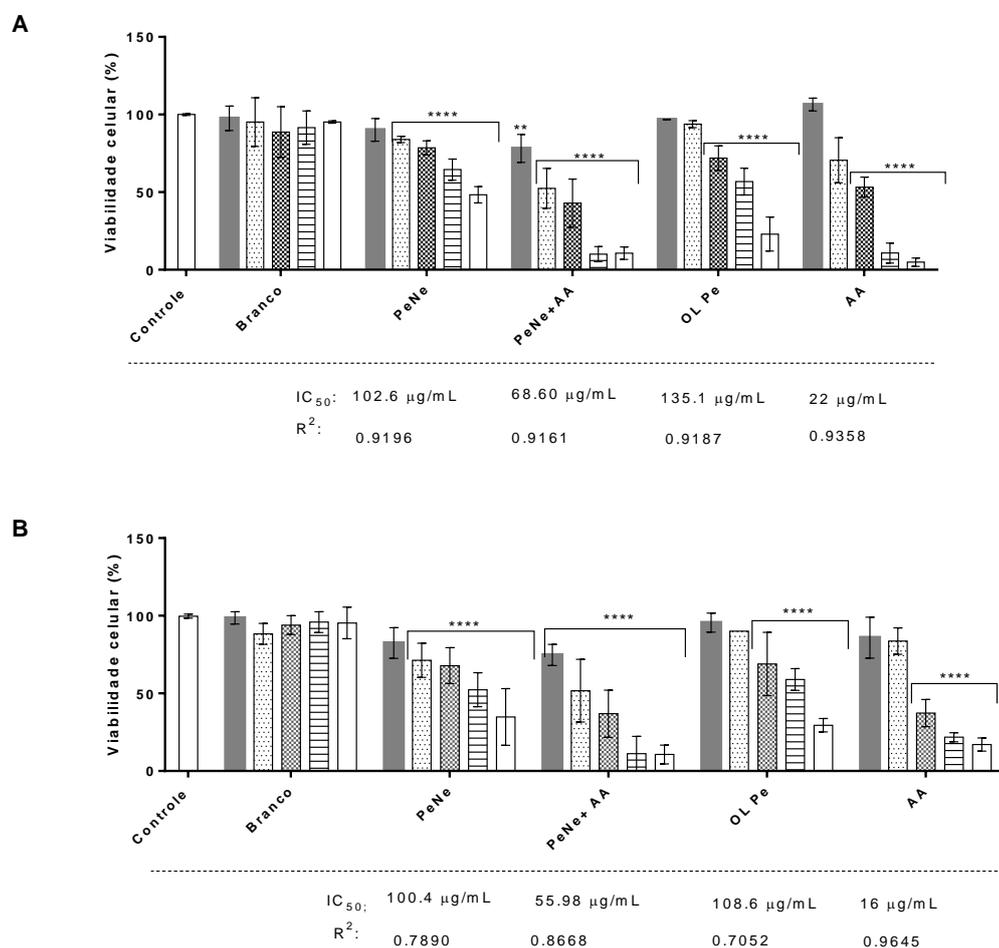


Figura 11 Efeito citotóxico de nanoemulsão à base de óleo de pequi associado ao ácido anacárdico (15:0) em células de melanoma. As células foram expostas ao tratamento por 24 horas (A) e 48 horas (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos (**** = $p < 0,0001$), pós-teste Tukey. Valor de IC 50 e R2 calculado a partir de regressão não linear.

Utilizando o software Compusyn, foi possível calcular o índice de combinação (CI-Combination Index) para a combinação PeNe e AA na formulação PeNe +AA. Utilizando o parâmetro de IC₅₀, foi encontrado um CI igual a 0,795, resultando em uma redução da dose (valor de DRI- Dose reduction index) de 4,1 vezes para PeNe e 1,8 vezes para AA. Estes dados sugerem que a combinação de PeNe e AA na formulação de PeNe +AA possui uma atividade sinérgica nas células de melanoma, já que valores de CI menores que 1 indicam combinação de fármacos por sinergismo⁶².

4.3 PERFIL DE PROLIFERAÇÃO E ADESÃO CELULAR

O teste de proliferação expôs diferença significativa no grupo AA em comparação ao controle (Figura 15). A atividade antiproliferativa do AA é mais expressiva após 40 horas de exposição. Esses dados corroboram com azul de tripan e ensaios morfológicos, indicando redução na densidade celular.

A partir da curva de proliferação do experimento de RTCA os tempos de duplicação foram calculados por linha de tendência exponencial da curva. O tempo de duplicação das células não tratadas (controle) foi de $16,14 \pm 0,71$ horas, enquanto nas células tratadas com AA o tempo de duplicação foi notavelmente mais longo ($32,23 \pm 0,21$ horas; $p < 0,001$). Já as formulações de nanoemulsão não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle, sendo $16,88 \pm 1,94$ horas para PeNe e $17,30 \pm 1,18$ horas para PeNe+AA.

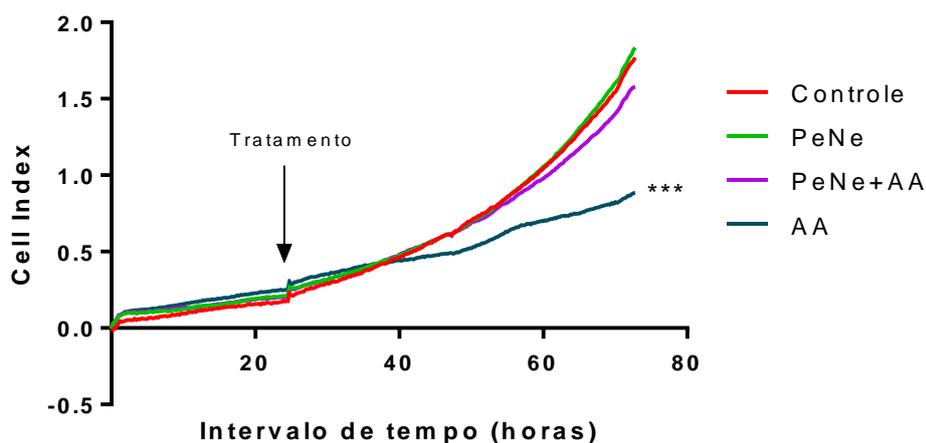


Figura 12 Perfil de proliferação de células de melanoma. O ensaio de adesão celular de RTCA foi realizado durante o tratamento com nanoemulsão à base de óleo pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA). As experiências foram realizadas em triplicado. Teste One-way ANOVA (***) = $p < 0,001$.

4.4 ENSAIO DE CLONOGENICIDADE

A capacidade de formação de colônias das células remanescentes após período de tratamento foi reduzida quando as células foram tratadas com PeNe+AA e AA em comparação ao controle (Figura 16). A redução da fração de sobrevivência nas células tratadas com PeNe+AA foi igual a 83% e a 77% quando tratadas com AA. Não houve diferença significativa na fração de sobrevivência das células tratadas com PeNe.

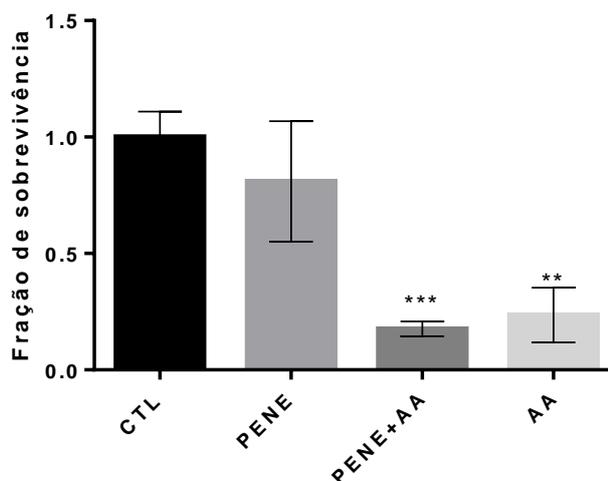


Figura 13 Ensaio de formação de colônias. Fração de sobrevivência de células de melanoma tratadas com nanoemulsão de óleo de pequi (PeNe), nanoemulsão de óleo de pequi conjugada com ácido anacárdico (PeNe + AA) e ácido anacárdico livre (AA). One-way ANOVA (pós-teste Tukey) *** $p = 0,003$.

4.5 CITOMETRIA DE FLUXO

4.5.1 Morfologia celular

Mudanças no aspecto morfológico são sinais de que as células sofrem de estresse e/ou estão em processo de morte. No presente trabalho, nenhuma alteração morfológica expressiva foi observada por microscopia óptica (Figura 17). No entanto, é possível observar diminuição da densidade celular após exposição a PeNe + AA e AA. Paralelamente, as células apresentaram alterações morfológicas por citometria de fluxo. Todos os grupos de tratamento apresentaram redução no tamanho das células, com diminuição mais significativa após a exposição ao PeNe+AA ($p < 0,001$). Foi observado aumento da granulosidade nas células expostas a PeNe e PeNe +AA. (Figura 18).

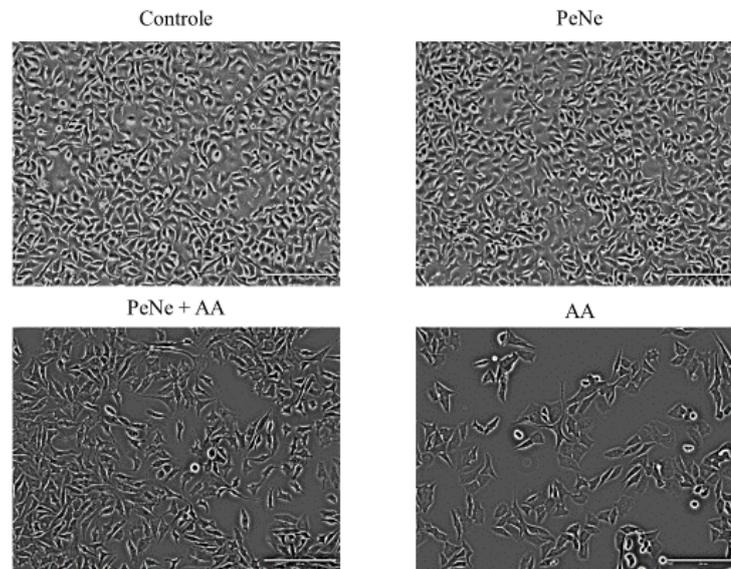


Figura 14 Aspecto morfológico do B16F10 por microscópio de contraste de fase 20x. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico a 64 μ M (PeNE + AA) por 24 horas 90 μ g/mL Barra de escala: 200 μ m

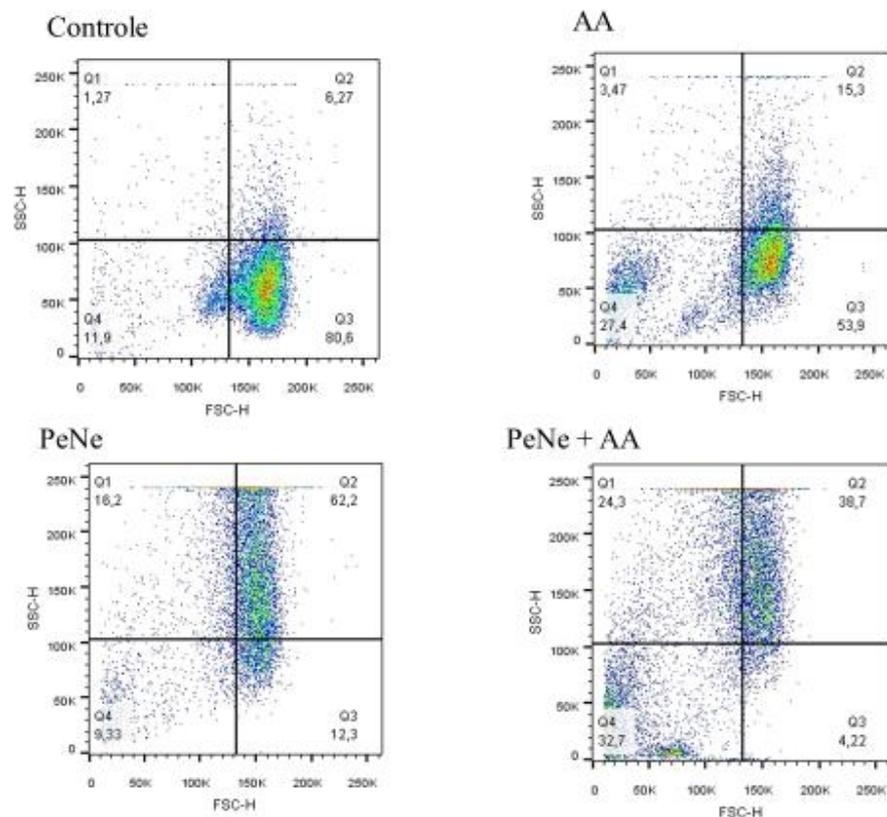


Figura 15 Dot plot de morfologia das células da linhagem de câncer de pele melanoma (B16F10) por citometria de fluxo após 24 horas de tratamento com controle PBS 1X, nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas 90 μ g/mL e 64 μ M para AA.

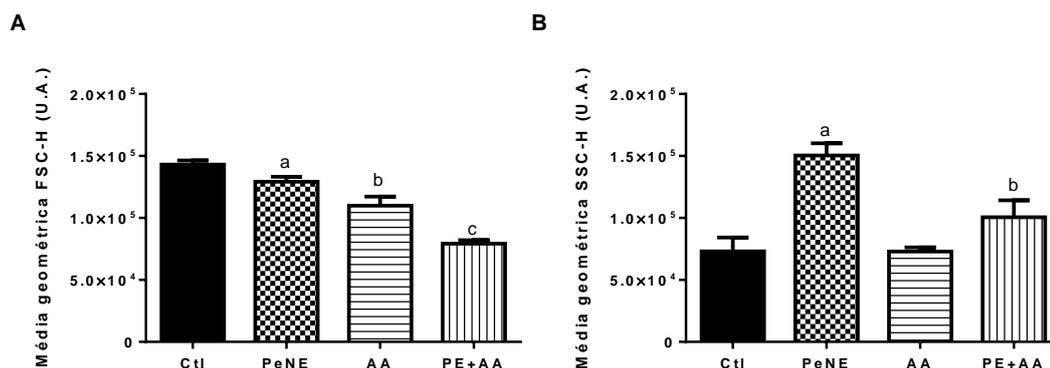


Figura 16 Análise morfológica de células de melanoma (B16F10). As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas 90 µg/mL e 64µM para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. Legenda: tamanho (FSC-H) e granularidade (SSC-H). ANOVA unidirecional: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

4.5.2 Permeabilização da membrana lisossômica

Após 24 horas de exposição às amostras, a permeabilização da membrana lisossômica (PML) das células B16F10 foi avaliada com laranja de acridina (LA), um corante lisossomotrópico que se acumula em organelas ácidas. Durante a PML, a membrana lisossômica é desestabilizada e o gradiente de pH diminui com o vazamento de prótons, o que leva, conseqüentemente, à diminuição do acúmulo de corante⁶³. Aqui, foi observada perda significativa do sinal de fluorescência LA após a exposição a AA ($p < 0,01$) e PeNE + AA ($p < 0,001$), quando comparada ao controle PBS 1X (Figura 19).

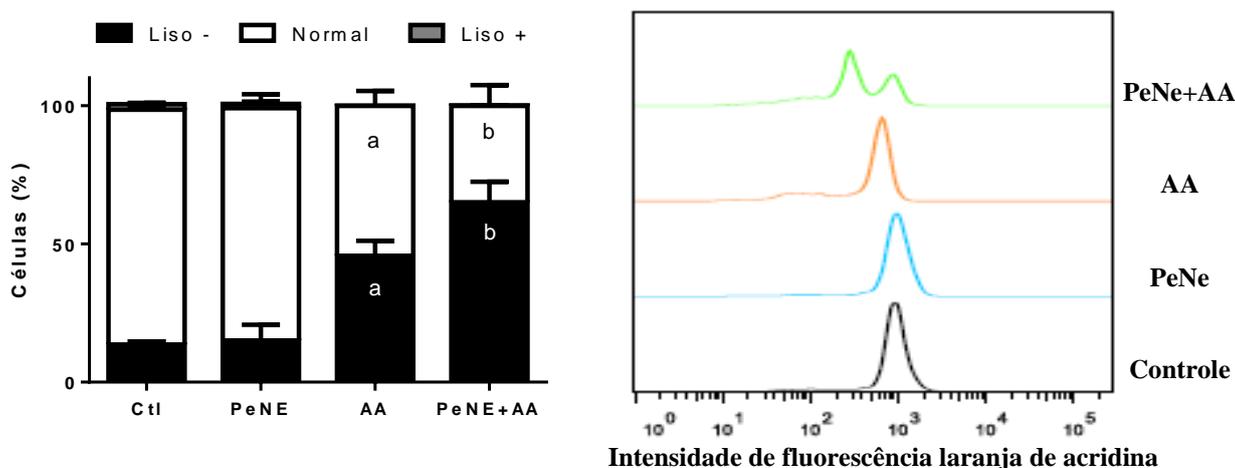


Figura 17 Acidez lisossômica de células de melanoma (B16F10). As células foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugada com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a 90 µg/mL e 64µM para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. O estado funcional do lisossomo foi medido por laranja de acridina (LA) com representação

da porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência da LA (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

4.5.3 Espécies reativas de oxigênio intracelulares

A detecção de espécies reativas de oxigênio intracelulares mostrou aumento de ROS intracelulares em células de câncer de pele melanoma tratadas com ácido anacárdico e nanoemulsão de óleo de pequi e ácido anacárdico. O aumento de ROS intracelular foi mais pronunciado em células tratadas apenas com AA quando comparado ao controle PBS 1X (Figura 20).

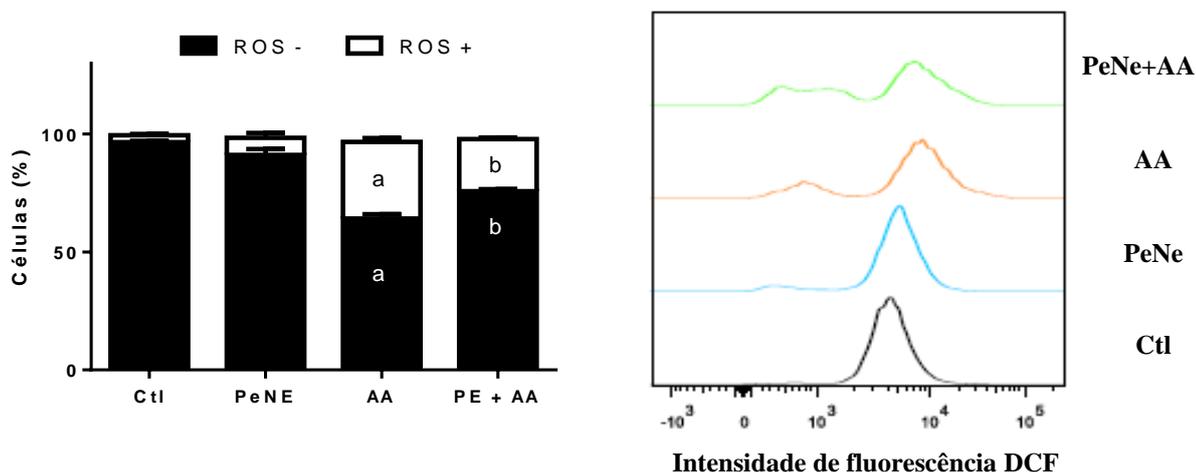


Figura 18 Detecção de espécies reativas intracelulares de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a 90 $\mu\text{g/mL}$ para Ne e 64 μM para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. As EROs intracelulares analisadas com CM-H2DCFDA são representadas como porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência de DCF (B). Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey).

4.5.4 Potencial de membrana mitocondrial

A análise do potencial de membrana mitocondrial de células de câncer de pele melanoma tratadas com nanoemulsão de óleo de pequi e ácido anacárdico assim como os dois separadamente, estão retratados na Figura 21. A combinação de óleo de pequi com ácido anacárdico causou aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial de 70% no grupo de PeNe+AA e 30% no grupo de AA, quando comparado ao controle.

O efeito da despolarização da membrana mitocondrial foi mais expressivo no grupo tratado com PeNe+AA, mas o grupo AA também causou despolarização da membrana mitocondrial e maior permeabilidade a rodamina 123.

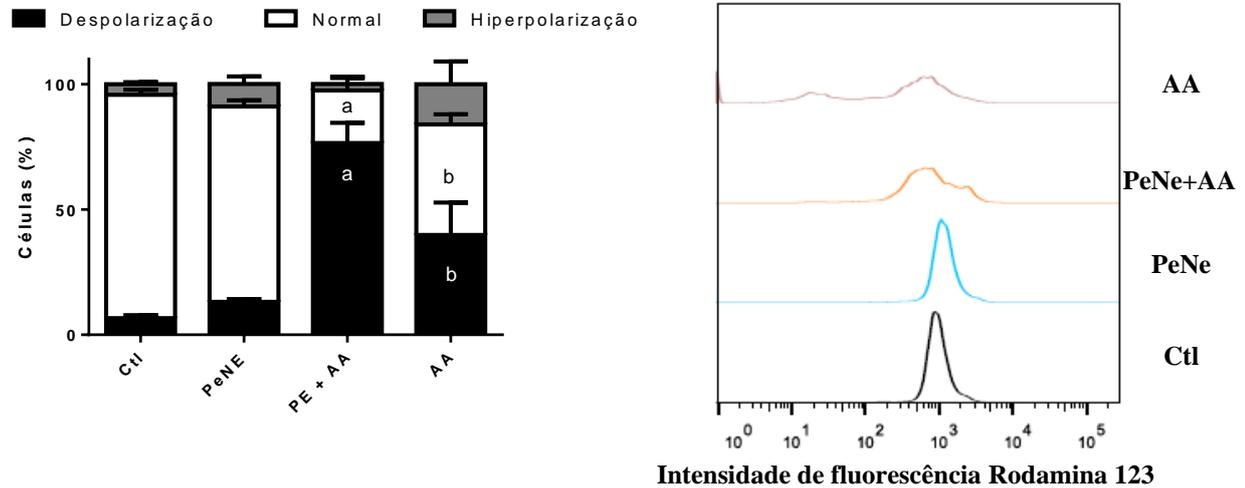


Figura 19 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial por citometria de fluxo. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a 90µg / mL e 64µM para AA. O tampão fosfato foi usado como controle. A permeabilização da membrana mitocondrial foi avaliada pela média geométrica e pela intensidade de fluorescência da rodamina 123. Two-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey).

4.5.5 Determinação do nível intracelular de Ca^{2+}

No ensaio de citometria de fluxo utilizando marcação com Fluo4-AM não observou-se marcação significativa para níveis de cálcio intracelular em nenhum dos grupos analisados (Figura 23).

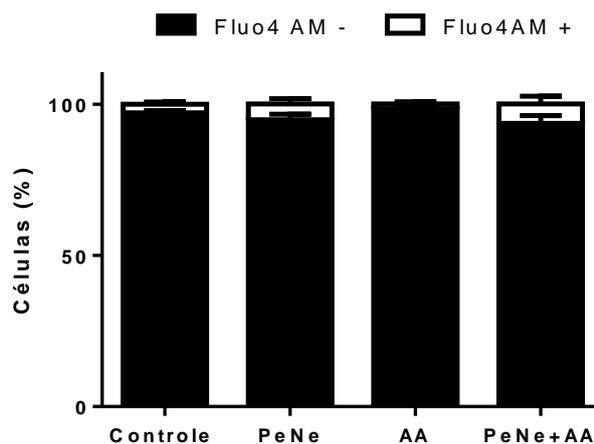


Figura 20 Avaliação de nível de Ca^{2+} intracelular por citometria de fluxo. As células de melanoma (B16F10) foram expostas a nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugado com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas a $90\mu\text{g} / \text{mL}$. O tampão fosfato foi usado como controle. A intensidade da fluorescência do éster acetoximetílico foi utilizada como parâmetro e avaliada pela média geométrica. One-way ANOVA: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey).

4.6 ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN

Na figura 23 está representado ensaio de lesão de membrana onde a coloração de azul de tripan foi utilizada para verificação de células com membrana lesionada e membranas intactas.

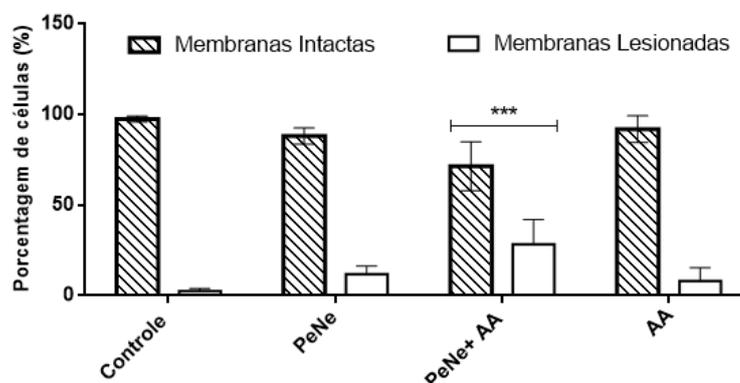


Figura 21 Porcentagem de células de câncer de pele melanoma B16F10 intactas e com lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico associado e livre a $90\mu\text{g}/\text{mL}$ e $64\mu\text{M}$ para AA em comparação ao controle PBS (CTL). Análise de Two-way ANOVA e pós teste Tukey (***) = $p < 0,0001$.

Foi possível observar diferença estatística (na porcentagem de células com membrana lesionada e coradas com azul de tripan no grupo tratado com PeNe+AA, com aumento de 26% na porcentagem de células com lesão de membrana. Os grupos do AA e da PeNe não apresentaram diferença estatística.

Na contagem total do número de células observou-se diferença estatística na quantidade de células do grupo AA (Figura 24). O que corrobora com as imagens de microscopia, apresentadas anteriormente na Figura 17 onde se observa diminuição na densidade celular por poço.

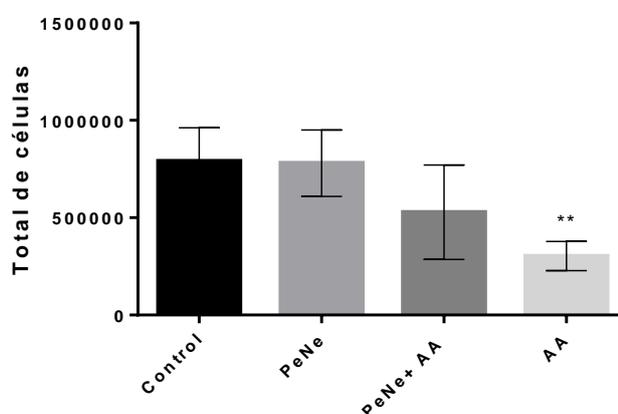


Figura 22 Avaliação por coloração de Azul de tripan do número total de células de câncer de pele melanoma B16F10 após exposição por 24 horas às PENE (nanoemulsão de pequi), PENE+ AA (nanoemulsão de óleo de pequi associada a ácido anacárdico) e AA (ácido anacárdico livre). Análise de Two-way ANOVA e pós teste Tukey (**= $p < 0,0001$).

4.7 AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR DE CÂNCER DE PELE MELANOMA POR ENSAIO DE “SCRATCH ASSAY”.

Na figura 25 está apresentado o perfil de migração de células de melanoma tratadas com nanoemulsão de óleo de pequi e ácido anacárdico por 24 horas e logo após feito a ferida na monocamada de célula. Passadas 24 horas, a ferida do controle fechou completamente assim como no grupo de PeNe. As feridas dos grupos PeNe+AA e AA não fecharam, exibindo potencial anti migratório dos tratamentos.

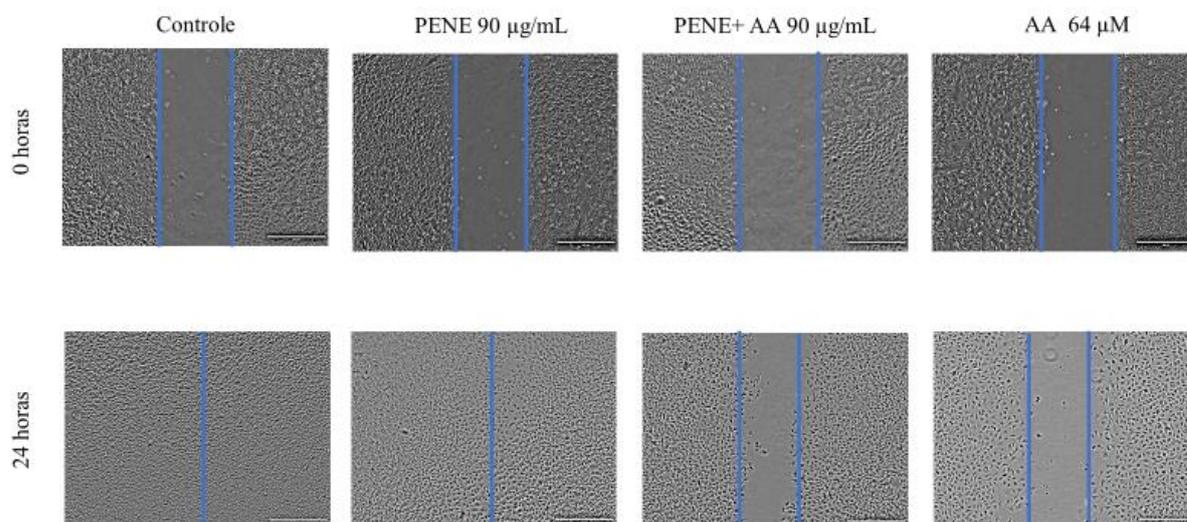


Figura 23 Migração de B16F10 medida pelo ensaio Scratch. As células de melanoma foram previamente tratadas com nanoemulsão à base de óleo de pequi (PeNE), ácido anacárdico (AA) e nanoemulsão de óleo de pequi conjugada com ácido anacárdico (PeNE + AA) por 24 horas. As imagens arranhadas foram adquiridas com 0 e 24 horas. Linhas azuis representam a área da ferida (Escala de 200µM). Quantificação da porcentagem de fechamento da ferida em relação ao controle medida pela Imagem J. One-way ANOVA (***) $p < 0,05$; $p < 0,001$).

A quantificação do fechamento de ferida em experimento de “*scratch assay*” mostrou diferença significativa dos grupos PeNe+AA e AA quando comparado ao controle (Figura 26). Não houve diferença entre os dois grupos na capacidade de inibir migração em ensaio de “*scratch assay*”. A formulação de PeNe não interferiu na taxa de fechamento da cicatriz de B16F10.

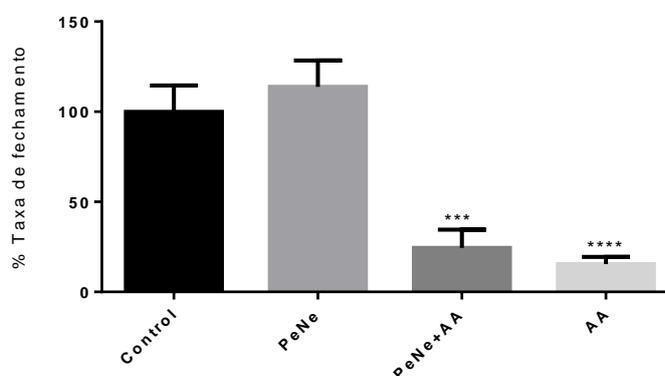


Figura 24 Quantificação da taxa de fechamento de cicatriz em ensaio de "Scratch Assay" em células de câncer de pele melanoma murino (B16F10) após tratamento de 24 horas com nanoemulsão de óleo de pequi

(PENE), nanoemulsão de óleo de pequi associada a ácido anacárdico (PENE + AA) e ácido anacárdico livre (AA). Imagens analisadas em programa de processamento de imagens Image J

4.8 "CELL INVASION-MIGRATION REAL TIME CELL ANALYSIS" (CIM-RTCA)

4.8.1 Ensaio de migração por RTCA

De acordo com os resultados obtidos no tempo de 48 horas, foi possível observar que durante o tratamento houve inibição estatisticamente significativa da capacidade migratória apenas no grupo de AA. Por outro lado, o índice celular foi maior do que o controle no grupo PeNe, indicando que o tratamento aumentou taxa de migração neste ensaio (Figura 27). Este dado corrobora com o ensaio de “*scratch*” (Figura 26) onde PeNe apresentou perfil de migração comparável ao controle.

Ao analisarmos a migração das células após o tratamento com as nanoemulsões, PeNe e PeNe+AA, evidenciamos que no tempo final de 48 horas houve inibição estatisticamente significativa da migração das células remanescentes tratadas com PeNe, PeNe+AA e AA em comparação com o controle negativo ($p < 0,0001$) (Figura 27). Ao compararmos os grupos entre si, PENE+AA e AA diminuíram mais expressivamente a migração do que PeNe ($p < 0,0001$ e $p < 0,05$).

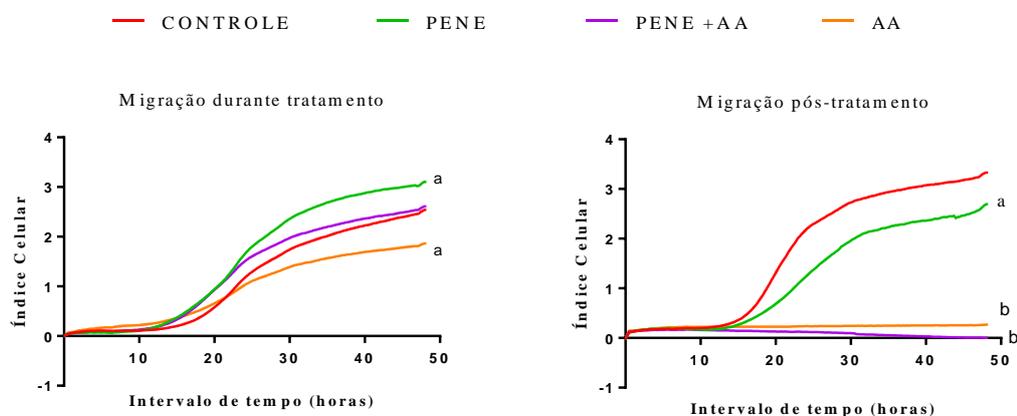


Figura 25 Avaliação de migração por ensaio de CIM-RTCA ("Cell invasion-migration real time cell analysis") de células de câncer de pele melanoma murino (B16F10) durante e pós-tratamento com nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico em concentração de 90 µg/mL para nanoemulsões

e 64 μM para AA. ANOVA unidirecional: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

4.8.2 Ensaio de invasão por RTCA

Nos ensaios de invasão utilizou-se o modelo de matriz como matriz extracelular para verificar capacidade de invasão das células de câncer de pele melanoma durante e pós-tratamento com nanoemulsões de óleo de pequi, em associação com ácido anacárdico e AA livre (Figura 28).

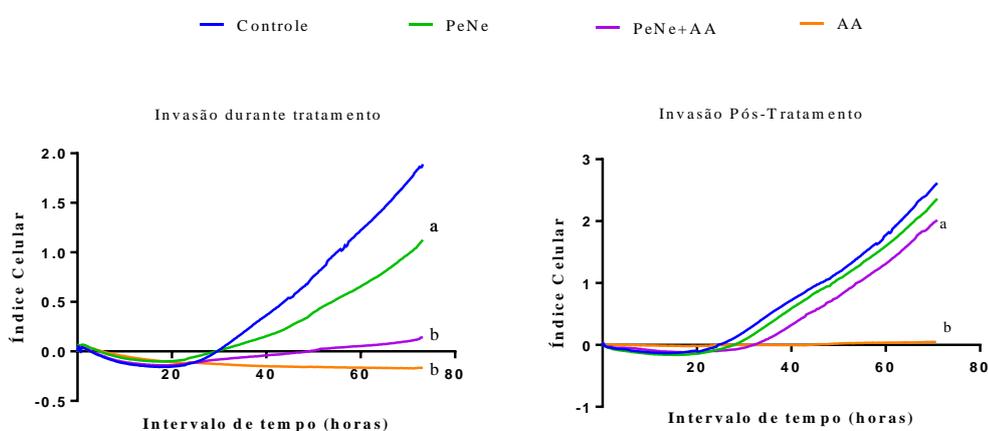


Figura 26 Avaliação de perfil de invasão por ensaio de CIM-RTCA ("Cell invasion-migration real time cell analysis") de células de câncer de pele melanoma murino (B16F10) durante e pós-tratamento com nanoemulsões de óleo de pequi e ácido anacárdico em concentração de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para nanoemulsões e 64 μM para AA. ANOVA unidirecional: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (Pós-teste Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Os resultados de invasão das células remanescentes após o tratamento com os nanoemulsões, PeNe e PeNe+AA e AA livre mostraram que no tempo final de 72 horas houve inibição estatisticamente significativa da migração das células tratadas com PeNe+AA e AA em comparação com o controle negativo ($p < 0,0001$). Foi possível observar diferença estatística ($p < 0,0001$) entre os grupos PeNe+AA e AA, sendo a inibição da invasão pelo AA mais expressiva que a conjugação com a nanoemulsão.

Ao analisarmos a capacidade de invasão das células durante o tratamento com as nanoemulsões e AA livre, podemos observar que no tempo final de 72 horas houve inibição estatisticamente significativa da capacidade de invasão das células tratadas com PeNe, PeNe+AA e AA em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$). Ademais,

podemos observar que não houve diferença estatística entre o tratamento com PENE+AA e AA ($p < 0,001$).

5. DISCUSSÃO

O melanoma é um subtipo de câncer de pele que representa apenas 60% das mortes por câncer de pele³, sendo considerado o subtipo mais agressivo dos cânceres de pele, apresentando grande capacidade de metástase e perfil de resistência a multi-drogas⁴. Diante das dificuldades encontradas no tratamento convencional empregado para este tipo de câncer, tais com risco de permanência de células remanescentes; alopecia, distúrbios gastrointestinais, infertilidade entre outros, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para essa patologia se tornou uma necessidade.

Diante da variedade da biodiversidade brasileira e potenciais biocompostos de interesse a serem explorados, estudos são necessários para descobertas de novas fontes de tratamentos, diagnósticos e prevenção de doenças como o câncer. O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) pertencente à biodiversidade brasileira tem chamado atenção por suas atividades biológicas anteriormente descritas como quimiopreventivo, antioxidantes e efeito anticâncer, entre outros, exprimindo baixa citotoxicidade em células normais. Explorando novos biocompostos de interesse, o ácido anacárdico (AA) se destaca. É um composto bioativo, derivado do líquido da casca de castanha de caju, com atividade anticâncer descrita contra vários tipos de câncer, incluindo melanoma.

No entanto, até onde sabemos, estudos que abordam os efeitos do AA (15:0) e o óleo de pequi na proliferação celular (a curto e longo prazo), principais estruturas celulares (mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, membrana plasmática) e em características metastáticas (migração e invasão) das células de melanoma ainda não foram realizados.

Portanto, este estudo foi desenvolvido tendo como principal objetivo avaliar os efeitos terapêuticos do ácido anacárdico (AA) e do óleo de pequi (OL Pe), livres ou associados a nanoemulsões, na viabilidade celular, alterações em organelas e no processo de metástase de células de melanoma *in vitro*.

Foi possível desenvolver nanoemulsões com óleo de pequi tendo parâmetros físico-químicos similares com diâmetro hidrodinâmico na faixa de 90 a 166 nm; índice de polidispersão menor ou igual a 0,300 e potencial zeta entre -7,5 e -47,5 mV.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), escolhida para a caracterização da nanoemulsão, é uma das mais utilizadas para esse fim, uma vez que é mais acessível do que as demais metodologias. Através dela é possível determinar os valores de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão⁶⁴.

Entretanto, como todas as técnicas, possui limitações, tendo como exemplo, encontrar uma concentração adequada que diminua a probabilidade de um fenômeno de espalhamento múltiplo. Além disso, ela não fornece informações sobre formato micelar, eficiência de aprisionamento de drogas, estado de agregação e reologia, por exemplo. Outros métodos são necessários para uma análise mais completa, como microscopias de alta resolução, espectroscopias e viscometria⁶⁵.

O diâmetro hidrodinâmico (DH) é um parâmetro físico-químico que diz respeito à dimensão obtida pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) que descreve o diâmetro de uma partícula movendo-se em um fluido, juntamente com uma fina camada de meio circundante de solvatação²⁷. O intervalo de valores admitidos para diâmetro hidrodinâmico em nanoemulsões não é consensual entre os autores. Estudos de revisões expõem limites propostos para DH entre 100 e 1000 nm. Choi e McClements (2020) propuseram uma faixa de diâmetro hidrodinâmico para nanoemulsões de 20 a 200 nm⁶⁶. Levando em conta essa classificação, as nanoemulsões neste trabalho desenvolvidas, se encontram dentro dos parâmetros esperados para este nanossistema.

Nanoemulsões com óleos derivados de planta possuem valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta que variam do tipo de método utilizado para obtenção, emulsificante, óleo utilizado e composto hidrofóbico incorporado no sistema⁶⁷. O sistema de nanoemulsões de óleo de andiroba e aroeira exposto por Baldissera et al (2013) para utilização antiparasitária apresentou valor de diâmetro hidrodinâmico entre 129 e 240 nm⁶⁸.

Em estudo anterior nanoemulsão de óleo de açaí apresentou valores de DH igual 117.5 ± 2.44 nm; PdI igual a 0.144; e potencial zeta igual a -0.536 mV⁶⁹. No estudo foi utilizado Tween 80[®] como surfactante, enquanto neste presente estudo foi utilizada a lecitina de ovo como emulsificante o que pode gerar diferença nos parâmetros quando se compara os dois nanossistemas.

No caso de sistemas nanoestruturados contendo óleo de buriti foi encontrado na literatura valores de diâmetro hidrodinâmico de 73 a 86 nm⁷⁰, já em outro estudo nanoemulsões de óleo de buriti apresentaram diâmetro hidrodinâmico perto de 200 nm⁷¹.

No processo de microencapsulação do óleo de pequi estudos apresentaram valores de microemulsões de 150 a 1450 nm⁶⁷. Em outro estudo microemulsão de óleo de pequi com quitosana obteve tamanho de partícula igual a 481 nm⁷². Ambos os estudos se tratam de microssistemas, por isso, os tamanhos são maiores que os encontrados no presente estudo em relação ao diâmetro hidrodinâmico de nanoemulsão de óleo de pequi.

O valor de PDI é um indicador da distribuição do tamanho das gotículas no sistema da nanoemulsão. Valores de PDI próximos a 0 indicam monodispersividade, enquanto valores acima de 0,7 indicam grande variedade de tamanhos de gotículas⁷³. No presente estudo, as amostras apresentaram valor de PDI menor que 0,300 o que sugere monodispersividade do sistema. Nanoestruturas descritas na literatura utilizando óleo de buriti apresentaram valores de PDI iguais a 0.08–0.15⁶⁸.

Sabe-se que o potencial zeta é um indicador da estabilidade dos sistemas coloidais. As partículas admitem carga quando dispersas em uma solução que é capaz de repelir outras partículas, proporcionando estabilidade ao sistema físico, evitando agregação das partículas²⁷. O potencial zeta é influenciado pela interação da gota e do dispersante, essa interação é influenciada pela temperatura, pH e exposição à luz. Sistemas com valor potencial zeta de no mínimo ± 30 mV são considerados mais propensos a serem estáveis⁷⁴, excluindo as forças de atração de van der Waals que também influenciam na estabilidade coloidal. Seguindo essa linha de classificação, as amostras possuem tendência à estabilidade pois apresentaram valor de potencial zeta igual a -40,3 mV. Com valores similares, a nanoemulsão de óleo de pequi em associação com ácido anacárdico apresentou potencial zeta igual a $-47,5 \pm 10,6$ mV (Tabela 1). Essas amostras assumem um estágio de estabilidade física quando comparados a essas teorias.

Em seguida, foram realizados os ensaios biológicos começando pelo ensaio de viabilidade celular de B16F10. Para avaliar a citotoxicidade do óleo de pequi, ácido anacárdico livres e em nanoformulações (Figura 12) foi utilizado ensaio de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O ensaio consiste na clivagem do MTT por células metabolicamente ativas em formazan pela mitocôndria. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células ativas³⁵

Como relatado anteriormente, a lecitina é considerada um emulsificante biodegradável e biocompatível, ideal para aplicação em produtos injetáveis por não apresentar toxicidade *in vitro*⁷⁵. Na formulação contendo apenas a lecitina a viabilidade celular da linhagem B16F10 não foi reduzida corroborando com os estudos anteriores.

Neste estado, o óleo de pequi obteve efeito na redução da viabilidade celular em células de câncer de pele melanoma tempo e dose-dependente. Em 24 horas, as células tratadas com óleo de pequi apresentaram redução de 75% na viabilidade celular. O valor de IC₅₀ encontrado foi igual a 109,3 µg/mL. Até o momento, não se tem descrito na literatura efeitos citotóxicos de óleo de pequi em células cancerosas. Em trabalho em desenvolvimento no mesmo grupo de pesquisa, nanoemulsão de óleo de pequi e em associação com AA, o óleo livre e AA livre foram capazes de diminuir o número total de células de câncer de mama 4T1 e aumentar a porcentagem de células com fragmentação do DNA (até 50%). No entanto, apenas o PeNe+AA aumentou o número de células com lesão da membrana plasmática⁷⁶.

Os efeitos citotóxicos do óleo de pequi encontrados neste trabalho podem estar relacionado a composição do mesmo, sendo alto índice de ácidos oleico e palmítico e carotenóides. Os compostos presentes nos óleos são potenciais antioxidantes. É de conhecimento que compostos antioxidantes podem inibir a expressão de oncogenes o que impediria o desenvolvimento da angiogênese tumoral ou estimular a diferenciação celular, além de induzir resposta imunológica com ativação de células T-citotóxicas⁷⁷.

A nanoformulação do óleo de pequi manteve efeito citotóxico em células de melanoma quando comparada ao efeito do óleo livre. O valor de IC₅₀ para a formulação foi igual a 102,6 µg/mL para PeNe em tempo de tratamento de 24 horas. A concentração de 90 µg/mL de PeNe foi utilizada para base de nanoemulsão com ácido anacárdico por se encontrara perto do valor de IC₅₀.

O valor IC₅₀ do ácido anacárdico (15:1) foi previamente descrito como 8 µM na linhagem celular B16F10 em um período de 72 horas⁷⁸. Até onde sabemos, o valor IC₅₀ de 15:0 análogo AA em B16F10 não foi descrito anteriormente. No presente estudo o análogo de AA (15:0) apresentou valor de IC₅₀ no tratamento de células de melanoma igual a 64,61 µM em 24 horas e 46,68 µM em 48 horas (Figura 13). Em outros estudos o AA mostrou inibição da proliferação em várias células cancerígenas, como leucemia (KBM-5), células T de linfoma (Jukart), adenocarcinoma de pulmão (H1299), câncer de

próstata (Du145) e carcinoma espinocelular (SCC4). Esse efeito foi associado à morte celular por apoptose através da modulação NF- κ B³⁸. AA também inibiu a proliferação celular de linhas celulares de câncer de mama positivas para ER α ³², linhas celulares osteossarcoma (U2OS) e carcinoma pulmonar SW1573⁶³.

Mesmo apresentando efeito citotóxico satisfatório em reduzir a viabilidade de células cancerosas, o AA apresenta característica hidrofóbica (solubilidade em DMSO e etanol), particularidade que dificulta aplicação em via de administração intravenosa e pode diminuir biodisponibilidade em organismos vivos. A utilização de nanoestruturas como nanoemulsão de óleo de pequi alteraria a característica hidrofóbica do composto, possivelmente aumentando biodisponibilidade de AA. Além disso, a combinação dos efeitos entre o óleo de pequi e o ácido anacárdico pode alterar mecanismos intracelulares distintos.

O encapsulamento de AA reduziu o valor de IC₅₀ de 64,61 μ M (AA) para 48,78 μ M (PeNe+ AA) em um período de 24 horas, enquanto em 48 horas de exposição a diferença estava entre 46,68 μ M (AA) a 39,80 μ M (PeNe + AA).

O efeito de redução da dose do ácido anacárdico nesse estudo também pode estar associada à sua forma farmacêutica como nanoemulsão. De um lado é conhecido que o ácido anacárdico possui característica hidrofóbica devido sua cadeia lateral hidrofóbica⁷⁹; e de outro lado, já é demonstrado que nanoemulsão é um modelo farmacêutico de interesse para aumento de biocompostos hidrofóbicos, como curcumina e resveratrol⁸⁰

Em outro estudo o modelo de carregamento conjugado de gemcitabine e docetaxel com ácido anacárdico em nanopartículas de albumina proporcionou uma liberação sustentada e a internalização celular com localização nuclear dos fármacos. Esse modelo diminuiu significativamente o IC₅₀ dos fármacos⁸¹.

O índice de combinação é um indicador de tipos de combinação para dois ou mais compostos³⁷. Quando seu valor é menor que 1 indica que existe um sinergismo, quando igual a 1 indica efeito aditivo e quando maior que 1, os compostos são antagonistas.⁸². No presente estudo, o índice de combinação obtido pela combinação de ácido anacárdico e óleo de pequi em sistema de nanoemulsão foi igual a 0,795 o que indica atividade combinatória nesse sistema de sinergismo. Essa atividade combinatória diminuiu a dose de óleo de pequi em 4 vezes e de ácido anacárdico em 1,8 vezes.

Sinergismo é um efeito combinatório que consiste na utilização de fármacos com mecanismos de ação diferentes a fim de obter efeitos mais expressivos do que os mesmos utilizados separadamente. Esse tipo de efeito de combinação é satisfatório quando há efeitos colaterais dependentes de dose que serão reduzidos ao utilizar a combinação dos dois fármacos e consequentemente reduzir as doses⁸³.

Foi possível observar neste trabalho a diminuição da quantidade de células em ensaio de proliferação celular (parâmetro de curto prazo) e clonogenicidade (parâmetro de longo prazo). Já na avaliação morfológica em microscopia de luz (Figura 15), pôde-se perceber diminuição na densidade celular após exposição a PeNE +AA e AA corroborando com o ensaio de número de células totais (Figura 14). No ensaio morfológico por citometria de fluxo as células tratadas com os grupos de PeNe, PeNe+AA e AA apresentaram parâmetro de FCS (tamanho) alterado, enquanto apenas o grupo de AA não apresentou alteração no parâmetro de granulosidade (SSC) (Figura 18). O aumento de granulosidade pode ser um sinal de morte celular por autofagia

A longo prazo as células de câncer de pele melanoma apresentaram ineficácia em desenvolver novas colônias após exposição ao AA e PeNE +AA. Esse dado pode estar relacionado com tratamentos que danificam processo de replicação celular como resultado de danos aos cromossomos, apoptose, etc⁸⁴.

Na sequência, a fim de estudar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no processo de redução da viabilidade/morte celular das células de câncer de pele melanoma tratadas com óleo de pequi e ácido anacárdico, os ensaios a seguir foram feitos e alterações em organelas locais intracelulares de atuação de PeNe, PeNe+AA e AA foram avaliados.

A mitocôndria é responsável pela produção de energia celular e tem um papel crucial no processo de apoptose, principalmente pela via intrínseca⁸⁵. PeNe+AA e AA levaram à despolarização significativa da PMM (76,53 e 39,8%, respectivamente, $p < 0,001$) (Figura 19). A nanoformulação de AA aumentou a despolarização de PMM comparado ao AA. Esse dado sugere que a formulação nanoestruturada de pequi com AA aumentou toxicidade a mitocôndria do AA, devido a possível direcionamento ou afinidade por tal organela da nanoemulsão.

A alteração da PMM é um evento precoce do processo de apoptose que causa a liberação do citocromo c no citosol, o início da ativação da caspase e a morte celular pela

apoptose. AA também induziu despolarização na membrana mitocondrial no câncer de mama triplo-negativo MDA-MB-231, *in vitro*⁸⁶.

O lisossomo tem sido associado às mitocôndrias por desempenhar um papel na morte das células cancerígenas⁸⁶. Por muito tempo, os lisossomos foram considerados como compartimentos de reciclagem e descarte⁸⁶. Mas, atualmente, a permeabilização lisossômica e a liberação de proteases no citosol são conhecidas por estar conectada a processos de morte celular como apoptose e autofagia. Esse tipo de morte causado por AA já foi descrito anteriormente em células de câncer de próstata via estresse oxidativo em retículo endoplasmático e via de sinalização de DAPK3/AKT³⁴. A presença de proteases lisossômicas no citosol desencadeia a liberação e disfunção mitocondrial da caspase⁸⁶. Foi observado neste estudo aumento da permeabilidade do lisossomo em células tratadas com Pene+AA e AA (Figura 17), indicando sinal de apoptose ou autofagia e complementando o resultado de PMM.

Em contrapartida, ao se analisar a permeabilidade de azul tripan em células tratadas com PeNe+AA e AA, foi observada diferença significativa na porcentagem de células coradas no grupo PeNe+AA. Células com membrana plasmáticas intactas não apresentam permeabilidade a azul de tripan, enquanto células com membranas lesionadas são coradas pelo corante. A membrana plasmática é uma barreira física da célula que a protege do ambiente extracelular. A perda de sua integridade leva à alteração da homeostase celular e inicia o processo de morte celular. Os danos à membrana plasmática geralmente estão associados à necrose. No entanto, estudos relatam ruptura da membrana plasmática nos estágios finais da apoptose⁸⁶.

As espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS) são subprodutos celulares normais que desempenham um papel importante no metabolismo celular. No câncer, a ROS tem um papel duplo promovendo carcinogênese e proliferação celular e pode causar vários danos celulares e levar à morte celular de acordo com seu nível intracelular⁸⁷. Sabe-se que um aumento na produção de ROS é principalmente relacionado ao estresse mitocondrial⁸⁸. Neste, o AA e PeNe+AA aumentaram significativamente o nível de ROS nas células de melanoma B16F10 (40% e 20% respectivamente, $p < 0,001$) (Figura 20). Nosso resultado diverge de outros estudos que relataram a atividade antioxidante do AA e a redução da produção de ROS em diferentes células cancerosas⁸⁹. A diminuição dos níveis de ROS, quando comparado ao grupo AA, em grupo de PeNE+AA pode ter sido

causada pela presença de compostos antioxidantes no óleo de pequi que seriam um contraponto ao estresse oxidativo observado nesta linhagem.

As alterações da permeabilidade de membrana lisossomal e do potencial mitocondrial pode desestabilizar as trocas de cálcio (Ca^{2+}) com outra organela abundante, o retículo endoplasmático (RE)⁹⁰. O RE é responsável pela regulação da síntese de proteínas e da homeostase do Ca^{2+} . O Ca^{2+} é principalmente armazenado no RE, realiza um papel importante como regulador do metabolismo celular e está envolvido em processos fisiológicos como proliferação celular e apoptose⁹¹. Seong e colaboradores (2013) relataram que o AA induziu a liberação dependente de tempo de Ca^{2+} no citosol e no estresse do RE no carcinoma do pulmão humano (A549), levando à morte celular por autofagia²³. No entanto, nenhuma alteração do nível de Ca^{2+} foi observada após a exposição aos tratamentos de PeNe+AA e AA em células de melanoma (B16F10) nas presentes condições testadas (Figura 22).

Neste trabalho relatou-se pela primeira vez que o AA afetou a proliferação celular, reduziu o tamanho celular, induziu despolarização da membrana mitocondrial, aumentou permeabilidade da membrana do lisossomo e aumento da produção de ROS nas células de melanoma B16F10 in vitro. Além disso, nenhuma membrana plasmática e nenhum estresse no ER foram observados. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que o AA apresenta efeitos antiproliferação e afeta significativamente importantes estruturas celulares do melanoma que são comumente afetadas durante a apoptose ou a morte celular da autofagia⁹².

O ensaio de RTCA (*“Real time cell analysis”*) consiste em um método de análise de células em tempo real e é uma técnica baseada em eletrodos de impedância e microssensores. O sistema RTCA permite monitoramento contínuo, em tempo real e contínuo da adesão, morfologia, migração e taxa de proliferação celular⁹³. O índice celular é a representação da interação das células com um eletrodo de ouro no fundo da placa, no caso da E-plate (placa de proliferação) e na face inferior na CIM-Plate (placa de migração), e a correlação com a impedância. As leituras eletrônicas mudam à medida que as células se conectam ou se desconectam dos eletrodos de superfície, produzindo uma alteração na impedância que é calculada através de algoritmos matemático e plotada como valores do índice celular (*“Cell Index”*). Há uma correlação direta entre o número de células conectadas e a leitura do índice celular no equipamento e vice-versa. Essa

leitura de impedância pode ser afetada pela qualidade das interações celulares e pelas propriedades aderentes entre cada célula e os eletrodos⁹⁴.

Nos ensaios de impedância celular desenvolvidos neste trabalho, a proliferação foi diminuída no grupo tratado com AA acompanhada de redução pela metade do tempo de duplicação (Figura 15). O efeito citotóxico de AA em células cancerosas foi observada em outros estudos por diversos mecanismos de ação²⁷⁻³². Em estudo com células de adenoma pituitário (GH3 e MMQ), AA induziu um tipo de morte celular por apoptose independente de caspase, onde houve inibição de acetilação de histonas, causando parada no ciclo celular na fase S. A acetilação de histonas é cada vez mais reconhecida como um importante regulador do crescimento e proliferação de células tumorais³³. Pode-se supor que a diminuição na proliferação e tempo de duplicação podem estar associados ao mecanismo descrito anteriormente como inibidor de HAT, restringindo proliferação em melanoma por parada no ciclo celular. É necessária avaliação de perfil de ciclo celular assim como capacidade de inibição de HAT em células de melanoma expostas a AA.

Nos grupos tratados com PeNe e Pene+AA não observou-se diferença no ensaio de proliferação por RTCA (Figura 15), indicando que o mecanismo de ação da redução de viabilidade observada no ensaio de MTT (Figura 14) é diferente do mecanismo de ação do AA. Como o ensaio de RTCA depende da função de adesão das células, pode-se inferir que a redução da viabilidade celular observada nos grupos com a nanoemulsão não estão relacionadas à perda da adesão celular.

Vários extratos de ervas foram investigados nas células de câncer de mama MDA - MB - 231 e MCF - 7 como o extrato vegetal de *Thymus serpyllum* nas células MDA - MB - 231 foi medido usando um sistema RTCA iCELLigence⁹⁵. Medidas dinâmicas de impedância em tempo real por xCELLigence indicaram os compostos hemantamina, licorina e hemantidina suprimem a proliferação celular de adenocarcinoma humano SK-BR-3 após 10 horas de tratamento em uma concentração de 10 μM ⁹⁶.

O ensaio de “scratch” *in vitro* é um método direto e econômico para investigar a migração celular. É baseado na observação da movimentação das células da borda que, após a criação de uma lacuna artificial, chamada de “risco”, em uma monocamada celular confluyente, se moverão em direção à abertura para fechar o “risco” até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente. Uma das principais vantagens desse método simples é que ele mimetiza, em certa medida, a migração de células *in vivo*. Por

exemplo, a remoção de parte do endotélio nos vasos sanguíneos induzirá a migração de células endoteliais para a área a fim de fechar a ferida⁹⁷. No presente trabalho a redução da taxa de migração de AA e PeNe+AA foi igual a 80 e 75%, respectivamente.

Nos ensaios de avaliação do perfil de migração e invasão das células de câncer de pele melanoma, a nanoemulsão de óleo de pequi em associação com ácido anacárdico, assim como o composto livre, apresentaram atividade antimetastática. Na avaliação de migração por RTCA durante período de tratamento apenas AA reduziu a migração de B16F10, já em avaliação pós-tratamento as células tratadas com PeNe+AA e AA apresentaram inibição da migração (Figura 28). O perfil de invasão foi alterado em ambas condições de exposição a PeNe+AA e AA (Figura 29). Os dois tratamentos inibiram a invasão de células de câncer de pele melanoma em tempo durante e pós-tratamento.

Estudos anteriores apresentaram atividade antimetastática, reduzindo 52 a 63% a invasão, do ácido anacárdico em células de glioma U-87 através da diminuição da fosforilação de MAP quinase, inibição da translocação da expressão dos genes Sp1 e “*down-regulation*” de VEGF e Flt-1⁹⁸. Tendo como base mecanismo de inibição de migração descrito no estudo citado, e tratando-se de mecanismo epigenético, pode-se supor que o mesmo aconteça com B16F10 e por isso, o efeito pós-tratamento seja mais eficaz, de modo que é preciso acontecer a mudança nos genes em espaço de tempo de duplicação.

Outros produtos naturais diminuíram perfil de metástase de B16F10 como polifenóis de chá⁹⁹, morin-7-sulfato de sódio, um derivado de flavonoides, derivado de *Curcuma zedoaria* β -elemene¹⁰⁰, entre outros.

Estudo demonstrou que proteínas de matriz extracelular derivadas de queratinócitos, particularmente laminina-332, estão envolvidas na regulação da adesão, e migração de melanoma e melanócitos, em ensaio de RTCA, *in vitro*¹⁰¹. Outro estudo mostrou que a capacidade das células de melanoma de se moverem em direção a gradientes quimiotáticos, invadir matrizes de matrigel ou colágeno incorporado em fibroblastos e cruzar as monocamadas endoteliais são prevenidas por anticorpos anti-uPAR84-95 ou pelo peptídeo RI-3, que foi mostrado anteriormente com o efeito de inibir a interação uPAR84-95/FPR1¹⁰¹. O efeito das flavonas nas células de câncer de mama MCF7 foi avaliado através da análise de migração celular usando um sistema RTCA, constatando efeitos antimetastático e pró-apoptótico dos compostos nesta linhagem¹⁰¹.

Este estudo apresenta, pela primeira vez, avaliação de efeitos de nanoemulsões de óleo de pequi em associação com ácido anacárdico em células de câncer de pele melanoma. AA e PeNe+AA exibiram atividade antiproliferativa e anti-metastática contra células de melanoma afetando a função/estrutura das organelas principais. As alterações intracelulares observadas sugerem mecanismos de morte celular por apoptose. Estudos futuros são necessários para confirmação do mecanismo de ação dos ativos aqui descritos. Considerando os dados aqui mostrados, sugerimos que o nanossistema de nanoemulsão de óleo de pequi e ácido anacárdico, assim como os mesmos individualmente são uma biocompostos promissores para ser usada como adjuvante da terapia convencional do câncer.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- 1- As nanoemulsões desenvolvidas com lecitina de ovo e óleos da biodiversidade brasileira possuem parâmetros de diâmetro hidrodinâmico ($150,66 \pm 20,66$ nm a $182,13 \pm 0,83$ nm), índice de polidispersão ($0,217 \pm 0,009$ a $0,271 \pm 0,026$) e potencial zeta ($-17,6 \pm 0,9$ mV a $-40,3 \pm 8,5$ mV), sendo diferente para cada óleo.
- 2- A nanoformulação de ácido anacárdico em nanoemulsão de óleo de pequi apresentaram parâmetros de diâmetro hidrodinâmico igual a $166,24 \pm 38,27$ nm, índice de polidispersão igual a $0,261 \pm 0,024$ e potencial zeta de $-47,5 \pm 10,6$ mV.
- 3- Nos ensaios de citotoxicidade, *in vitro*, o óleo de pequi reduziram a viabilidade celular de células de câncer de pele melanoma (B16F10) em razão tempo e dose-dependente. O valor de IC_{50} encontrado para tratamento de 24 horas foi de $109,3$ μ g/mL para OL Pe.
- 4- As nanoemulsões de óleo de pequi reduziram em aproximadamente 80% na maior concentração a viabilidade celular de células de câncer de pele melanoma (B16F10) de mesma maneira que os óleos livres, ou seja, tempo e dose dependente. O valor de IC_{50} para as formulações foi igual a $102,6$ μ g/mL para PeNe em tempo de tratamento de 24 horas.
- 5- A única alteração em organelas encontrada nas células tratadas com PeNe foi o aumento da granulabilidade em ensaio de citometria de fluxo, parâmetro compatível a morte celular por autofagia.
- 6- O ácido anacárdico apresentou atividade citotóxica em células de câncer de pele melanoma com efeito tempo e dose-dependente e valor de IC_{50} igual a 22 μ g/mL em 24 horas e 16 μ g/mL em 48 horas. Na concentração de IC_{50} , AA duplicou o tempo de proliferação de B16F10 em ensaio de RTCA. Nos ensaios de migração e invasão foi possível observar atividade antimetastática do ácido anacárdico em

células de câncer de pele melanoma.

- 7- O ácido anacárdico apresentou alterações intracelulares compatíveis com morte celular por apoptose tais como: aumento da permeabilidade de membrana lisossômica, aumento de ROS intracelular e despolarização de membrana mitocondrial.

- 8- Ao serem associados nanoemulsão de óleo de pequi e AA apresentaram índice de combinação compatível com efeito de sinergismo. A redução de dose para AA foi igual a 1,8 vezes. O perfil de inibição de metástase e invasão em condição de pós-tratamento encontrado na combinação dos dois fármacos foi similar ao do composto sozinho.

7. PERSPECTIVAS

- 1- Avaliação de taxa de eficiência de encapsulamento é necessária para quantificar AA dentro da nanoemulsão;
- 2- Mais estudos para avaliar mecanismo de ação são necessários tais como ensaio de exposição de fosfatidilserina e ciclo celular, além de liberação de caspases;
- 3- Ensaio de expressão de proteínas de migração são necessários para elucidar o mecanismo de ação envolvida na atividade antimetastática encontrada;
- 4- Ensaio em células normais devem ser realizados para verificar toxicidade em células não-cancerosas além de sua seletividade;
- 5- Ensaio *in vivo* são necessários para efeitos em organismos vivos, como metabolismo, biodisponibilidade e toxicidade.

6- REFERÊNCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
2. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil /– Rio de Janeiro : INCA, 2019. 1384. 300.
3. Khazaei Z, Ghorat F, Jarrahi A, Adineh H, Sohrabivafa M, Goodarzi E. Global Incidence And Mortality Of Skin Cancer By Histological Subtype And Its Relationship With The Human Development Index (Hdi); An Ecology Study In 2018. 2019;
4. Aladowicz E, Leda Ferro, Giulio Cesare Vital, Elisabetta Venditti LF, Lanfrancone L. Molecular networks in melanoma invasion and metastasis. *Future Oncology* [Internet]. 2013;9(5)(1479–6694):713–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0470025077.chap16>
5. WHO. Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme, World Health Organization.No Title. 2020. p. <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.ht>.
6. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2016 Jun 29;16(6):345–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
7. Chen S, Yang K, Tuguntaev RG, Mozhi A, Zhang J, Wang PC, et al. Targeting tumor microenvironment with PEG-based amphiphilic nanoparticles to overcome chemoresistance. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [Internet]. 2016 Feb;12(2):269–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415005894>
8. Iqbal J, Abbasi BA, Ahmad R, Batool R, Mahmood T, Ali B, et al. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2019 Jan;109(June 2018):1381–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218338538>

9. Kanwar JR, Singh N, Kanwar RK. Role of nanomedicine in reversing drug resistance mediated by ATP binding cassette transporters and P-glycoprotein in melanoma R review. 2011;6:701–14.
10. Keshamouni V, Arenberg D, Kalemkerian G. Lung Cancer Metastasis [Internet]. Keshamouni V, Arenberg D, Kalemkerian G, editors. Lung Cancer Metastasis: Novel Biological Mechanisms and Impact on Clinical Practice. New York, NY: Springer New York; 2010. 1–409. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0772-1>
11. Weinberg RA. Biology of the Cancer. Garland Science. 2014.
12. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. Molecular Cancer Research. 2011.
13. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. Developmental Cell [Internet]. 2010 Jun;18(6):884–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>
14. Penta D, Somashekar BS, Meeran SM. Epigenetics of skin cancer: Interventions by selected bioactive phytochemicals. Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine. 2018;34(1):42–9.
15. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. Nature Reviews Cancer [Internet]. 2005 Mar;5(3):161–71. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc1566>
16. Chen S hong, Lahav G. Two is better than one; toward a rational design of combinatorial therapy. Current Opinion in Structural Biology. 2016.
17. McClements DJ. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. Therapeutic Delivery [Internet]. 2013 Jul;4(7):841–57. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/tde.13.46>
18. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Drug therapy: Systemic therapy for colorectal cancer. New England Journal of Medicine. 2005.

19. Yuan B, Imai M, Kikuchi H, Fukushima S, Hazama S, Akaike T, et al. Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy. In: Apoptosis and Medicine. 2012.
20. Biazotto KR, de Souza Mesquita LM, Neves BV, Braga ARC, Tangerina MMP, Vilegas W, et al. Brazilian Biodiversity Fruits: Discovering Bioactive Compounds from Underexplored Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Internet]. 2019 Feb 20;67(7):1860–76. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b05815>
21. Saklani A, Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. 2008;13(3–4):161–71.
22. Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: A rapidly evolving field. *British Journal of Cancer* [Internet]. 2013;109(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.280>
23. Chen X, Chang L, Qu Y, Liang J, Jin W, Xia X. Tea polyphenols inhibit the proliferation, migration, and invasion of melanoma cells through the down-regulation of TLR4. 2018;(20).
24. Yang C-C, Hung C-F, Chen B-H. Preparation of coffee oil-algae oil-based nanoemulsions and the study of their inhibition effect on UVA-induced skin damage in mice and melanoma cell growth. *International Journal of Nanomedicine* [Internet]. 2017 Sep;Volume 12:6559–80. Available from: <https://www.dovepress.com/preparation-of-coffee-oil-algae-oil-based-nanoemulsions-and-the-study--peer-reviewed-article-IJN>
25. Wang H, Oo Khor T, Shu L, Su Z-Y, Fuentes F, Lee J-H, et al. Plants vs. Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [Internet]. 2012 Nov 1;12(10):1281–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583408>
26. Frago MF, Prado MG. Inhibition of Mouse Urinary Bladder Carcinogenesis by Açai Fruit (*Euterpe oleracea* Martius) Intake. 2012;235–41.

27. Monge-Fuentes V, Muehlmann LA, Longo JPF, Silva JR, Fascineli ML, de Souza P, 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* [Internet]. 2017 Jan;166:301–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.002>
28. Sampaio MC. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama in vitro. 2017;87.
29. In vitro antibacterial action on methicillin-susceptible (MSSA) and methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus* and antitumor potential of *Mauritia flexuosa* L. f. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2014;
30. Lima A de, Silva AM de O e, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura* [Internet]. 2007;29(3):695–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452007000300052&lng=pt&tlng=pt
31. Gandhi T, Patel M, Dholakiya B kumar. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. *J Nat Prod Plant Resour* [Internet]. 2012;2(1):135–42. Available from: <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
32. Hamad F, Mubofu E. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2015 Apr 16;16(12):8569–90. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/4/8569>
33. Sukumari-Ramesh S, Singh N, Jensen MA, Dhandapani KM, Vender JR. Anacardic acid induces caspase-independent apoptosis and radiosensitizes pituitary adenoma cells. *Journal of Neurosurgery* [Internet]. 2011 Jun;114(6):1681–90. Available from: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/114/6/article-p1681.xml>

34. Tan J, Jiang X, Yin G, He L, Liu J, Long Z, et al. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway. *Oncology Reports* [Internet]. 2017 Mar;38(3):1373–82. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5841>
35. Schultz DJ, Krishna A, Vittitow SL, Alizadeh-Rad N, Muluhngwi P, Rouchka EC, et al. Transcriptomic response of breast cancer cells to anacardic acid. *Scientific Reports* [Internet]. 2018;8(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26429-x>
36. Lipka D, Legut M, Filipczak N, Gubernator J, Piwoni A, Kozubek A. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines – in vitro studies. *International Journal of Nanomedicine* [Internet]. 2014 Jan;9(1):653. Available from: <http://www.dovepress.com/anacardic-acid-enhances-the-anticancer-activity-of-liposomal-mitoxantr-peer-reviewed-article-IJN>
37. Kushwah V, Katiyar SS, Dora CP, Kumar Agrawal A, Lamprou DA, Gupta RC, et al. Co-delivery of docetaxel and gemcitabine by anacardic acid modified self-assembled albumin nanoparticles for effective breast cancer management. *Acta Biomaterialia* [Internet]. 2018;73:424–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.057>
38. Shilpa P, Kaveri K, Salimath BP. Anti-metastatic action of anacardic acid targets VEGF-induced signalling pathways in epithelial to mesenchymal transition. *Drug Discoveries & Therapeutics* [Internet]. 2015;9(1):53–65. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/ddt/9/1/9_2014.01042/_article
39. Oliveira LG, Moreno LG, Melo DS, Costa-Pereira LV, Carvalho MM de F, Silva PHE, et al. Caryocar brasiliense oil improves cardiac function by increasing Serca2a/PLB ratio despite no significant changes in cardiovascular risk factors in rats. *Lipids in Health and Disease* [Internet]. 2017 Dec 8;16(1):37. Available from: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-017-0422-9>
40. Roll MM, Miranda-Vilela AL, Longo JPF, Agostini-Costa T da S, Grisolia CK. The pequi pulp oil (Caryocar brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in

- females. *Genetics and Molecular Biology* [Internet]. 2018 Dec;41(4):858–69. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572018000500858&tlng=en
41. Vale AF, Ferreira HH, Benetti EJ, Rebelo ACS, Figueiredo ACR, Barbosa EC, et al. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. *Brazilian Journal of Biology*. 2019;79(2):257–62.
 42. Torres LR de O, Santana FC de, Torres-Leal FL, Melo ILP de, Yoshime LT, Matos-Neto EM, et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. 2016 Nov;97:205–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.009>
 43. Colombo NBR, Rangel MP, Martins V, Hage M, Gelain DP, Barbeiro DF, et al. *Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [Internet]. 2015 Jul 21;48(9):852–62. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2015000900852&lng=en&tlng=en
 44. Miranda-Vilela AL, Pereira LCS, Gonçalves CA, Grisolia CK. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. *Nutrition Research* [Internet]. 2009 Dec;29(12):850–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2009.10.022>
 45. Mignani S, Bryszewska M, Klajnert-Maculewicz B, Zablocka M, Majoral JP. Advances in combination therapies based on nanoparticles for efficacious cancer treatment: An analytical report. *Biomacromolecules*. 2015;16(1):1–27.
 46. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. 2012;8(6):1719–29.
 47. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2012;12(1):39–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3180>

48. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today* [Internet]. 2010;15(19–20):842–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006>
49. Odriozola-Serrano I, Oms-Oliu G, Martín-Belloso O. Nanoemulsion-Based Delivery Systems to Improve Functionality of Lipophilic Components. *Frontiers in Nutrition* [Internet]. 2014 Dec 5;1(December):1–4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2014.00024/abstract>
50. Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015.
51. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014.
52. Chaturvedi VK, Singh A, Singh VK, Singh MP. Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Drug Metabolism*. 2018;20(6):416–29.
53. Cryer AM, Thorley AJ. Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacology & Therapeutics* [Internet]. 2019 Jun;198:189–205. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.010>
54. Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [Internet]. 2011;21(1):55–76. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1)
55. Pascual-Villalobos MJ, Guirao P, Díaz-Ba os FG, Cantú-Tejero M, Villora G. Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In: *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*. 2019.
56. Shanmugapriya K, Kim H, Saravana PS, Chun B-S, Kang HW. Astaxanthin-alpha tocopherol nanoemulsion formulation by emulsification methods: Investigation on anticancer, wound healing, and antibacterial effects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [Internet]. 2018 Dec;172:170–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776518305733%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30172200>

57. Barani M, Mirzaei M, Torkzadeh-Mahani M, Nematollahi MH. Lawsons-loaded Niosome and its antitumor activity in MCF-7 breast Cancer cell line: a Nano-herbal treatment for Cancer. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2018 Jul 27; Available from: <https://darujps.biomedcentral.com/articles/10.1007/s40199-018-0207-3>
58. Al-Otaibi WA, Alkhatib MH, Wali AN. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in breast and cervical cancer cells upon coadministration of mitomycin C and essential oils in nanoemulsion formulations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2018 Oct;106(May):946–55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.041>
59. Chou T-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research* [Internet]. 2010 Jan 15;70(2):440–6. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
60. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [Internet]. 2016 Aug;235:337–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303832>
61. Repnik U, Česen MH, Turk B. The Use of Lysosomotropic Dyes to Exclude Lysosomal Membrane Permeabilization. *Cold Spring Harbor Protocols* [Internet]. 2016 May 2;2016(5):pdb.prot087106. Available from: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot087106>
62. Linkov P, Artemyev M, Efimov AE, Nabiev I. Comparative advantages and limitations of the basic metrology methods applied to the characterization of nanomaterials. *Nanoscale* [Internet]. 2013;5(19):8781. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5TC02043C>
63. Choi SJ, McClements DJ. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic nutraceuticals: strategies for improving their formulation, stability, functionality and bioavailability. *Food Science and Biotechnology* [Internet]. 2020 Feb 24;29(2):149–68. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00731-4>
64. Montes de Oca-Ávalos JM, Candal RJ, Herrera ML. Nanoemulsions: stability and physical properties. *Current Opinion in Food Science*. 2017;16:1–6.

65. Baldissera MD, da Silva AS, Oliveira CB, Zimmermann CEP, Vaucher RA, Santos RCV, et al. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: In vitro tests. *Experimental Parasitology*. 2013;
66. Justi PN, Sanjinez-Argandoña EJ, Macedo MLR. Microencapsulation of pequi pulp oil by complex coacervation. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2018;
67. Bovi GG, Petrus RR, Pinho SC. Feasibility of incorporating buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil nanoemulsions in isotonic sports drink. *International Journal of Food Science & Technology* [Internet]. 2017 Oct;52(10):2201–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.13499>
68. Leão KMM, Reis LVC, Speranza P, Rodrigues AP, Ribeiro APB, Macedo JA, et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids nanoemulsions. *Biotechnology Reports* [Internet]. 2019 Dec;24:e00365. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215017X1930164X>
69. Carvalho da Silva L, Alves do Nascimento M, Guabiraba Mendes L, Ferro Furtado R, Correia da Costa JM, Luiz Herzog Cardoso A. Optimization of cashew gum and chitosan for microencapsulation of pequi oil by complex coacervation. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018;
70. Agrawal N, Maddikeri GL, Pandit AB. Sustained release formulations of citronella oil nanoemulsion using cavitation techniques. *Ultrasonics Sonochemistry* [Internet]. 2017 May;36:367–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417716304357?via%3Dihub>
71. Wongsagonsup R, Shobsngob S, Oonkhanond B, Varavinit S. Zeta Potential (?) Analysis for the Determination of Protein Content in Rice Flour. *STARCH - STÄRKE* [Internet]. 2005 Jan;57(1):25–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/star.200400307>
72. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*

- [Internet]. 2018 Jan;270:203–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>
73. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [Internet]. 2016 Aug;235:337–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
 74. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* [Internet]. 2002 Nov 18;69(2):581–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
 75. CATE R ten, KRAWCZYK P, STAP J, ATEN JA, FRANKEN NAP. Radiosensitizing effect of the histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid on various mammalian cell lines. *Oncology Letters* [Internet]. 2010 Jul;1(4):765–9. Available from: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol_00000134
 76. Alicia S. Ombredane^{1, 2}; Victor H.S. Araújo^{1, 2}; Gabriela M.V. de Souza^{1, 2}; Ricardo B. Azevedo², Graziella A. Joanitti^{1, 2 3*}. Anticancer activity of anacardic acid associated to pequi oil based-nanoemulsion in breast cancer cells. In *ICONNANO*; 2018.
 77. Mazhar K, Yang Y, Wang S, Sun G. Role of vitamin E in prevention of human esophageal squamous cell carcinoma : a review *Esophageal squamous cell cancer. Science Letters*. 2015;3(2):89–93.
 78. Chou T-C, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends in Pharmacological Sciences* [Internet]. 1983 Jan;4:450–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016561478390490X>
 79. Roshan Moniri M, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai LJ, Warnock GL. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*. 2015;67(2):379–86.
 80. Türker Şener L, Albeniz G, Dinç B, Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine* [Internet]. 2017 Sep;14(3):1866–70. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2017.4781>

81. Havelek R, Muthna D, Tomsik P, Kralovec K, Seifrtova M, Cahlikova L, et al. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions* [Internet]. 2017;275:121–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.018>
82. Stefanowicz-Hajduk J, Ochocka JR. Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicology Reports* [Internet]. 2020;7(January):335–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.002>
83. Thompson Coon J. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Focus on Alternative and Complementary Therapies [Internet]. 2010 Jun 14;7(2):207–207. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-7166.2002.tb05480.x>
84. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* [Internet]. 2006 Dec 21;1(5):2315–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.339>
85. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* [Internet]. 2004 Apr 12;23(16):2881–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/1207512>
86. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*. 2018.
87. Ivanova H, Kerkhofs M, Rovere RML, Bultynck G. Endoplasmic reticulum-mitochondrial Ca²⁺ fluxes underlying cancer cell survival. *Frontiers in Oncology*. 2017.
88. Weinberg F, Ramnath N, Nagrath D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers* [Internet]. 2019 Aug 16;11(8):1191. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/8/1191>
89. Sung B, Pandey MK, Ahn KS, Yi T, Chaturvedi MM, Liu M, et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhib. *Blood*

- [Internet]. 2008 May 15;111(10):4880–91. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-10-117994>
90. Seong YA, Shin PG, Yoon JS, Yadunandam AK, Kim G do. Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Human Lung Carcinoma A549 Cells by Anacardic Acid. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2014;
 91. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* [Internet]. 2007 Feb 1;2(2):329–33. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.30>
 92. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [Internet]. 2015 Jun 20;16(6):329–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3999>
 93. Li H-W, Zou T-B, Jia Q, Xia E-Q, Cao W-J, Liu W, et al. Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2016 Dec;84:909–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.001>
 94. Shi H, Liu L, Liu L, Geng J, Zhou Y, Chen L. b -Elemene inhibits the metastasis of B16F10 melanoma cells by downregulation of the expression of uPA , uPAR , MMP-2 , and MMP-9. :99–107.
 95. Chung H, Suh E-K, Han I-O, Oh E-S. Keratinocyte-derived Laminin-332 Promotes Adhesion and Migration in Melanocytes and Melanoma. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2011 Apr 15;286(15):13438–47. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.166751>
 96. Ragone C, Minopoli M, Ingangi V, Botti G, Fratangelo F, Pessi A, et al. Targeting the cross-talk between Urokinase receptor and Formyl peptide receptor type 1 to prevent invasion and trans-endothelial migration of melanoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [Internet]. 2017 Dec 8;36(1):180. Available from: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-017-0650-x>
 97. Lin C-H, Chang C-Y, Lee K-R, Lin H-J, Chen T-H, Wan L. Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway. *BMC Cancer*

- [Internet]. 2015 Dec 16;15(1):958. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1965-7>
98. Christensen ME, Jansen ES, Sanchez W, Waterhouse NJ. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods* [Internet]. 2013 Jun;61(2):138–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202313000893>
99. Zhao Q, Zhang X, Cai H, Zhang P, Kong D, Ge X, et al. Anticancer effects of plant derived anacardic acid on human breast cancer MDA-MB-231 cells. *American Journal of Translational Research*. 2018;
100. Bartel K, Pein H, Popper B, Schmitt S, Janaki-Raman S, Schulze A, et al. Connecting lysosomes and mitochondria - A novel role for lipid metabolism in cancer cell death. *Cell Communication and Signaling*. 2019;
101. Todkar K, Ilamathi HS, Germain M. Mitochondria and Lysosomes: Discovering Bonds. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2017 Dec 7;5(DEC):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2017.00106/full>

De: European Journal of Pharmaceutical Sciences
Enviado: quarta-feira, 19 de fevereiro de 2020 00:24
Para: patricia_costa@hotmail.com
Assunto: Track your recent Co-Authored submission to EJPS

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Patricia Costa,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: European Journal of Pharmaceutical Sciences
Title: Anacardic acid affects key cellular structures and inhibits metastatic behavior of melanoma cells.
Corresponding Author: Graziella Joanitti
Co-Authors: Patricia Costa; Alicia Ombredane; Beatriz Faria; Lucas Silva; Cleonice Holanda; Andressa Oliveira; Luiz Romeiro; Ricardo Azevedo;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here:

https://nam11.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fees.elsevier.com%2Fjps%2Fdefault.asp%3Facw%3D%26pg%3DpreRegistration.asp%26user%3Dcoauthor%26fname%3DPatricia%26lname%3DCosta%26email%3Dpatricia_lcosta%40hotmail.com&data=02%7C01%7C%7Cb46227b42ed345a1edf208d7b4eb3dfa%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637176794752008074&sd=ur8onv2quE0WiCTCHZJ4Bv2u7Q86b7O9l%2Fcckd%2FGAs%3D&reserved=0

Or log in:

https://nam11.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fees.elsevier.com%2Fjps%2Fdefault.asp%3Facw%3D%26pg%3Dlogin.asp%26email%3Dpatricia_lcosta%40hotmail.com&data=02%7C01%7C%7Cb46227b42ed345a1edf208d7b4eb3dfa%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637176794752008074&sd=CcBFkHtNTbTFvEkHFU1B0BSBDucztk4v%2F8VP91Tn3Ww%3D&reserved=0

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at bygra1@gmail.com.

Thank you,

European Journal of Pharmaceutical Sciences

February 19, 2020.

COVER LETTER

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled “*Anacardic acid affects key cellular structures and inhibits metastatic behavior of melanoma cells*” for consideration for publication in *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.

It is known that the investigation of novel therapeutic approaches for melanoma skin cancer is fundamental to complement conventional clinical procedures. In this context, phytochemicals have been studied as potent adjuvants and chemopreventives in order to improve prognosis of this type of cancer. Previous studies have reported the effects of anacardic acid (a bioactive compound found in cashew nutshell liquid), in cancer prevention and treatment, including melanoma; however, there are few studies showing data regarding its intracellular targets and its influence in melanoma metastatic features. In this regard, we consider that our manuscript represents a significant advance in this field.

The present work is a research paper (*4 figures*) that highlights significant dose- and time-dependent antitumoral effects of anacardic acid against melanoma cells (B16F10) ($p < 0.001$), along with its effects on cell proliferation (short and long-term), on key cellular structures (mitochondria, lysosome, endoplasmic reticulum, plasma membrane), and on metastatic features (migration and invasion).

To the best of our knowledge, this is the first study to report how anacardic acid show anticancer activity by affecting organelles function and inhibiting migration and invasion of melanoma cells, evidencing the power phytochemicals as complement molecules in cancer therapy.

Altogether, we consider that our findings make a significant contribution at the interface of the field of pharmaceutical sciences; they present a great potential for citation in the scientific community; and they are likely to be of great interest to the readers of your journal. This is an original study that has not been published either in part or as a whole.

All authors have approved the manuscript and this submission. We suggest the following potential Referees for this manuscript:

1) Dr Ranjit K. Harwansh

Institute of Pharmaceutical Research, GLA University, Mathura, 281406, India.

Electronic address: ranjit.harwansh@gla.ac.in, harwanshranjeet@gmail.com

2) Jinbao Liu:

State Key Lab of Respiratory Disease, Protein Modification and Degradation Lab, Department of Pathophysiology, Guangzhou Medical University, Guangdong 510182, People's Republic of China

Electronic address: jliu@gzhmu.edu.cn

3) Egid B. Mubofu:

Chemistry Department, University of Dar es Salaam, P.O. Box 35061, Dar es Salaam

Electronic address: ebmubofu@gmail.com

4) Dominik Lipka:

Department of Lipids and Liposomes, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Poland.

Electronic address: dlipka@ibmb.uni.wroc.pl

Thank you for receiving our manuscript and considering it for review. We appreciate your time and look forward to your response.

Sincerely,



Dr Graziella Anselmo Joanitti, Ms, PhD
Prof. Dr. Graziella Anselmo Joanitti
Matrícula FUB 1059581
Professora Adjunta
Universidade de Brasília

Correspondence should be addressed to: Prof. Dr. Graziella Anselmo Joanitti, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília-DF, 72220-275, Brazil; Phone: +55 61 9303-5251; e-mail: bygral@gmail.com.

Title Page**Title*****Anacardic acid affects key cellular structures and inhibits metastatic behavior of melanoma***

Patricia L. Costa^{1,2}, Alicia S. Ombredane^{1,3}, Beatriz C. de A. O. Faria^{1,3}, Lucas C. da Silva^{1,2}, Cleonice A. Holanda⁴, Andressa S. de Oliveira⁴, Luiz A. S. Romeiro⁴, Ricardo B. de Azevedo^{3,5}, Graziella A. Joanitti^{1,2,3,5,}*

¹ *Laboratory of Bioactive Compounds and Nanobiotechnology (LBCNano), University of Brasília, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília-DF, 72220-275, Brazil.*

² *Post-Graduation Program in Sciences and Technologies in Health, Faculty of Ceilandia, University of Brasília, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília-DF, 72220-275, Brazil.*

³ *Post-Graduation Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil.*

⁴ *Laboratory of Development of Therapeutic Innovations (LDT), Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil.*

⁵ *Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil.*

**Corresponding author: Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília-DF, 72220-275, Brazil. E-mail address: bygra1@gmail.com (Joanitti, G.A. - corresponding author who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication).*

Declaration of interests: *The authors declare that they have no conflict of interest.*

Authors email:

Patricia L. Costa: patricia_lcosta@hotmail.com

Alicia S. Ombredane: aliciaombredane@gmail.com

Beatriz C. de A. O. Faria: beatrz.carvalho@gmail.com

Lucas C. da Silva: lucascmps_@hotmail.com

Cleonice A. Holanda: cleoniceandradeholanda@gmail.com

Andressa S. de Oliveira: andressa901@gmail.com

Luiz A. S. Romeiro: luizromeiro@unb.br

Ricardo B. de Azevedo: razevedo@unb.br

Graziella A. Joanitti: bygra1@gmail.com