



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM NANOEMULSÃO A
BASE DE ÓLEO DE PEQUI E INVESTIGAÇÃO DE SEUS EFEITOS EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA.

BEATRIZ CARVALHO DE ARAÚJO OLIVEIRA FARIA

BRASÍLIA
MARÇO 2020

BEATRIZ CARVALHO DE ARAÚJO OLIVEIRA FARIA

ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM NANOEMULSÃO A
BASE DE ÓLEO DE PEQUI E INVESTIGAÇÃO DE SEUS EFEITOS EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA.

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

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti

BRASÍLIA
MARÇO 2020

BEATRIZ CARVALHO DE ARAÚJO OLIVEIRA FARIA

**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO EM NANOEMULSÃO A
BASE DE ÓLEO DE PEQUI E INVESTIGAÇÃO DE SEUS EFEITOS EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA.**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti

Orientadora

Prof Dr. Marcelo Henrique Sousa

Examinador

Profa Dr^a. Mônica Cristina de Oliveira

Examinadora

Prof Dr. Willie Oliveira Pinheiro

Examinador suplente

Gostaria de dedicar esse trabalho à Deus, minha família, meus amigos e a todas as pessoas que de alguma forma acreditaram em mim ao longo dessa caminhada. Também à todas as pessoas que já passaram ou estão passando por algum tipo de câncer e todos os profissionais, pesquisadores envolvidos no tratamento e desenvolvimento de novas alternativas para melhorar qualidade de vida desses pacientes

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a minha família, que juntos são a minha base, minha inspiração e força para conseguir alcançar todos os meus objetivos, sempre acreditaram e apoiaram as minhas escolhas, sem eles nada disso seria possível, mesmo nos momentos mais difíceis nunca desistimos e no meio de “tapas e beijos” sempre estávamos juntos.

Aos amigos que fortaleci a amizade durante esse período, em especial Patricia, Lucas, Ana flávia e Maria, foram dois anos de muita risada, diversão, fofocas, dias de desespero, de estudos na madrugada, de almoços, de choro, muito choro, mas também muitos momentos marcantes, sempre um dando força ao outro pra conseguir vencer mais essa etapa, obrigado por tudo, por cada momento que vivi e levarei vocês pelo resto da vida.

Agradeço também a professora Patricia, que sem dúvida foi de suma importância para realização desse trabalho. Aos professores do Instituto de Química que me acolheram e sem dúvida uma colaboração muito importante.

Ao meu grupo de pesquisa, sem eles nada disso seria possível, além de equipe, formamos uma verdadeira família, os “Filhos da Grazi”, cada ajuda e ensinamento contribuíram muito para minha formação e vida além da universidade, vocês tornaram meus dias de laboratório (que não foram poucos) mais felizes e produtivos.

Sou muito grata a minha orientadora Graziella, que desde o terceiro semestre da graduação me acolheu de braços abertos e acreditou no meu potencial e desde então me tratou como filha, muito obrigada professora por todos os ensinamentos, pela paciência, por mostrar que ser pesquisador não é fácil, mas é possível, que passamos por altos e baixos, que mesmo experimentos ruins são resultados e que a gente pode ser sempre melhor, que podemos superar os obstáculos da vida e que nosso conhecimento não tem limite.

Agradeço também aos professores da banca examinadora por aceitarem meu convite com prontidão.

“O sofrimento é passageiro. Desistir é para sempre”

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Câncer de mama	21
1.2. Óleo de pequi	24
1.3. Nanoemulsão	26
1.4. Vias de acúmulo de Nanopartículas no tecido tumoral.....	27
1.5. Ácido fólico.....	30
2. OBJETIVO.....	33
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivo Específico	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1. Síntese ácido fólico com PEG.....	34
3.2. Nanoemulsões a base de óleo de pequi com ácido fólico	34
3.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico e da carga superficial das nanoemulsões base de óleo de pequi com ácido fólico.....	35
3.4. Determinação da estabilidade das nanoemulsões	35
3.5. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após variação de pH	35
3.6. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após diluição em série.....	35
3.7. Caracterização de nanoemulsões por Infravermelho	36
3.8. Cultura de Células.....	36
3.9. Tripsinização das células.....	36
3.10. Plaqueamento	36
3.11. Tratamento.....	37
3.12. Viabilidade Celular	38
3.13. Morfologia Celular	38
3.14. Clonogenicidade	38
3.15. Citometria de fluxo (FACS)	39
3.15.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular	40

3.15.2. Potencial de membrana mitocondrial	40
3.15.3. Permeabilização da membrana lisossômica	41
3.16. Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular	41
3.17. Ensaio de migração (risco)	42
3.18. Ensaio de migração e invasão (RTCA)	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Conjugado Ácido fólico PEG	44
4.2. Característica das nanoemulsões após a formulação	47
4.4. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após variação de pH	56
4.5. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após diluição em série	59
4.6. Análise da viabilidade celular após o tratamento	61
4.8. Efeito das nanoemulsões à base de óleo de pequi na proliferação celular de 4T1	65
4.9. Citometria de Fluxo (Fragmentação de DNA, Lissosomo, Potencial de membrana mitocronndrial e integridade de membrana)	68
4.10. Ensaios de migração e invasão (<i>wound healing</i> RTCA)	75
5. CONCLUSÃO	80
6. REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Existe uma busca constante por novos tratamentos e moléculas anticarcinogênicas eficientes contra câncer de mama., o mais comum entre as mulheres no mundo. O óleo de *Caryocar brasiliense*, pequi, possui propriedades medicinais e sua forma nanoestruturada (nanoemulsão PeNE) já mostrou atividade citotóxica contra células de câncer de mama. As nanoemulsões são excelentes carreadores biológicos que podem ter sua superfície modificada com ácido fólico e/ou polímeros polietilenoglicol (PEG40) para aumentar melhorar seu direcionamento para tecidos tumorais. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar nanoemulsões à base de óleo de pequi revestidas com ácido fólico (PeNE+AF) e PEG (PeNE+PEG40) e comparar, seus efeitos em células de câncer de mama (4T1). As PeNE, PeNE+PEG40, PeNE+AF, apresentaram diâmetro hidrodinâmico (DH) médio igual a $119,8 \pm 1,9$ nm, $146,8 \pm 2,0$ nm e $138,5 \pm 1,3$ nm, respectivamente e índices de polidispersão (Pdl) em todas as formulações se mostraram similares e menores que 0,3, potencial zeta das nanoemulsões PeNE+PEG e PeNe+AF foi igual a $\leq -21,7$ mV e $\leq -20,3$ mV respectivamente, sendo maior comparada a PeNE $\leq -32,1$ mV. Todas as formulações foram estáveis durante 30 dias (4°C ao abrigo de luz), à diluição seriada de até 1024 vezes e variação de pH. PeNE+PEG, PeNE+AF mostraram atividade citotóxica em 4T1 após 24h e 48h, apresentando uma atividade dose-dependente e modificação na morfologia. PeNE+AF foi a formulação que reduziu a proliferação celular a curto e longo prazo de forma significativa, porém sem alteração no ciclo celular. Células expostas a PeNE+PEG40 e PeNE+AF apresentaram fragmentação no DNA, modificação no lisossomo, no potencial de membrana mitocondrial e na integridade da membrana. PeNE+AF foi a formulação que inibiu de forma significativa a migração e invasão (aspectos relacionados à metástase). Em suma, as modificações na superfície da PeNE mantiveram e/ou incrementaram os efeitos antitumorais já observados, indicando que tais modificações podem ser estratégias promissoras de futuros tratamentos adjuvantes contra o câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama, Óleo de pequi, *Caryocar brasiliense*, nanoemulsão, ácido fólico.

ABSTRACT

There is a constant search for new treatments and efficient anticarcinogenic molecules against breast cancer, the most common among women in the world. The *Caryocar brasiliense* oil, pequi, has medicinal properties and its nanostructured form (PeNE nanoemulsion) has already shown cytotoxic activity against breast cancer cells. Nanoemulsions are excellent biological carriers that can have their surface modified with folic acid and / or polyethylene glycol polymers (PEG40) to increase their targeting towards tumor tissues. The objective of the present work was to develop and characterize nanoemulsions based on pequi oil coated with folic acid (PeNE + AF) and PEG (PeNE + PEG40) and to compare their effects on breast cancer cells (4Q1). PeNE, PeNE + PEG40, PeNE + AF, presented an average hydrodynamic diameter (DH) equal to 119.8 ± 1.9 nm, 146.8 ± 2.0 nm and 138.5 ± 1.3 nm, respectively, and polydispersion (Pdl) in all formulations were found to be similar and less than 0.3, the zeta potential of the PeNE + PEG and PeNE + AF nanoemulsions was ≤ -21.7 mV and ≤ -20.3 mV respectively, being higher compared to PeNE ≤ -32.1 mV. All formulations were stable for 30 days (4 ° C protected from light), at a serial dilution of up to 1024 times and pH variation. PeNE + PEG, PeNE + AF showed cytotoxic activity in 4Q1 after 24h and 48h, showing dose-dependent activity and modification in morphology. PeNE + AF was the formulation that significantly reduced cell proliferation in the short and long term, but without altering the cell cycle. Cells exposed to PeNE + PEG40 and PeNE + AF showed fragmentation in the DNA, modification in the lysosome, the potential of the mitochondrial membrane and the integrity of the membrane. PeNE + AF was the formulation that significantly inhibited migration and invasion (aspects related to metastasis). In summary, the changes in the PeNE surface maintained and / or increased the antitumor effects already observed, indicating that such changes may be promising strategies for future adjuvant treatments against breast cancer.

Keywords: Breast cancer, pequi oil, *Caryocar Brasiliense*, nanoemulsion, folic acid,

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF Ácido fólico

Branco AF Branco contendo conjugado ácido fólico e PEG

Branco PEG Branco contendo PEG

Conj- Conjugado ácido fólico PEG40

EPR Efeito de Permeabilidade Aumentada e Retenção

FTIR espectroscopia pot infraver melho

INCA Instituto Nacional do Câncer

mV Milivolts

nm Nanômetros

PBS Tampão fosfato-salino

PdI Índice de Polidispersão

PEG 40 Estearato de polietileno glicol 40

PEG Polietilenoglicol

PeNE Nanoemulsão de Pequi

PeNE+AF Nanoemulsão de Pequi modificadas com PEG40 e conjugado ácido fólico com PEG40

PeNE+PEG40 Nanoemulsão de Pequi modificada com PEG40

PI Ponto isoelétrico

PML permeabilização da membrana lisossômica

PMM potencial da membrana mitocondrial

RE Retículo endoplasmático

RF Receptores de folato

RMN ressonância magnética nuclear

RTCA analisador de células em tempo real

VC Viabilidade Celular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018 no Brasil, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10). Fonte: Adaptada INCA, 2019	22
Figura 2 - Fruto do Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>).....	24
Figura 3- Representação de (A) nanoemulsão aquosa na qual o óleo é disperso no em água; (B) nanoemulsão oleosa no quais gotas de água são dispersas na fase oleosa e (C) nanoemulsões múltipla. Fonte: Própria do autor	27
Figura 4 - Efeito Enhanced Permeability and Retention (EPR). Adaptada (VIEIRA; GAMARRA, 2016)	28
Figura 5- Estrutura química do estearato polietilenoglicol40	29
Figura 6– Estrutura molecular do ácido fólico	30
Figura 7 -representativa do resumo das rotas de síntese utilizadas na síntese do conjugado Ácido Fólico-PEG 40	44
Figura 8 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) (A) conjugado AF+PEG40 (conjugado ácido fólico + PEG40); (B) PEG40 (Polyoxyethylene(40)stearate).....	45
Figura 9 - Espectros vibracionais na região do infravermelho do ácido fólico (AF), PEG-40 e conjugado (AF+PEG40)	46
Figura 10 – Desenho representativo de nanoemulsões (A) PeNE (nanoemulsão de pequi); (B) PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); (C) PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico e PEG)	47
Figura 11– Aspecto macroscópico das nanoemulsões (A) PeNE (nanoemulsão de pequi); (B) PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida a com	

PEG); (C) PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico) 49

Figura 12 - Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras: lecitina, óleo livre e PeNE 50

Figura 13 Espectros vibracionais na região do infravermelho das formulações PeNE e PeNE + PEG sobrepostos 52

Figura 14 - Espectros vibracionais na região do infravermelho das formulações PeNE e PeNE + AF sobrepostos. 53

Figura 15 - Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), armazenadas à 4°C ao abrigo de luz nos períodos de acompanhamento (0, 7, 15 e 30 dias) 54

Figura 16- Gráfico comparativo entre o índice de polidispersão das nanoemulsões à PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), armazenadas à 4°C ao abrigo de luz nos períodos de acompanhamento (0, 7, 15 e 30 dias) 55

Figura 17 - Gráfico comparativo entre potencial zeta das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), armazenadas à 4°C ao abrigo de luz nos períodos de acompanhamento (0, 7, 15 e 30 dias). ANOVA, pós-teste de Tukey, diferença significativa em relação ao grupo PeNE, *** $p < 0,001$ 55

Figura 18 - Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após a variação de pH 57

Figura 19 Figura - Gráfico comparativo entre o índice de polispersão das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após a variação de pH..... 57

Figura 20 - - Gráfico comparativo entre o potencial zeta das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após a variação de pH..... 58

Figura 21 Figura - Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após diluição seriada 59

Figura 22 - Gráfico comparativo entre o índice de polispersão, das nanoemulsões à PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após diluição seriada..... 60

Figura 23 - Gráfico comparativo entre o potencial zeta, das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após diluição seriada 61

Figura 24 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de mama (4T1), submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (90µg/mL, 180µg/mL, 360µg/mL) de PeNE (nanoemulsão de pequi); Branco (formulação lecitina e PBS) em diferentes proporções de PEG e Conj (conjugado ácido fólico PEG); Etanol e OL (óleo livre) comparados com controle por 24 horas. Representação de média ± desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,001$)..... 62

Figura 25 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de mama (4T1), submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (90µg/mL, 180µg/mL, 360µg/mL) de PeNE (nanoemulsão de pequi); Branco (formulação

lecitina e PBS) em diferentes proporções de PEG e Conj (conjugado ácido fólico PEG); Etanol e OL (óleo livre) comparados com controle por 48 horas. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,001$)..... 63

Figura 26 - Aspecto morfológico de células de câncer de mama (4T1-Luc) por microscópio de contraste de fase 40x. Representadas na escala de 100 μ m. As células foram expostas nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180 μ g/mL..... 65

Figura 27 - O número total de células de câncer de mama (4T1-Luc) tratadas com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180 μ g/mL comparados com controle por 24h. Esse resultado obtido por meio da contagem total das células em câmara de Neubauer após o tempo de incubação. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (*: $p < 0,05$) 66

Figura 28 - Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas a nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+ AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180 μ g/mL comparados com controle por 24 horas. O tampão fosfato foi usado como controle. Sendo avaliada pela média geométrica..... 67

Figura 29- Ensaio de formação de colônias. Fração de sobrevivência de células de câncer de mama (4T1-Luc) tratadas com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestda com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS);

Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por um período total de 5 dias. Representação de média ± desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: p<0,001) 68

Figura 30 - Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas a nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por 24 horas. O tampão fosfato foi usado como controle. A avaliação de fragmentação de DNA foi avaliada pela média geométrica (A) e pela intensidade de fluorescência de Iodeto de prodídeo (B). ANOVA a dois fatores: diferença significativa entre os grupos p <0,05 (teste post hoc de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos..... 69

Figura 31- Atividade lisossômica de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas PeNE(nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL. O tampão fosfato foi usado como controle. O estado funcional do lisossomo foi medido por Laranja de Acridita (LA) com representação da porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência da LA (B). ANOVA a dois fatores: diferença significativa entre os grupos p <0,05 (teste post hoc de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. 71

Figura 32- Atividade do potencial de membrana mitocondrial (PMM) de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas PeNE(nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com

Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL. O tampão fosfato foi usado como controle. O estado funcional do PMM foi medido por Rodamina. com representação da porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência da LA (B). ANOVA a dois fatores: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 72

Figura 33 - Ensaio de azul de Tripán. Células de câncer de mama (4T1-Luc) tratadas com a nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL (A) As células viáveis (células não tingidas) e as células não viáveis (células tingidas) foram contadas no hemocitômetro e os dados são representados em porcentagem de células. As experiências foram realizadas em triplicata e bidirecional ANOVA foram realizadas (*: $p < 0,05$) 74

Figura 34 - Migração de células de câncer de mama (4T1-Luc) medida pelo ensaio wound healing. As células foram previamente tratadas com nanoemulsão à PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por 24 horas. Linhas vermelhas representam a área da ferida. Quantificação da porcentagem de fechamento da ferida em relação ao controle medida pela Imagem J. ANOVA de uma via (***) $p < 0,05$)..... 76

Figura 35- Análise de migração em células em tempo real. Perfil da migração de células de câncer de mama (4T1-Luc), após o tratamento com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL ANOVA unidirecional (pós-teste de Tukey) ** = $p < 0,05$ 77

Figura 36 - Análise de invasão de células em tempo real. Perfil de invasão de células de câncer de mama (4T1-Luc), após o tratamento com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL ANOVA unidirecional (pós-teste de Tukey) ** = $p < 0,01$ 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química dos principais ácidos graxos encontrados no óleo de pequi	25
Tabela 2 - Composição dos tratamentos utilizados nos ensaios in vitro	37
Tabela 3 - Análise do diâmetro hidrodinâmico, Pdl, carga de superfície e pH de nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico). Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média de medidas realizadas em triplicata	48
Tabela 4 - Compilação dos resultados dos ensaios biológicos em células de câncer de mama 4T1 após 24h de exposição a nanoemulsões a base de óleo de pequi na concentração de 180 μ g/mL	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (INCA, 2020).

A metástase é a principal causa de morbidade do câncer e mortalidade. O processo envolve uma interação complexa entre propriedades intrínsecas das células tumorais, bem como interações entre células cancerosas e múltiplos microambientes. Para disseminar com sucesso, células metastáticas adquirem propriedades além daquelas necessárias para se tornar neoplásico, o que dão características para metástases serem extraordinariamente desafiadoras (WELCH e HURST,2020).

Durante o desenvolvimento tumoral, as células consideradas normais, são transformadas, devido à mutações e ou eventos epigenéticos, adquirindo características biológicas como, replicação descontrolada, imortalidade, insensibilidade aos sinais supressores de crescimento e apoptose, indução à angiogênese, invasão, formação metastática e promoção da inflamação (HANAHAN, 2011).

É caracterizado principalmente pela presença de células heterogêneas com mutações e desregulações epigenéticas que realizam interações particulares entre si e com o microambiente que as circundam (HANAHAN & WEINBERG, 2011; VIDEIRA et al., 2014).

Sendo assim, as causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2020).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo, quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são

denominados carcinomas, se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (INCA, 2019).

Dentre os tipos de câncer, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do de pele não melanoma, correspondendo a cerca de 25% dos casos novos a cada ano, especialmente no Brasil, esse percentual é de 29%, como mostra a figura 1 Também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2020). É uma doença com risco de vida e a mais prevalente tipo de câncer, geralmente em mulheres, e estima-se uma taxa de mortalidade de cerca 10,05 milhões de mulheres em 2020 em todo o mundo por câncer de mama (Gomathi et al. 2017; Ngwuluka et al. 2017; Alemrayat et al.2019).

MULHERES	Localização Primária	Casos Novos	%
	Mama feminina	59.700	29,5
	Cólon e Reto	18.980	9,4
	Colo do útero	16.370	8,1
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2
	Glândula Tireoide	8.040	4,0
	Estômago	7.750	3,8
	Corpo do útero	6.600	3,3
	Ovário	6.150	3,0
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7
	Leucemias	4.860	2,4
	Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	202.040	100,0
	Todas as neoplasias	282.450	

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018 no Brasil, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10). Fonte: Adaptada INCA, 2019.

É uma doença causada pela multiplicação de células anormais da mama, que formam um tumor. Há vários tipos de câncer de mama, alguns tipos têm desenvolvimento rápido enquanto outros são mais lentos. É relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta idade sua incidência cresce progressivamente, especialmente após os 50 anos. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. (INCA, 2020).

O câncer de mama pode ser percebido em fases iniciais, na maioria dos casos, por meio dos seguintes sinais e sintomas: Nódulo (caroço), fixo e geralmente indolor: é a principal manifestação da doença, está presente em cerca de 90% dos casos em que o câncer é percebido pela própria mulher; pele da mama avermelhada, retraída ou parecida com casca de laranja; alterações no mamilo, pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço; saída espontânea de líquido anormal pelos mamilos. Esses sinais e sintomas devem sempre ser investigados por um médico para avaliar o risco de tratar câncer (INCA, 2020).

Muitos avanços vêm ocorrendo no tratamento do câncer de mama nas últimas décadas, hoje se tem mais conhecimento sobre as variadas formas de apresentação da doença e diversas terapêuticas estão disponíveis. O tratamento do câncer de mama depende da fase em que a doença se encontra (e do tipo do tumor. Pode incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (terapia alvo).

Os tratamentos quimioterápicos e a retirada parcial ou total da mama, geralmente são os mais utilizados na clínica, tais procedimentos são bastante agressivos ao corpo, podendo levar a efeitos adversos como queda de cabelo, vômito, mal estar e a mutilação do corpo da mulher, respectivamente, como consequência, efeitos psicológicos negativos podem ser desencadeados devido a tais efeitos adversos (LEWIS et al., 2016; MAKLUF et al., 2005). Além disso, esses tratamentos apresentam grandes chances de cura quando aplicados em estágios precoces da doença, porém em estágio avançado, 20 a 35% de pacientes apresentam recorrência do tumor e metástase após cirurgia completa ou parcial (LI, et al., 2015).

Além disso, a maioria dos medicamentos quimioterápicos estabelecidos falta especificidade para células tumorais (COLOMBO, et al., 2015). Como esses tratamentos podem resultar em efeitos adversos severos se vê a necessidade da criação de novos tratamentos alternativos ou adjuvantes que sejam menos agressivos ao corpo e ao mesmo tempo eficientes para o tratamento e a cura da doença, visando o bem estar da paciente.

1.2. Óleo de pequi

Nos últimos anos, têm-se intensificado estudos utilizando compostos obtidos a partir de fontes naturais que possam contribuir para o tratamento do câncer. Tais como óleos que estão sendo utilizados como agentes quimioprotetores contra os cânceres devido à presença de moléculas bioativas em sua composição. Dentre essas moléculas, pode-se citar os antioxidantes, que representam um dos grupos mais estudados até o momento, os compostos fenólicos ou grupos reativos que conferem propriedades de citoproteção (REDDY, L. et al, 2003).

A espécie *Caryocar brasiliense* (Figura 2), conhecida popularmente como pequi, é uma planta nativa do Cerrado amplamente utilizada na culinária brasileira e usada na medicina popular para tratar várias enfermidades. Sua polpa contém diversos antioxidantes como carotenoides (que é uma pro-vitamina A), vitamina C e compostos fenólicos, e sua composição de ácidos graxos é representada principalmente pelos ácidos oleico (51,37 a 55,87%) e palmítico (35,17 a 46,79%) representados na tabela 1 (CASTRO, 2007; MIRANDA-VILELA, 2009).

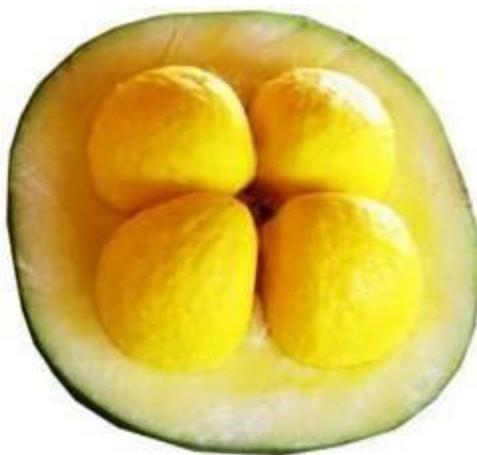
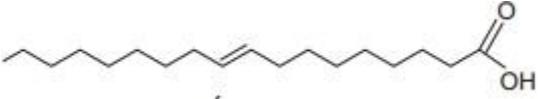
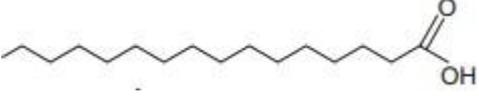


Figura 2 - Fruto do Pequi (*Caryocar brasiliense*).

Tabela 1 - Estrutura química dos principais ácidos graxos encontrados no óleo de pequi.

Ácido graxo	Estrutura química
Ácido oleico	
Ácido palmítico	

O pequi é uma fruta oleaginosa cujo óleo comestível é composto principalmente por ácidos graxos saturados e monoinsaturados. As propriedades biológicas e nutricionais do óleo de pequi dependem de sua composição, que pode mudar de acordo com a fonte do óleo (polpa ou amêndoa) (FARIA - MACHADO, et al, 2015).

O óleo de pequi, além de possuir várias propriedades nutricionais, apresenta efeitos antioxidantes, sequestrando radicais livres e prevenindo a ação mutagênica de agentes físicos e químicos. Com a definição da dose adequada, também pode ser usado como adjuvante na quimioterapia do câncer e na forma de suplemento na dieta (CASTRO, 2007; MIRANDA-VILELA, 2009).

Estudos realizados utilizando o óleo de pequi sugerem que a suplementação com este óleo pode inibir o estresse oxidativo durante o processo carcinogênico, diminuir a toxicidade dos efeitos da quimioterapia e, portanto, tem potencial para uso em a prevenção do câncer, adicionalmente em modelos animais demonstrou efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, cardioprotetor, hepatoprotetor, antígenotóxico e anticarcinogênico efeitos (NASCIMENTO - SILVA et al., 2018)

O óleo de pequi além de trazer vários benefícios para a saúde, é um produto natural, proveniente do cerrado brasileiro, onde a sua utilização pode contribuir com a bioeconomia no país, que é um sistema econômico baseado no uso sustentável de fontes renováveis de recursos biológicos de maneira equilibrada, que está se espalhando rapidamente em todo o mundo, possibilitando a construção de pontes entre biotecnologia e economia, bem como entre ciência, indústria e sociedade (AGUILA, et al., 2019).

1.3. Nanoemulsão

Adicionalmente, o emprego da nanotecnologia pode ser uma promissora estratégia para administração desse óleo, que é a ciência, engenharia e tecnologia conduzidas na escala nanométrica (10^{-9}m), em que muitas propriedades químicas, físicas e mecânicas dos materiais mudam significativamente (BRUXEL, 2012). Ao se estudar as propriedades que regem a escala nanométrica, pode-se então pensar em novas formas de utilizá-las para criar novas tecnologias (BRUXEL, 2012). Por meio do uso de sistemas em escala nanométrica, o combate às neoplasias torna-se mais eficaz. As nanopartículas têm a capacidade de encapsular fármacos pouco solúveis (KIPP, 2004; ZHANG et al., 2008; BERTRAND et al., 2014), além de melhorar a biodistribuição de medicamentos (BERTRAND et al., 2012; BERTRAND et al., 2014).

Dentre as nanotecnologias promissoras para aplicações nas várias áreas das ciências cosméticas e farmacêuticas, destacam-se as nanoemulsões (KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010; PEREIRA, 2008). Nanoemulsões são dispersões coloidais nos quais um líquido (a fase interna) é disperso em outro (a fase externa) formando gotículas na presença de um agente emulsificante (BRUXEL, 2012; KOURNIATIS; SPINELLI; MANSUR, 2010), onde o tamanho das gotículas dispersas depende do tipo e concentração do emulsificante, do óleo utilizado, bem como a homogeneização do método empregado, no entanto, atualmente não há consenso sobre o limite superior para a média do diâmetro da gota que define uma nanoemulsão (CHIO et al., 2020) podendo variar entre 10 e 1000 nanômetros.

A adição de um emulsionante é fundamental para a criação de pequenas gotículas, uma vez que diminui a tensão interfacial, isto é, a energia superficial por unidade de área, entre o óleo e fase aquosa da emulsão. O emulsionante também desempenha um papel na estabilidade coloidal de nanoemulsões por meio de repulsão eletrostática e impedimento estérico (GUPTA, 2016).

Existem três tipos de nanoemulsão que podem ser formadas: nanoemulsão aquosa na qual o óleo é disperso em água; nanoemulsão oleosa nas quais gotas de água são dispersas na fase oleosa e nanoemulsões múltipla, (JAISWA, 2014), como ilustrado na figura 3 abaixo.

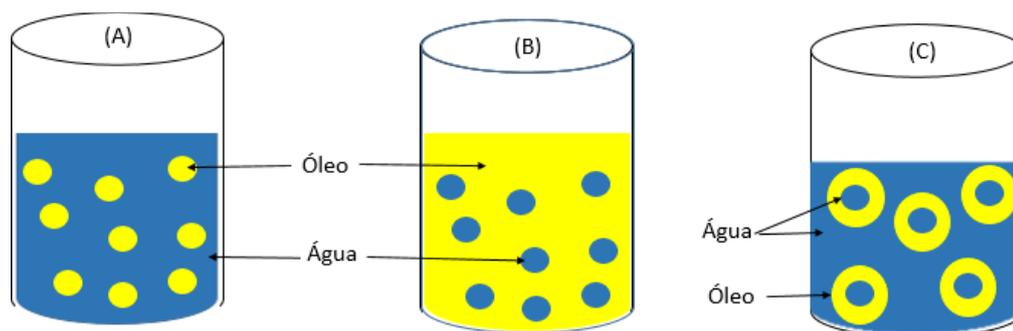


Figura 3- Representação de (A) nanoemulsão aquosa na qual o óleo é disperso no em água; (B) nanoemulsão oleosa no quais gotas de água são dispersas na fase oleosa e (C) nanoemulsões múltipla. Fonte: Própria do autor.

Como sistema de entrega de medicamentos, as nanoemulsões aumentam a eficácia terapêutica do medicamento e minimizar efeito adverso e reações tóxicas (JAISWAIL, 2014). Alguns resultados promissores do nosso grupo de pesquisa com a utilização de nanoemulsões a base de óleos naturais da biodiversidade brasileira (pequi, buriti, baru e açaí) em tratamentos de câncer de mama e de pele indicam que a nanotecnologia pode otimizar a administração desses óleos, facilitando sua biodistribuição e seu efeito sobre as células tumorais (ROCHA et al., 2013; ARAUJO et al., 2013; SILVA et al., 2014; FARIA et al., 2015, FARIA, 2017).

Além disso, as superfícies de nanoestruturas podem ser modificadas a fim de minimizar sua degradação, aumentar seu tempo de circulação sanguínea e viabilizar a sua chegada ao tecido alvo.

1.4. Vias de acúmulo de Nanopartículas no tecido tumoral

A via endovenosa é uma das vias utilizadas para a administração de nanoemulsões em tratamentos antitumorais, essa via permite que as mesmas circulem pela corrente sanguínea e se acumulem preferencialmente em regiões tumorais, as quais apresentam vascularização anormal, devido ao aumento da taxa de angiogênese e, muitas vezes, os vasos sanguíneos não são completamente desenvolvidos, como representado na figura 4 (COWENS III; PEPPAS, 2005; BATES et al., 2002; BERTRAND et al., 2014). Como resultado, os capilares apresentam um maior número de fenestras, as quais configuram

espaços de 200 a 2000 nm e baixa drenagem linfática (HOBBS et al., 1998; BERTRAND et al., 2014).

A presença de fenestras e a deficiente drenagem linfática fazem com que nanopartículas permaneçam por mais tempo no tumor. A união desses fenômenos é conhecida por “enhanced permeability and retention” (EPR) (JANG et al., 2003; BERTRAND et al., 2014). Esse acúmulo na área de interesse possibilita que uma maior quantidade de nanoemulsão interaja com as células tumorais e com isso minimize a chance de possíveis efeitos colaterais nos tecidos normais (não alvo), ou seja, reduzindo a toxicidade sistêmica (COWENS III; PEPPAS, 2005). Com a entrega ativa, também há a possibilidade de levar vários fármacos em doses maiores ao alvo e transpor barreiras biológicas (FERRARI, 2005; HARRIS et al., 2007; BONIFÁCIO et al., 2014).

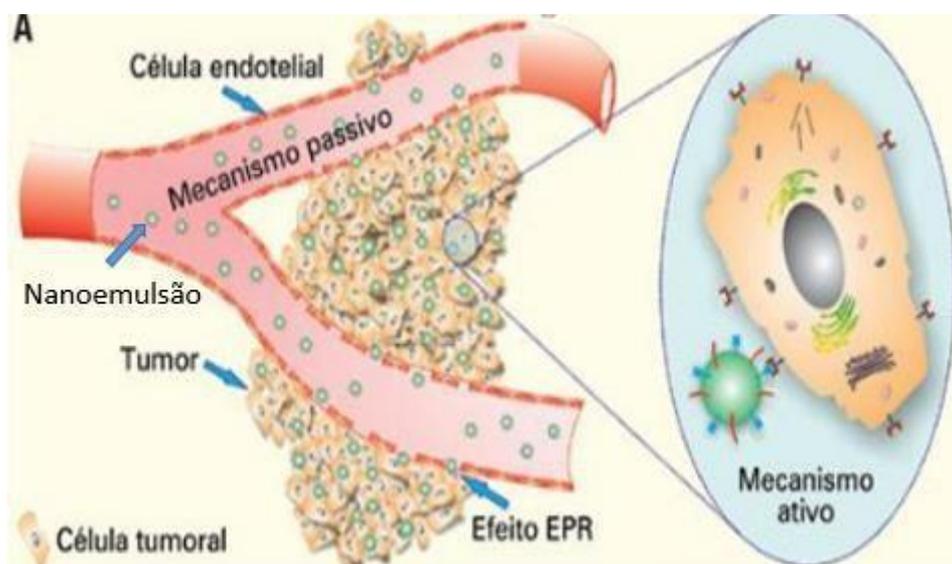


Figura 4 - Efeito Enhanced Permeability and Retention (EPR). Adaptada (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

O sangue apresenta moléculas denominadas de opsoninas que podem interagir com a superfície das nanopartículas e mediar a degradação das mesmas por células fagocíticas, reduzindo a quantidade de nanopartículas acumuladas no tecido alvo, sendo importante a caracterização da superfície das nanoemulsões para que se possa determinar o tempo de circulação das mesmas no sangue (COWENS III; PEPPAS, 2005).

A superfície das nanogotículas podem ser modificadas a fim de minimizar sua degradação para que seja possível sua chegada ao tecido alvo e aumente

moléculas, e baixa peso molecular, atraiu grande atenção como direcionador de fármacos e nanopartículas (BHARALI, et al, 2005).

No conjunto, como um ligante de direcionamento, o ácido fólico (AF), tem preferências notáveis sobre outros ligantes, possuindo penetração rápida em células tumorais, melhor estabilidade e mais direta modificação de grupos funcionais. Portanto, a AF tem sido amplamente utilizada para modificar nanopartículas, afim de aumentar a endocitose de nanopartículas via RFs usando alta afinidade da AF em relação aos receptores (YASSEMI, et al.,2019).

Em estudos com lipossomas, que é um nanosistema similar ao utilizado no presente estudo (produzido com fosfolípidios e tampão aquoso) e já bem descrito na literatura, foi possível notar que a maioria dos lipossomas direcionados para RF foram sintetizados usando a adição de fosfolípidos conjugados com folato durante a formação de lipossomas. No entanto, Lee et al, mostraram que os lipossomas formulados dessa maneira não eram reconhecidos pela RF. Em vez disso, a atividade de ligação ao receptor só foi restaurada quando o AF foi anexada ao lipossoma através de um espaçador longo à base de PEG.

Além disso, a modificação do PEG40 também oferece o benefício de aumentar a solubilidade e prolongar a meia-vida do medicamento no organismo, bem como auxiliar passivamente a melhorar o acúmulo das nanopartículas no local do tumor, adicionalmente a modificação do AF pode melhorar ainda mais a retenção da formulação no tumor e facilitar sua captação via endocitose mediada por RF permitindo que o fármaco se direcione com mais precisão e eficiência para tumores que superexpressam o RF.

Estudos já realizados pelo nosso grupo de pesquisa LCBNano (Laboratório de compostos Bioativos em Nanobiotecnologia), da Universidade de Brasília, tem investigado o efeito de óleos nativos da biodiversidade brasileira e já mostrou que nanoemulsão desenvolvida a base de óleo de pequi apresenta atividade citotóxica em células de câncer de mama 4T1 (OMBREDONE 2018).

Assim, a incorporação de ácido fólico na superfície de partículas de nanoemulsões pode aumentar a interação entre célula e nanoemulsão, podendo potencializar o seu efeito, portanto o presente projeto propõe a incorporação de ácido fólico na superfície de partículas de nanoemulsões a base de óleo de

pequi, afim de investigar se tais modificações aprimoram sua atividade citotóxica como estratégia de terapia em linhagem de câncer de mama *in vitro*.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Objetivo geral: caracterizar e avaliar os efeitos da associação de polímeros de PEG e ácido fólico na superfície de partículas de nanoemulsão a base de óleo de pequi em células de câncer de mama.

2.2. Objetivo Específico

- Associar polímeros de PEG e ácido fólico na superfície de partículas de nanoemulsão a base de óleo de pequi;
- Caracterizar parâmetros físico-químicos e estabilidade das nanoemulsões de pequi desenvolvidas;
- Avaliar a influência de tais modificações na atividade citotóxica de PeNE em células de câncer de mama;
- Avaliar a influência de tais modificações no perfil de migração e invasão (aspectos metastáticos) em células de câncer de mama

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese ácido fólico com PEG

Adaptado de (SHI, et al., 2013) e realizada no laboratório de química orgânica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, com a colaboração do Professor Carlos Kleber e Professora Patricia Bento do Instituto de biologia. Primeiro foi pesado 0,883 g de ácido fólico (2 mmol), 4,684 g de PEG40 (1 mmol), 0,192 g de acetato de (dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) (1 mmol) e 0,138g de 1-Hidroxi-2,5-pirrolidinodiona (NHS) (1,2 mmol) foram dissolvidos em 250mL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e agitado à temperatura ambiente temperatura por 24 h. 25mL da solução resultante foi colocada em um bolsa de diálise (ponto de corte de 3,5 kDa MW, Spectra/Po, EUA) e dialisado em 2L de tampão NaHCO₃ (pH 9,0) por 12 h (alteração tampão a cada 3h) e depois em 2L de água por 24h (alterando a água a cada 4h) para remover os materiais de reação e subprodutos. Em seguida, foi liofilizado (Liofilizador L101, Liotop), para remover a água e rastrear quantidades de solvente orgânico. Em seguida 15mg do composto formado foi pesado, solubilizado em DMSO deuterado para realização da caracterização por RMN.

3.2. Nanoemulsões a base de óleo de pequi com ácido fólico.

As nanoemulsões foram produzidas por método de dispersão de alta energia, assim como desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, (ARAUJO et al.,2013). Óleo natural de pequi e de surfactante (lecitina) na proporção 2:1 e diferentes proporções PEG e conjugado de ácido fólico com PEG40 (AFPEG), respeitando o limite máximo de 2% em molaridade em relação a fase oleosa, foram adicionadas a um tubo tipo falcon e submetidas à ultrasonicação em banho de gelo por 3 minutos alternados a fim de produzir uma emulsão bruta. Em seguida, as emulsões foram diluídas na proporção 1:12,5 em PBS1x e submetidas à ultrasonicação nas mesmas condições descritas anteriormente para obtenção das nanoemulsões.

3.3. Determinação do diâmetro hidrodinâmico e da carga superficial das nanoemulsões base de óleo de pequi com ácido fólico

O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial eletrocinético detalhes das medidas das nanoestruturas foram determinados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasizer (Malvern, EUA).

3.4. Determinação da estabilidade das nanoemulsões

Para determinar a estabilidade coloidal da emulsão, alíquotas das formulações foram estocadas a 4°C e analisadas nos dias: 0, 7, 15 e 30 (por um período total de 30 dias) quanto a aspectos macroscópicos (formação de cremagem ou precipitados), diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta.

3.5. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após variação de pH.

A alteração de pH foi realizada com auxílio de Hidroxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) a 0,25mol/L adicionados diretamente nas amostras com intuito de alcançar os pH 3, 5, 7, 9 e 11. Em seguida a análise do índice de polidispersão, diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta foram analisados com intuito de determinar a sua estabilidade frente a variação de pH.

3.6. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após diluição em série.

A diluição em série, das nanoemulsões, foi realizada de 50 a 500 vezes em PBS1X, na proporção 1:1, a fim de determinar a sua estabilidade frente a diluição para a análise do índice de polidispersão (PDI), diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

3.7. Caracterização de nanoemulsões por Infravermelho

Os espectros de infravermelho transformada de Fourier foram obtidos no equipamento Vertex 70 da marca Bruker (Billerica, EUA) com refletância total atenuada (ATR), com resolução espectral de 4 cm^{-1} , 50 scans no intervalo de $375\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

3.8. Cultura de Células

A linhagem de câncer de mama utilizada foi a 4T1-Luc (origem humana). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO_2 . Todos os ensaios foram realizados em triplicata e submetidos à análises estatísticas adequadas para cada teste.

3.9. Tripsinização das células

A linhagem celular utilizada (4T1-Luc) é aderente. Dessa forma, a tripsina, uma enzima que hidrolisa as ligações peptídicas, foi utilizada para soltar as células da superfície de garrafa de cultura. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi descartado e 4 mL de tripsina (Tripsina 0,25%, Life, EUA) foram adicionados. As células foram incubadas por 3 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após observar por microscopia de luz que todas as células estavam soltas, 4 mL de meio de cultura completo foram adicionados para neutralizar o efeito da tripsina. O conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugado. Após 3 minutos de centrifugação a 1341 g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura e utilizado nos passos descritos a seguir.

3.10. Plaqueamento

Dez microlitros (μL) das células ressuspensionadas em 1 mL de meio de cultura foram separados em um microtubo de 1,5 mL e 90 μL de azul de tripan

foram adicionados. Após homogeneização, 10 µL foram colocados em uma câmara de Neubauer e as células foram contadas em microscópio de luz invertido. O número de células foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Células Contadas}}{4} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

Foram adicionadas 2×10^3 células/poço em placa de 96 poços de fundo achatado. Número de células necessários para que as células não atingissem a confluência no período experimental utilizado. Após o plaqueamento, as placas contendo as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.11. Tratamento

Após 24h incubadas na estufa, as células foram tratadas com o óleo de pequi livre (não nanoestruturado), que foi diluído em etanol absoluto na mesma concentração que a presente nas nanoemulsões, sendo a concentração de etanol por poço menor que 1% e as nanoemulsões em diferentes concentrações (360, 180 e 90 µg/ml), nos tempos de 24 e 48 horas. Os grupos dos tratamentos experimentais estão descritos na tabela 2. O controle negativo foi preparado com PBS1x em meio de cultura completo adicionando-se volumes equivalentes aos volumes acrescentados para os grupos experimentais. Para a aplicação do tratamento nas células, o meio de cultura de cada poço foi descartado na medida em que eram adicionados 200 µL das diferentes amostras. As placas foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 e 48 horas.

Tabela 2 - Composição dos tratamentos utilizados nos ensaios in vitro.

Grupos	Composição
Controle	DMEM e PBS1x
Etanol	Etanol absoluto e PBS1x
Óleo Livre	Óleo de pequi livre e etanol absoluto
PeNe	Nanoemulsão de óleo de pequi (surfactante, óleo e PBS1x)

Branco	Branco Nanoemulsão de óleo de pequi (surfactante e PBS1x)
PeNe + PEG	Nanoemulsão de óleo de pequi com PEG (Sufactante, óleo, PBS1x e Polietilenoglicol)
Branco PEG	Branco Nanoemulsão de óleo de pequi com PEG (Sufactante, PBS1x e Polietilenoglicol)
PeNe + AF	Nanoemulsão de óleo de pequi (surfactante, óleo, PBS1x e ácido fólico)
Branco AF	Branco Nanoemulsão de óleo de pequi com ácido fólico (surfactante, PBS1x e ácido fólico)

3.12. Viabilidade Celular

Após tratamento nos tempos de 24h e 48h, o meio de cultura contendo tratamento das placas foi removido e 150 μ L de solução de uso de MTT (15 μ L de MTT 5mg/ mL diluídos em 135 μ L de DMEM) foram adicionados. Após 2 horas o meio de cultura foi removido e 100 μ L de DMSO foram adicionados em cada poço para dissolver o produto formado. A quantificação da viabilidade celular foi determinada após a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e submetidos à análise estatística adequada.

3.13. Morfologia Celular

Após o tratamento com as nanoemulsões descritas acima, as células foram observadas e analisadas em microscópio de contraste de fase invertido. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o software de aquisição Scope (versão 1.0.0.0, 2003).

3.14. Clonogenicidade

Células 4T1-Luc foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células por poço, em placa de 12 poços, após 24h as células foram expostas aos tratamentos mencionados na Tabela 1 na concentração de 180 μ g/mL por 24h, após esse período as células foram lavadas com PBS1x, tripsinizadas, contadas em camera de Neubauer e plaqueadas novamente na densidade de 1×10^3

células/poço em placas de 6 poços. A avaliação da formação de colônias foi avaliada após um período de 4 dias sem troca de meio de cultura. Ao final do período de análise as células foram lavadas com PBS1x e fixadas com metanol gelado por 5 minutos, depois coradas por solução de cristal violeta 0,5% (25% de metanol + 75% água destilada) por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguida as células foram lavadas com água destilada até não sair mais o corante. Colônias compostas por pelo menos de 50 células foram contadas utilizando estereomicroscópio (LeicaEZ4 HD, Alemanha).

A eficiência de plaqueamento (EP) foi calculado a partir da cultura controle utilizando a seguinte formula:

$$EP = \frac{n^{\circ} \text{ colônias formadas}}{n^{\circ} \text{ células plaqueadas}} \times 100$$

A fração de sobrevivência (FS) foi calculada pela seguinte formula:

$$FS = \frac{n^{\circ} \text{ colônias formadas}}{(n^{\circ} \text{ células plaqueadas} \times EP)}$$

3.15. Citometria de fluxo (FACS)

A citometria de fluxo é uma técnica que permite contar, examinar e classificar partículas microscópicas em suspensão. Vários parâmetros físicos, químicos e biológicos podem ser avaliados simultaneamente (OMBREDONE, 2016). As análises foram realizadas no citômetro (BD FACSVerse™, EUA) do Departamento de Biologia Celular no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Para a realização dos experimentos, placas de 12 poços com fundo achatado foram utilizadas. As células em cultura foram tripsinizadas e contadas de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.9 e 3.10. O volume de 800µL de meio de cultura contendo 5×10^4 células foi adicionado em cada poço das placas. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o tratamento das células foi realizado com as PeNE, PeNE+PEG, PeNE+AF, Branco, BrancoPEG, BrancoAF, Óleo Livre e Controle. Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante de cada poço foi retirado e colocado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL.

correspondentes a cada um dos poços. As células foram tripsinizadas com 400 μ L de tripsina e a placa foi incubada na estufa por 3 minutos. O sobrenadante coletado previamente foi colocado novamente em cada poço correspondente da placa para neutralizar o efeito da tripsina. As células foram ressuspensas e coletadas novamente nos microtubos correspondentes para centrifugação a 2000rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em PBS 1x e centrifugado novamente para retirar o excesso de meio de cultura e tratamento. Em seguida, as células foram processadas de acordo com cada experimento conforme descrito abaixo. Durante as análises por citometria de fluxo (FACS), 10000 eventos foram adquiridos para cada amostra e cada experimento.

3.15.1 Fragmentação de DNA e ciclo celular

A avaliação de fragmentação de DNA e ciclo celular das células tratadas foi determinada com a adição de iodeto de propídeo (PI). O PI é um dos corantes com afinidade por DNA mais utilizados em citometria de fluxo (FACS) por ser capaz de se intercalar entre pequenas sequências de nucleotídeos (OMBREDONE, 2016). O pellet de células tratadas foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% gelado e armazenado a - 20°C por pelo menos 24 horas ou até o dia da análise. No dia da análise, cada microtubo foi centrifugado a 2000rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas novamente. Após descartar o sobrenadante, 100 μ L de PBS 1x contendo RNase (50 μ M) foram adicionados ao pellet. As amostras foram incubadas na estufa a 37°C por 30 minutos protegidos da luz. Em seguida, 100 μ L de PI (20 μ g/mL) (Probes – ThermoFisher, EUA) preparado em PBS foram adicionados à temperatura ambiente por 30 minutos protegidos da luz. Após esse procedimento, as células foram analisadas por FACS. (Ombredane, 2016).

3.15.2. Potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi determinada pela adição de Rodamina 123 (Probes – Thermo Fisher, EUA). A Rodamina 123 é um

composto catiônico de fluorescência verde que se associa às membranas das mitocôndrias de acordo com a sua polarização (TermoFisher, 2015). A solução estoque de Rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL. O volume de 300 µL de Rodamina 123 (5 µg/mL) em PBS foi adicionado ao pellet das células tratadas e incubado por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 2000rpm, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 300 µL de PBS foram acrescentados. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirar o excesso de Rodamina 123. Em seguida as amostras foram colocadas em gelo e analisadas por FACS imediatamente.

3.15.3. Permeabilização da membrana lisossômica

O laranja de acridina (LA) é um fluorocromo metacromático lisossomatópico. 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 µM de LA por 30 minutos protegidos da luz à 37°C. Após o tempo de incubação, a permeabilização da membrana lisossômica foi analisada por FACS

3.16. Avaliação da integridade de membrana e proliferação celular

O processo de plaqueamento descrito acima, foi realizado para o teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular utilizando-se placa de 12 poços com fundo achatado contendo 5×10^4 células/poço. Após 24 horas de exposição aos diferentes tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o pellet obtido foi ressuspensionado em 100 µL de meio de cultura completo (item 3.6.4). Dez µL de suspensão de células foram retirados e adicionados a uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA) na proporção de 1:1 (v/v). O número de células totais foi determinado em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 4.7.2, contando-se células com coloração azul e não azuis. Este ensaio permite diferenciar as células viáveis ou não viáveis de acordo com o estado da membrana plasmática. O azul de tripan

penetra nas células que apresentam membrana plasmática danificada e as coram de azul. As células viáveis com membrana intacta não apresentam coloração.

3.17. Ensaio de migração (risco)

As células foram tripsinizadas e plaqueadas como mencionada acima, 5×10^4 células/poço de 4T1-Luc, em placa de 24 poços de fundo achatado. Número de células necessários para que as células atingissem a confluência no período experimental utilizado. Após o plaqueamento, as placas contendo as células foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após esse período foram tratadas de acordo com a Tabela 1 na concentração de $180\mu\text{g/mL}$. Após 24h o meio com tratamento foi retirado e feito uma ferida no tapete de células, utilizando uma ponteira P200. As células que se soltaram nesse processo foram retiradas utilizando PBS1x. Meio contendo 1% de Soro fetal bovino foi adicionado em cada poço e as fotos retiradas no tempo de 0h em microscópio de luz invertida EVOS Las EZ. Após 24h o meio foi retirado e as células coradas para melhor visualização e levadas novamente ao microscópio para retirada das fotos de 24h.

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

A redução percentual da área da ferida foi determinada através da fórmula:

$$\text{Área} = \frac{(\text{Área final} - \text{Área inicial})}{\text{Área inicial}} \times 100\%$$

3.18. Ensaio de migração e invasão (RTCA)

As células foram tripsinizadas e plaqueadas como mencionada acima, 1×10^5 células/poço de 4T1-Luc, em placa de 12 poços de fundo achatado. As células foram tratadas de acordo com a Tabela 1 na concentração de $180\mu\text{g/mL}$. Após o tratamento foram lavadas com PBS1x, tripsinizadas, contadas na câmera

de Neubauer e plaqueadas novamente na densidade de $6,5 \times 10^4$ células por poço em placa CIM-RTCA (Acea Biosciences Inc., Califórnia, EUA). Os perfis de migração e invasão foram avaliados após o tratamento para observar se as células remanescentes ainda têm um padrão de migração e invasão em comparação com ao controle, o índice de células foi medido a cada 15 minutos por 48 horas. Utilizou-se meio SFB a 10% como revestimento quimioatrativo e Matrigel Matrix (Corning, EUA) ($800 \mu\text{g} / \text{mL}$) como barreira no ensaio de invasão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Conjugado Ácido fólico PEG

Foi realizada uma reação de esterificação para obtenção do conjugado de ácido fólico com PEG40, onde o grupamento ácido carboxílico do AF vai interagir com a hidroxila do PEG40, formando um éster, como mostra na Figura 7.

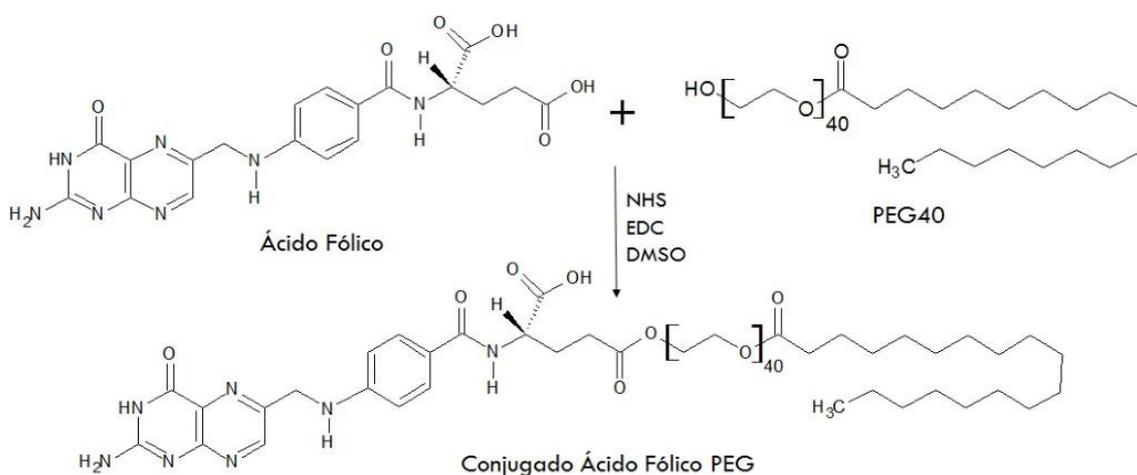


Figura 7 -representativa do resumo das rotas de síntese utilizadas na síntese do conjugado Ácido Fólico-PEG 40.

Após a síntese, para se obter a confirmação de que a conjugação realmente aconteceu e obter a sua caracterização, foi realizado a técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), onde através de espectros obtidos foi possível realizar a análise e comparação de sinais para tal caracterização, como representado na figura 8. Assim como descrito por Yongping et al, 2019, os sinais de hidrogênio em δ (ppm) 0,8-1,4, δ (ppm) 3,5-3,9 e δ (ppm) 6,0-8,0 foram atribuídos aos hidrocarbonetos alifáticos, PEG 40 e Ácido fólico respectivamente, como identificado na figura 8A.

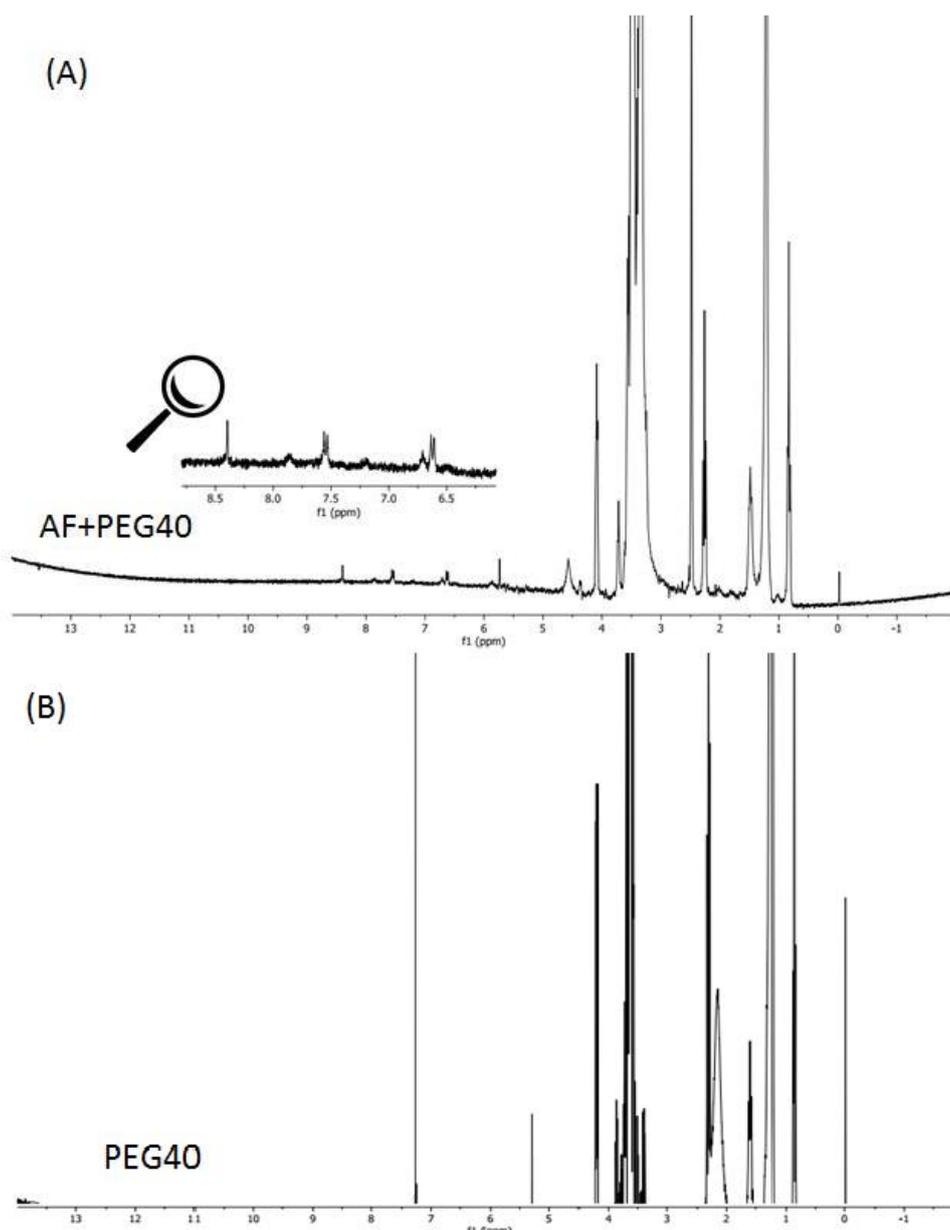


Figura 8 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) (A) conjugado AF+PEG40 (conjugado ácido fólico + PEG40); (B) PEG40 (Polyoxyethylene(40)stearate).

Além da análise de RMN, o conjugado também foi analisado pela técnica FTIR onde observamos o espectro do ácido fólico, figura 9, a presença de bandas alargadas na faixa de $3539\text{-}3319\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento OH (nOH) da cadeia do ácido glutâmico e estiramento do grupo -NH (nNH) do anel da pteridina. As bandas em 1687 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} são atribuídas ao modo vibracional estiramento C=O, a primeira referente à carbonila, enquanto a segunda ao do grupo CONH. Observa-se ainda uma banda centrada em 1603 cm^{-1} que está relacionada ao modo vibracional deformação NH e outra em 1412 cm^{-1} correspondente a deformação OH do esqueleto fenílico. As bandas entre

1518 e 1481 cm^{-1} são atribuídas às bandas de absorção características do anéis fenil e pteridina (HE, et al., 2009).

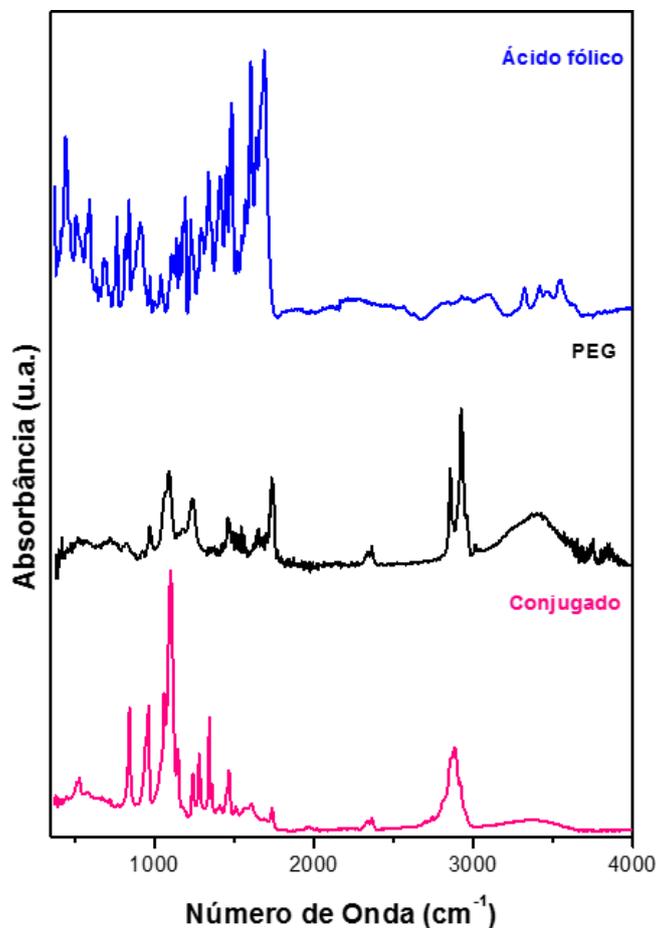


Figura 9 - Espectros vibracionais na região do infravermelho do ácido fólico (AF), PEG-40 e conjugado (AF+PEG40).

Ao analisar o espectro do PEG além das bandas referentes a cadeia contendo hidrocarboneto, observa-se uma banda alargada de média intensidade centrada em 3400 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional estiramento OH (nOH) referente a função álcool do composto, e outra intensa em 1736 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional estiramento C=O (nC=O referente a carbonila do grupo éster (USANA, et al., 2016).

Ao analisar os espectros do PEG, do ácido fólico e do conjugado, e compara-los é possível observar que a banda atribuída ao modo vibracional estiramento C=O da carbonila do grupo éster para o PEG e para o conjugado ambas estão localizadas em 1736 cm^{-1} . A banda atribuída ao estiramento da hidroxila livre do PEG consiste em uma banda larga centrada em 3400 cm^{-1} . As bandas de estiramento de hidroxila conjugadas do ácido fólico e do conjugado

sintetizado consistem de bandas largas centradas em 3436 cm^{-1} e 3416 cm^{-1} , respectivamente. Comparado ao PEG, a banda do ácido fólico e do conjugado deslocam 36 cm^{-1} e 16 cm^{-1} , respectivamente, para frequências maiores, sendo esse deslocamento significativo. As bandas atribuídas ao estiramento do anel benzeno do ácido fólico e do conjugado são observadas em 1603 cm^{-1} e 1607 cm^{-1} , respectivamente, deslocamento não significativo. Esses resultados permitem inferir que houve a formação do éster pela reação entre o grupo hidroxila do PEG e o grupo carboxílico do ácido fólico, resultados semelhantes foram obtidos por Shi *et al.* (SHI, et al., 2013).

4.2. Característica das nanoemulsões após a formulação.

Nanoemulsões podem ser modificadas afim de minimizar sua degradação, ou aumentar a sua especificidade, para que assim seja possível sua chegada ao tecido alvo e aumente sua interação as células de interesse. (COWENS III; PEPPAS, 2005).

Para se obter tais modificações na nossas nanoemulsões á base de óleo de pequi (PeNE), utilizamos proporções de PEG40 e de conjugado de ácido fólicoPEG40, produzindo então: nanoemulsão a base de óleo de pequi modificada somente com PEG40 (PeNE+PEG) e nanoemulsão a base de óleo de pequi modificadas com conjugado ácido fólicoPEG40 (PeNE+AF), cujo estão representadas a baixo (Figura 10).

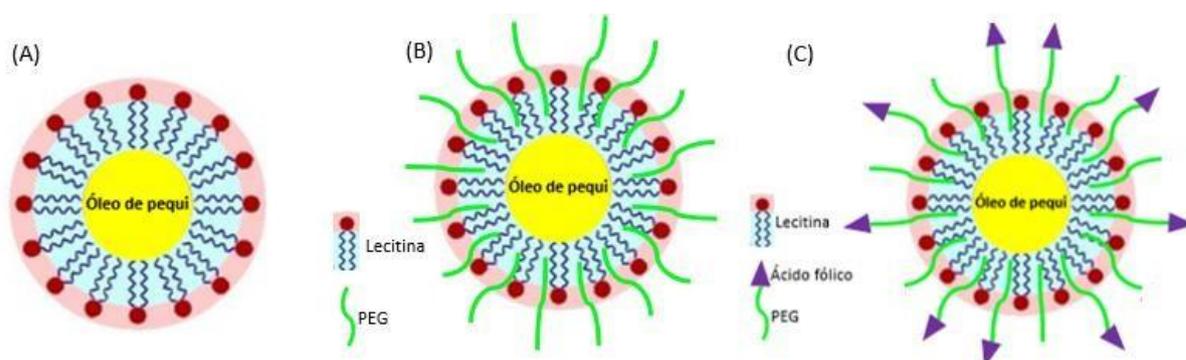


Figura 10 – Desenho representativo de nanoemulsões (A) PeNE (nanoemulsão de pequi); (B) PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); (C) PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico e PEG).

Os resultados obtidos com a análise do diâmetro hidrodinâmico, Pdl e carga de superfície, assim como o respectivo pH da nanoemulsões de pequi desenvolvidas estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Análise do diâmetro hidrodinâmico, Pdl, carga de superfície e pH de nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico). Os valores estão representados como média \pm desvio padrão da média de medidas realizadas em triplicata

Formulação	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	pH
PeNE	119,8 \pm 1,9	0,247 \pm 0,014	-32,1 \pm 1,6	6
PeNE + PEG	146,8 \pm 2,0	0,220 \pm 0,015	-21,7 \pm 1,3	6
PeNE + AF	138,5 \pm 1,3	0,208 \pm 0,012	-20,3 \pm 1,4	6

As nanoemulsões óleo em água consistem em gotículas de óleo com diâmetros tipicamente entre aproximadamente 30 e 200 nm dentro de um meio aquoso (TRUJILLO, et al., 2017). Portanto, as nanoemulsões à base de óleo de pequi produzidas estão dentro do tamanho descrito na literatura, mostrando diâmetro hidrodinâmico (DH) médio igual a 119,8 \pm 1,9 nm, 146,8 \pm 2,0nm e 138,5 \pm 1,3 nm para PeNE, PeNE+PEG e PeNE+AF, respectivamente. Tanto PeNE+PEG, quanto PeNE+AF tem o DH um pouco maior em comparação a PeNE, sendo um indicativo de que a superfície dessas nanoemulsões estão modificadas.

O Índice de polidispersão é um parâmetro que varia de 0 à 1,0, indicando que quando mais próximo de 0, a formulação está mais homogênea, ou seja, o diâmetro hidrodinâmico das gotículas presentes em uma suspensão se encontram com os tamanhos próximos e quanto mais próximo de 1,0 mais heterogêneo são os diâmetros analisados (MALVERN,2011). O índice de polidispersão em ambas formulações se mostraram similares e menores que 0,3, correspondendo a uma boa homogeneidade em termo de tamanho das gotículas. Adicionalmente, não se observou formação de cremagem ou separação de fase no aspecto macroscópico das nanoemulsões obtidas (Figura 11). O pH teve valor igual a 6 em todas as formulações.

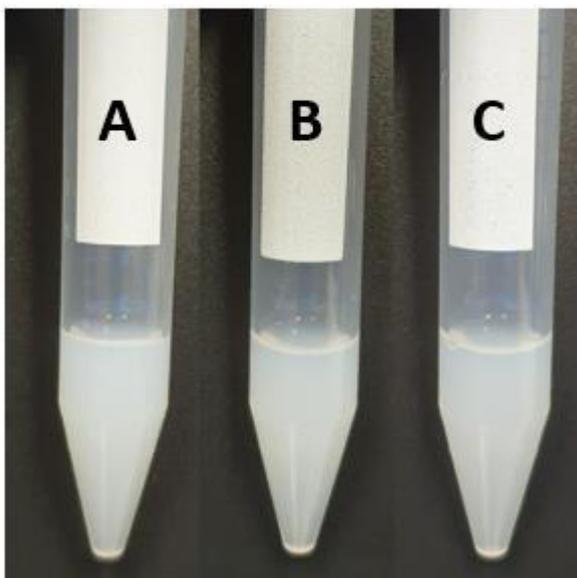


Figura 11– Aspecto macroscópico das nanoemulsões (A) PeNE (nanoemulsão de pequi); (B) PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); (C) PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico).

Sabe-se que cadeias poliméricas de PEG podem se distribuir sobre a superfície de nanopartículas recobrando as cargas positivas/negativas das mesmas (LIU. et al,2003; NAKAMURA. et al., 2012). Podendo ser, assim, um indicativo de que o PEG e o conjugado ácido fólico PEG adicionado está presente na superfície das nanogotículas produzidas, pois o potencial zeta das nanoemulsões PeNE+PEG e PeNe+AF possuem carga de superfície $\leq -21,7\text{mV}$ e $\leq -20,3\text{mV}$ respectivamente, sendo maior comparada a PeNE $\leq -32,1\text{mV}$, que não possui nenhum ligante, essas diferenças de valor são em função dos grupos ionizáveis presentes na Lecitina, que conferem carga negativa a nanoemulsão.

Para confirmar a presença do conjugado e do PEG na nanoemulsão foi realizada técnica de espectroscopia na região do infravermelho, com o objetivo de observar alterações nas propriedades vibracionais das moléculas quando ocorre interação entre os grupos funcionais das mesmas. Essas alterações são observadas com o surgimento, ampliação ou deslocamento dos modos vibracionais da molécula em interação quando comparado com a molécula livre. Com o objetivo de estimar qualquer possibilidade de interação química entre o óleo de pequi e os componentes da nanoemulsão, espectros de FTIR dos constituintes: lecitina, óleo de pequi, PEG e das formulações PeNE, PeNE + PEG e PeNE + AF foram analisadas. A Figura 12 apresenta os espectros vibracionais

dos constituintes da nanoemulsão de óleo de pequi (PeNE): lecitina, óleo livre e PeNE.

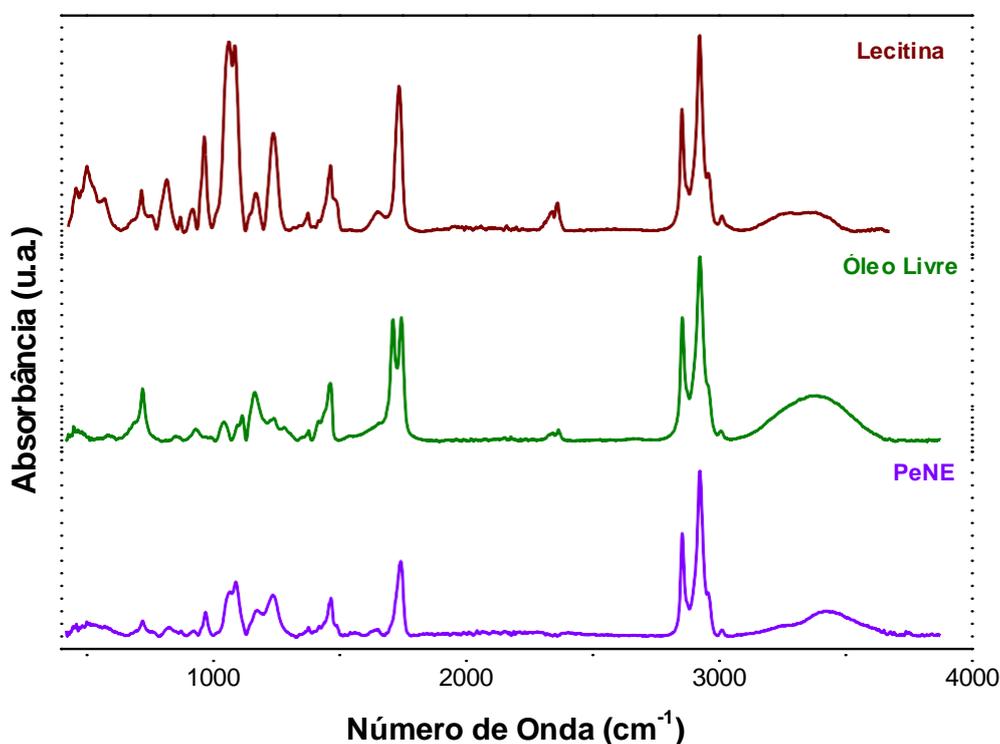


Figura 12 - Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras: lecitina, óleo livre e PeNE.

Analisando os espectros é possível observar que as bandas mais intensas em todos os espectros são aquelas que correspondem às bandas de hidrocarbonetos: estiramento simétrico CH_2 ($n_s\text{CH}_2$), estiramento assimétrico CH_2 ($n_{as}\text{CH}_2$), estiramento simétrico CH_3 ($n_s\text{CH}_3$), estiramento assimétrico CH_3 ($n_{as}\text{CH}_3$) e *scissoring* do CH_2 em $\sim 2956\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2874\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2852\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Observa-se ainda bandas associadas à deformação do grupo CH_2 , *rocking* CH_2 , próximo de 720 cm^{-1} , característico de cadeias longas de alcanos com mais de quatro grupos CH_2 , e em $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ banda atribuída a deformação simétrica CH_3 (KULIGOWSKI, et al., 2008).

No espectro da lecitina observa-se ainda as vibrações referentes aos grupos polares da cabeça do composto que são representadas por três bandas espectrais principais: o estiramento assimétrico e simétrico dos grupos PO_2^- em 1238 cm^{-1} e 1089 cm^{-1} , respectivamente, sendo a simétrica parcialmente sobreposta com a banda atribuída aos modos vibracionais de estiramento C-O-

$P-O-C$ em 1065 cm^{-1} . E a banda que representa as vibrações assimétricas de $N^+(CH_3)_3$ em 968 cm^{-1} . Outras bandas referentes aos grupos polares também são observadas em 822 cm^{-1} , 763 cm^{-1} e 464 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais estiramento assimétrico e simétrico do grupo PO^- e deformação do $O-P-O$, respectivamente. As bandas em 1653 cm^{-1} e 1736 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais estiramento $C=C$ e $C=O$, respectivamente, grupos carbonila éster (PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, et al., 2013).

O óleo de pequi utilizado nesse trabalho é constituído de ácido oleico (51%) e ácido palmítico (40%), figura 11, observa-se uma banda em 3327 cm^{-1} atribuída ao modo vibracional nOH referente ao grupo OH dos ácidos carboxílicos, outras três bandas intensas características desses ácidos que compõem o OL estão presentes no espectro, em 1165 cm^{-1} atribuída ao $nC-O$ e duas em 1744 cm^{-1} e 1711 cm^{-1} , ambas atribuídas ao modo vibracional $nC=O$ referente aos ácidos carboxílicos presentes no óleo. Resultados semelhantes foram obtido por Do Nascimento *et al.* (DO NASCIMENTO, et al., 2019).

Ao analisar os espectros da lecitina, do óleo livre e da formulação PeNE, e compara-los é possível observar que a incorporação do óleo de pequi na formulação branca (lecitina) não altera o espectro vibracional na região do infravermelho (ver espectro da PeNE). Entretanto, as energias vibracionais dos modos $n_{as}(N^+(CH_3)_3)$ e $n_{as}(PO_2^-)$, centradas em 970 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} , respectivamente, não sofrem alterações com a incorporação do óleo de pequi. Ao fazer uma análise minuciosa dos espectros, não se observa um deslocamento significativo nas frequências vibracionais das bandas associadas à cabeça polar do fosfolípido, o que permite inferir que os grupos PO_2^- e $N^+(CH_3)_3$ não estão diretamente envolvidos nas interações entre o fosfolípido e as moléculas que compõem o óleo de pequi. Entretanto, pequenas alterações espectrais são observadas no espectro da PeNE devido à presença do óleo de pequi na região correspondente ao $n_{as}(C-O-P-O-C)$ em 1174 cm^{-1} e principalmente nas vibrações atribuídas ao estiramento $C=O$ do éster e grupos metilenos. Deve-se salientar que as bandas referentes ao metileno, bem como a banda atribuída ao $nC=O$ são sensíveis à ordem conformacional das cadeias de hidrocarboneto. O primeiro é sensível ao número relativo de conformadores rotacionais *trans* e *gauche* presentes nessas cadeias, enquanto o segundo é

uma sonda sensível à hidratação da interface, que depende de alterações na estrutura conformacional da cadeia de hidrocarbonetos (BENESH, et al., 2014).

A figura 13 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho das formulações PeNE e PeNE + PEG

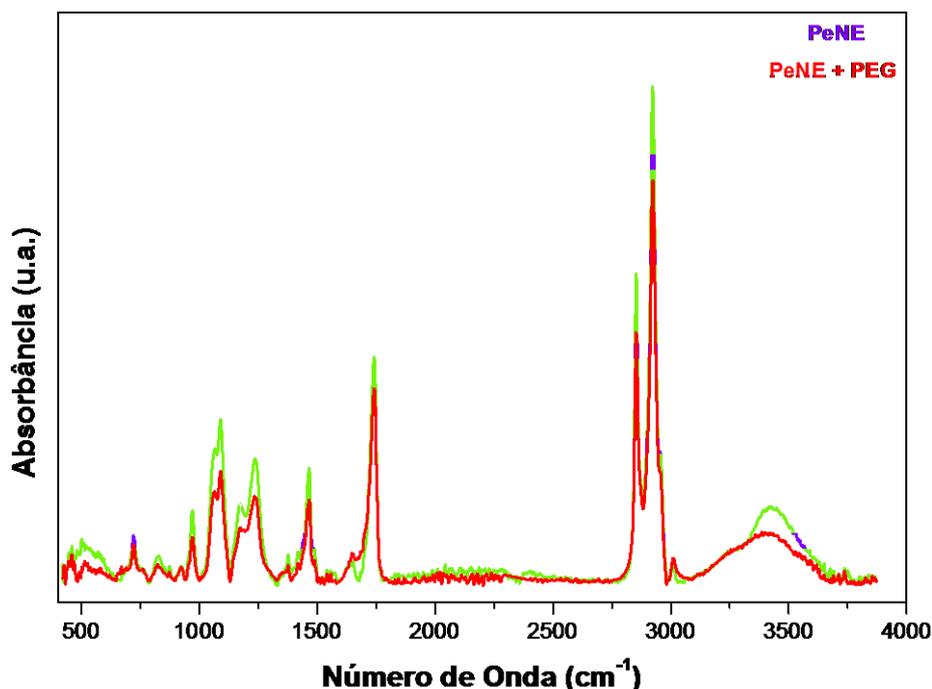


Figura 13 Espectros vibracionais na região do infravermelho das formulações PeNE e PeNE + PEG sobrepostos.

Ao analisar a figura 13, observa-se assim como na Figura AA que as bandas mais intensas em todos os espectros são as atribuídas aos modos vibracionais dos hidrocarbonetos: $\nu_s\text{CH}_2$, $\nu_{as}\text{CH}_2$, $\nu_s\text{CH}_3$, $\nu_{as}\text{CH}_3$ e *scissoring* do CH_2 em $\sim 2955\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2884\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2924\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2860\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1466\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Bandas associadas à deformação do grupo CH_2 , *rocking* CH_2 , próximo de 721 cm^{-1} em $\sim 1377\text{ cm}^{-1}$ banda atribuída a deformação simétrica CH_3 (KULIGOWSKI, et al., 2008). Observa-se também a banda $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ em ambos os espectros atribuída ao modo vibracional $\nu\text{C}=\text{O}$, assim como os modos vibracionais atribuídos $\nu_{as}(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$ e $\nu_{as}(\text{PO}_2)$ e $\nu_{as}(\text{C}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{C})$ em 972 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} e 1175 cm^{-1} , respectivamente.

As duas bandas características do PEG conforme mencionado na página 45 são atribuídas aos modos vibracionais νOH ($\sim 3400\text{ cm}^{-1}$) referente à função álcool e $\nu\text{C}=\text{O}$ ($\sim 1736\text{ cm}^{-1}$) referente à carbonila do grupo éster, bandas estas na mesma região e atribuídas aos mesmos grupamentos (OH e C=O) presentes

no espectro da formulação PeNE, sendo assim, ao analisar a sobreposição dos espectros das formulações PeNE e PeNE + PEG observa-se que os espectros são semelhantes, não sendo possível confirmar por essa técnica a presença do PEG.

A figura 14 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho do das formulações PeNE e PeNE + AF.

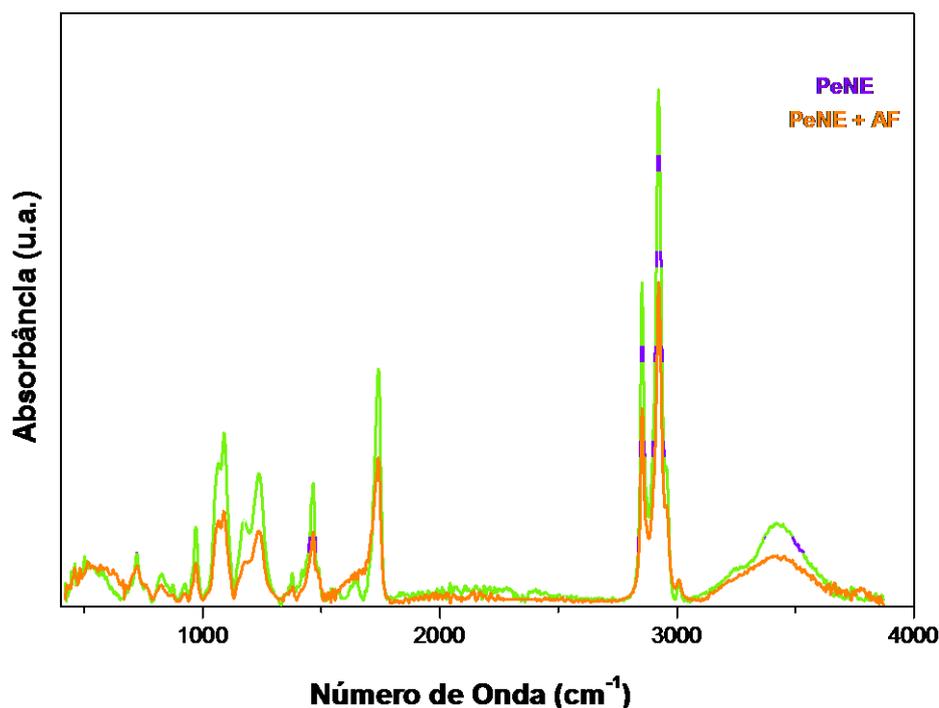


Figura 14 - Espectros vibracionais na região do infravermelho das formulações PeNE e PeNE + AF sobrepostos.

Ao analisar a figura 14, observa-se que ambos os espectros são semelhantes, não tem o surgimento e nem deslocamento de bandas no espectro da PeNE + AF comparado ao espectro da formulação PeNE. O conjugado que foi adicionado a formulação PeNE para a obtenção da formulação PeNE + AF apresenta três bandas características: $\sim 3416\text{ cm}^{-1}$, 1736 cm^{-1} e 1607 cm^{-1} atribuídas aos modos vibracionais nOH, nC=O e nanel benzeno, respectivamente. As duas primeiras bandas não podem ser utilizadas para identificar a presença do conjugado em PeNE + AF, pois, estão na mesma região de bandas já atribuídas no espectro da PeNE, e o anel benzeno em 1607 cm^{-1} não é observado no espectro. Diante dessa análise, pode-se sugerir que o conjugado está presente em baixa concentração na formulação, o que dificulta

avaliar mudanças no espectro vibracional e conseqüentemente identifica-lo com essa técnica, sendo necessário fazer uso de outras técnicas de identificação.

4.3. Análise da estabilidade após período de armazenamento

As formulações foram analisadas quanto aos seus parâmetros físico - químicos, ou seja, diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta, por um período total de 30 dias. (Figuras 15, 16 e 17).

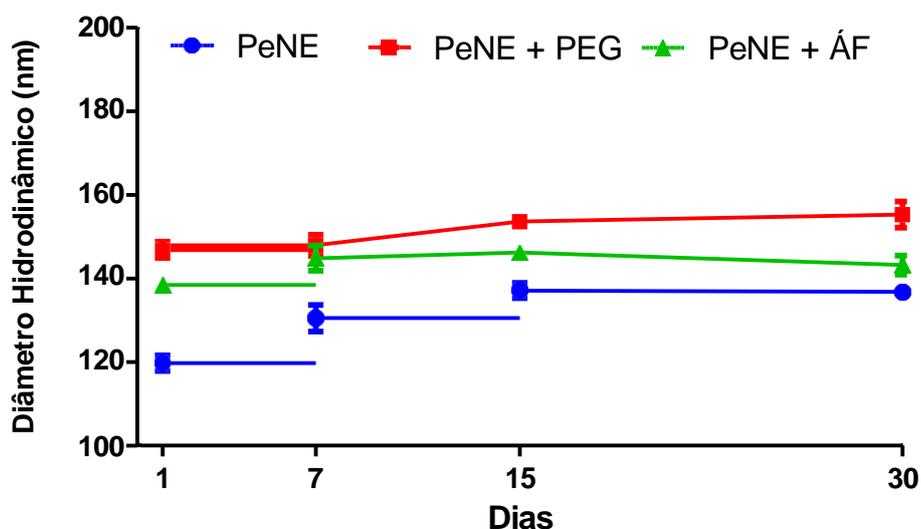


Figura 15 - Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), armazenadas à 4°C ao abrigo de luz nos períodos de acompanhamento (0, 7, 15 e 30 dias).

Durante o período analisado não foi observada mudança estatisticamente significativa no diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões, apesar da PeNE ter aumentando um pouco seu tamanho de $\pm 120\text{nm}$ para $\pm 139\text{nm}$ durante o período analisado, como mostra a figura 15, todas se mantiveram dentro do tamanho esperado.

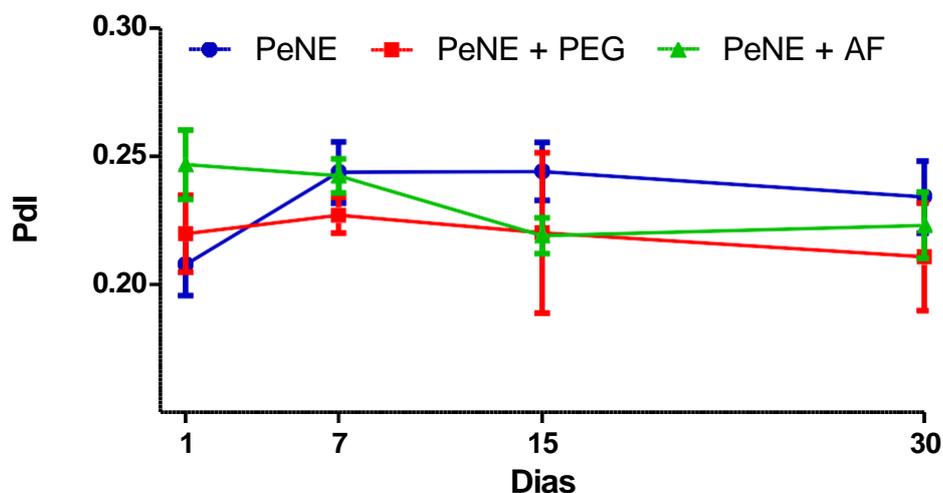


Figura 16- Gráfico comparativo entre o índice de polidispersão das nanoemulsões à PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), armazenadas à 4°C ao abrigo de luz nos períodos de acompanhamento (0, 7, 15 e 30 dias).

O índice de polidispersão de todas as nanoemulsões foram $\leq 0,25$ mostrando que os DHs da formulação estão na faixa de valor mais próxima do que é considerado homogêneo dentro da escala de Pdl. Como mostra a figura 16, PeNe teve um pequeno aumento de $\pm 0,20$ para $\pm 0,25$ porém não foi significativo, já PeNe+PEG manteve o mesmo perfil e PeNe+AF teve uma pequena diminuição para $\pm 0,21$ mas todas se mantendo estáveis durante o período analisado.

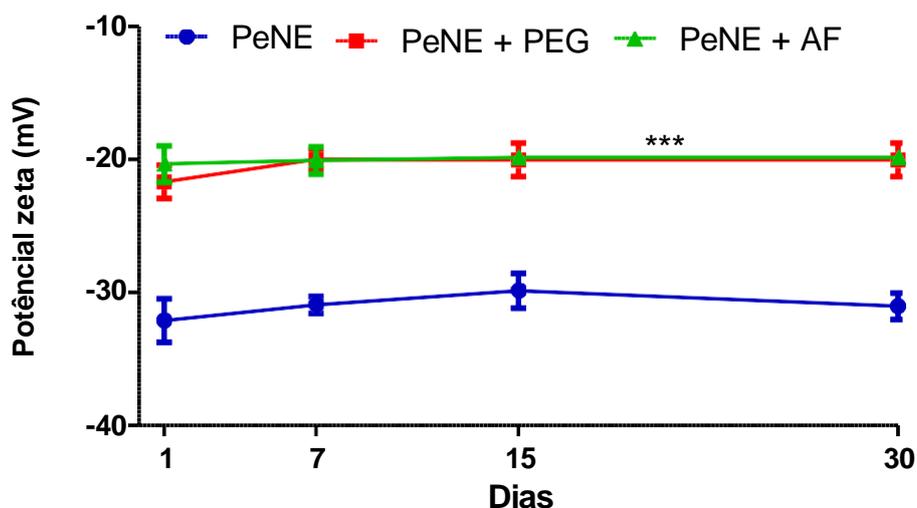


Figura 17 - Gráfico comparativo entre potencial zeta das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF

(nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), armazenadas à 4°C ao abrigo de luz nos períodos de acompanhamento (0, 7, 15 e 30 dias). ANOVA, pós-teste de Tukey, diferença significativa em relação ao grupo PeNE, *** $p < 0,001$.

Quando comparado o potencial zeta das formulações PeNE+PEG e PeNE+AF em relação a PeNE nota-se uma diferença significativa entre elas, mas isso se deve a modificação na superfície das mesmas, mas ao decorrer do período analisado ambas as formulações se mantiveram estáveis como mostra na figura 17.

O pH das nanoemulsões se manteve igual 6 e em relação aos aspectos macroscópicos não houve formação de cremagem e de precipitado, mostrando que as formulações se mantiveram estáveis durante o período de armazenamento de 30 dias, a 4°C e sob abrigo de luz.

4.4. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após variação de pH

As nanoemulsões foram avaliadas quanto à sua estabilidade em diferentes pHs, onde foram modificados para pHs iguais a 3, 5, 7, 9 e 11, utilizando NaOH e HCL a 0,25M para tal ajuste, lembrando que seu pH inicialmente era igual a 6. O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e o potencial zeta estão representados nas figuras 18,19 e 20 respectivamente.

Foi possível notar que, mesmo em diferentes pHs, as nanoemulsões PeNE+PEG e PeNE+AF continuam mantendo suas características originais quanto ao diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão, como mostra a figura 18 e 19. Já PeNE quando seu pH foi modificado para 5, observou-se aumento significativo do DH e Pdl mas, para os demais pHs, a formulação retorna ao seu perfil original, como observado nas figuras 18 e 19. Adicionalmente, foi possível observar uma separação de fase quanto ao seu aspecto macroscópico quando o seu pH está igual a 5, o que explica a brusca mudança de DH e Pdl.

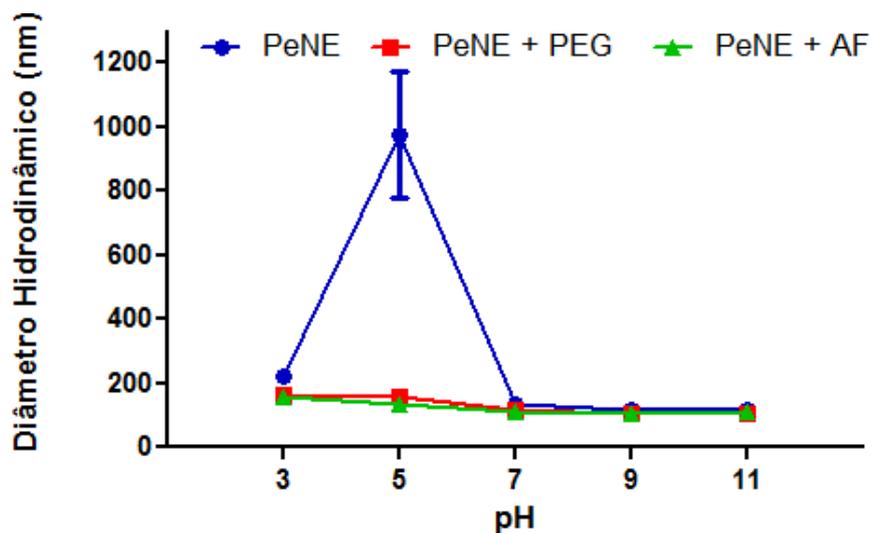


Figura 18 - Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após a variação de pH.

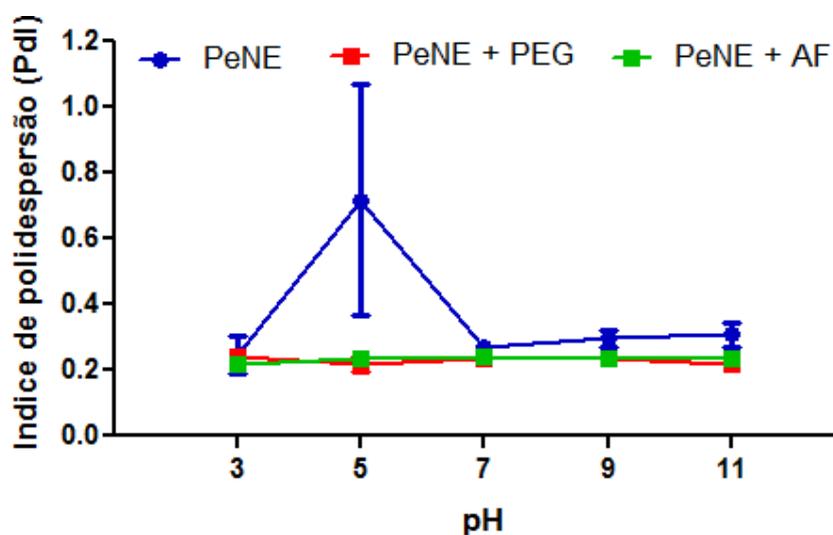


Figura 19 Figura - Gráfico comparativo entre o índice de polidispersão das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após a variação de pH.

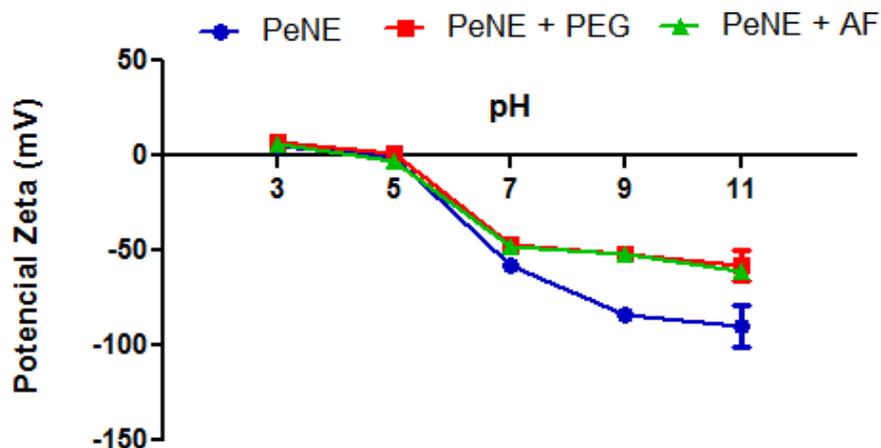


Figura 20 - - Gráfico comparativo entre o potencial zeta das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após a variação de pH.

Com a variação de pH, foi possível observar uma mudança significativa no potencial zeta (Figura 20), variando de +6,18mV até -60,64mV para PeNE+AF, +7,64mV até -57,55mV para PeNE+PEG e +5,00mV até - 89,63mV para PeNE, nos pHs 3 e 11 respectivamente. Este potencial depende do grau de ionização do agente emulsionante e, portanto, é pH dependente. O aumento de cátions H⁺ em meio ácido e ânions OH⁻ em meio alcalino explica a habilidade das nanoemulsões de reverter a carga de superfície frente à alteração de pH (BRUXEL et al., 2012; HONARY & ZAHIR, 2013).

O ponto em que a carga de superfície se encontra igual a 0 mV é o ponto isoelétrico (PI), significando que neste ponto, os protons do sistema são requeridos para neutralizar a carga negativa presente na superfície da nanogotícula (HONARY & ZAHIR, 2013). O PI encontrado nas nanoemulsões de pequi estão próximas do pH 5, como é possível notar na figura 20.

Em tumores sólidos, o microambiente tumoral encontra-se ácido e a membrana das células carregadas negativamente. Sendo assim, a alteração pH-dependente na carga de superfície de nanoemulsões pode ser considerada uma vantagem para que essas formulações possam ser utilizadas para tratamentos de tumores, promovendo uma maior interação entre as células e as nanogotículas no meio ácido (GARCIA- MARTIN,2006).

4.5. Avaliação da estabilidade de nanoemulsões após diluição em série

.Nanoemulsões muitas vezes são confundidas com as microemulsões, porém as principais diferenças clássicas entre nanoemulsões e microemulsões está na gama de tamanhos das gotículas e características de estabilidade. Nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, isto é, ocorre separação de fases na mudança de temperatura. No entanto, as nanoemulsões podem ser cineticamente estáveis em grande espaço de tempo (GUPTA, 2016), ou seja, mesmo sofrendo mudanças, como por exemplo adição de água, vão permanecer com as mesmas características.

Então, as nanoemulsões produzidas foram avaliadas após serem submetidas a uma diluição seriada, onde adicionamos mais diluente na proporção de 1:1 seguidas vezes e avaliamos os parâmetros como aspecto macroscópico, diâmetro hidrodinâmico, Pdl e potencial zeta das nanoemulsões, (figuras 21,22 e 23).

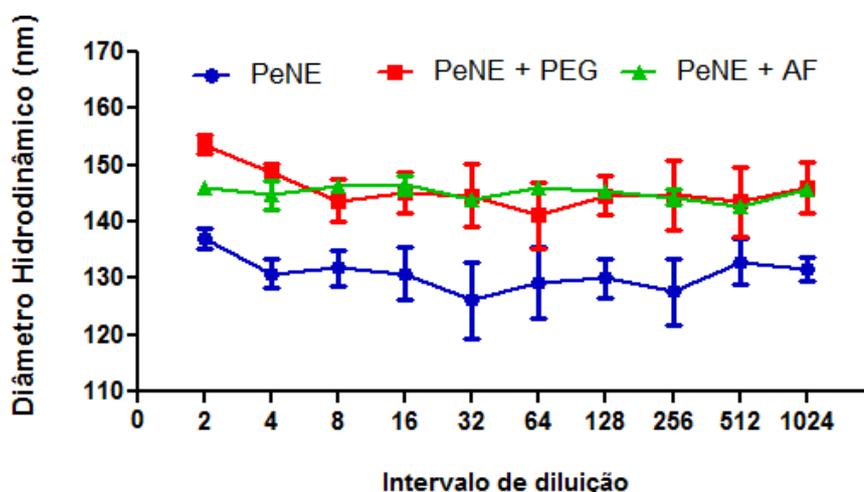


Figura 21 Figura - Gráfico comparativo entre o diâmetro hidrodinâmico, das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após diluição seriada.

Como podemos observar na figura 21, o DH manteve estável em ambas as formulações e em todas as diluições testadas, principalmente PeNE+AF. Já o Pdl representado na figura 22, a PeNE na diluição em 32x teve uma pequena diminuição, porém essa alteração não foi significativa e se manteve estável ao

decorrer das diluições, apresentando assim que as formulações se encontram com o tamanho e polidispersividade no padrão adotado pelo presente estudo.

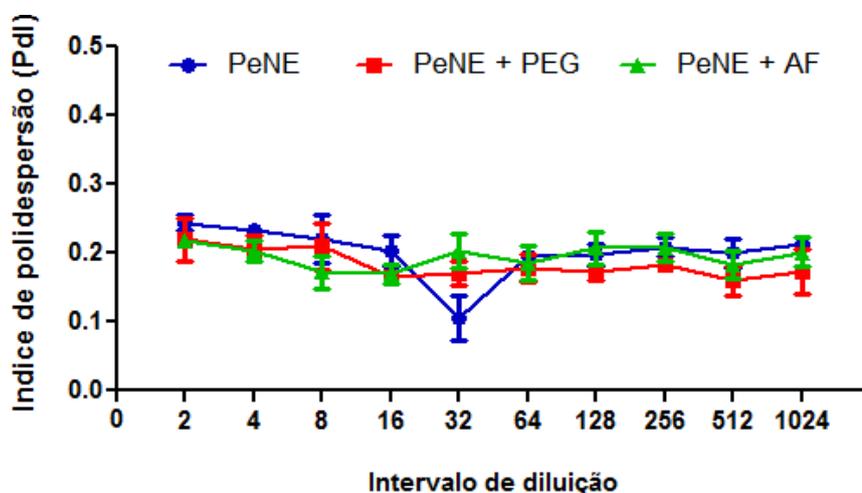


Figura 22 - Gráfico comparativo entre o índice de polidispersão, das nanoemulsões à PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após diluição seriada.

Já em relação ao potencial zeta houve um aumento em módulo, variando o potencial Zeta de $-27,40\text{mV}$ inicialmente a $-48,00\text{mV}$ na diluição final (Figura 23), para PeNE. Já PeNE+PEG e PeNE+AF ambas se mantiveram parecidas e houve um pequeno aumento passando de -20mV para -30mV em módulo, mas que não foi estatisticamente significativo. Entretanto, mesmo com essas poucas mudanças não há descaracterização das nanoemulsões, pois o Pdl continua $\leq 0,300$ e o DH $<200\text{nm}$.

Em relação aos aspectos macroscópicos, não foi observado separação de fase ou formação de cremagem. No decorrer das diluições, as formulações apresentaram aspecto mais translucido devido a adição de PBS 1x e o pH permaneceu igual a 6.

Portanto todas as formulações analisadas continuam dentro dos padrões estabelecidos pelo estudo e caracterizam uma nanoemulsão, mostrando serem estáveis no teste de diluição seriada, sendo uma vantagem, visto que, pensando em ensaios *in vivo* e em tratamentos clínicos futuros essas formulações podem passar por diluições ao serem administradas em pacientes, por isso a

importância de analisar se essas formulações permanecem estáveis a variação de diluição

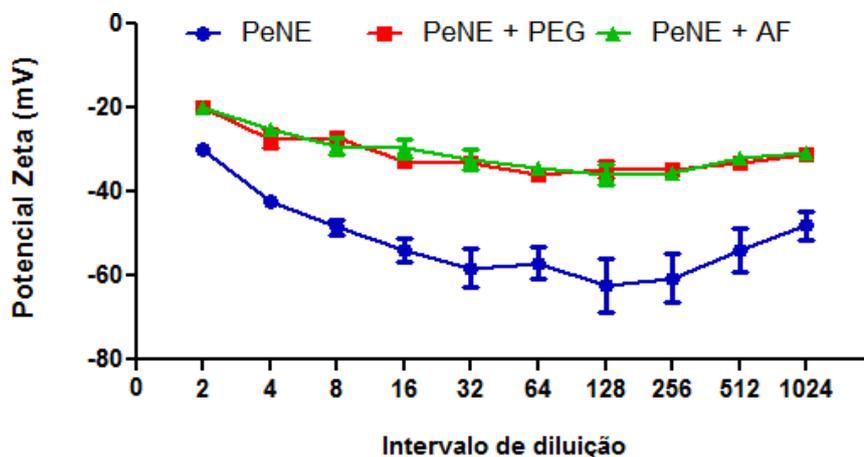


Figura 23 - Gráfico comparativo entre o potencial zeta, das nanoemulsões PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico), após diluição seriada.

4.6. Análise da viabilidade celular após o tratamento

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* representam estudos primordiais para entender os efeitos e os mecanismos de ação de novos tratamentos, sendo assim uma etapa de grande relevância e corresponde a um dos primeiros passos da investigação da nanotoxicidade, dentre esses ensaios temos o ensaio de viabilidade celular, onde utilizamos o método de MTT, que baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular, onde a viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (VC) (Berridge, 1993; Mosmann, 1983).

Esse ensaio foi utilizado para investigar a atividade citotóxica das formulações em células de câncer de mama, 4T1, em diferentes concentrações, sendo uma mais concentrada, 360µg/mL, uma intermediária 180µg/mL e uma menos concentrada 90µg/mL, nos tempos de 24h e 48h (figuras 24 e 25).

Inicialmente optamos por fazer as nanoemulsões em diversas proporções de PEG e de conjugado ácido fólico PEG, variando de 2% a 0% em molaridade em relação a proporção de fosfolipídios totais da formulação. Com o intuito de verificar se os outros componentes das nanoemulsões poderiam apresentar alguma atividade citotóxica, foi realizada a síntese de formulações em condições similares das nanoemulsões porém sem o óleo de pequi. Tais formulações foram denominadas como Branco (contendo apenas lecitina e PBS) e os Brancos contendo as mesmas proporções de PEG e conjugado. O controle foi considerado o valor absoluto de 100% de viabilidade celular e todos os grupos foram comparados a este.

Os resultados obtidos no tempo de 24h estão representados na figura 24, onde pode-se afirmar que houve efeito citotóxico de todas as formulações em células de câncer de mama, apresentando uma atividade dose-dependente das mesmas, ou seja, quanto maior a concentração da formulação, menor a viabilidade celular variando entre $\pm 70\%$ e $\pm 25\%$ de VC, para $90\mu\text{g/mL}$ e $360\mu\text{g/mL}$ respectivamente para todas as nanoemulsões. A concentração de $180\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade celular para $\pm 50\%$ em todas as formulações, portanto sendo a concentração escolhida para continuar os ensaios *in vitro* (Figura 24).

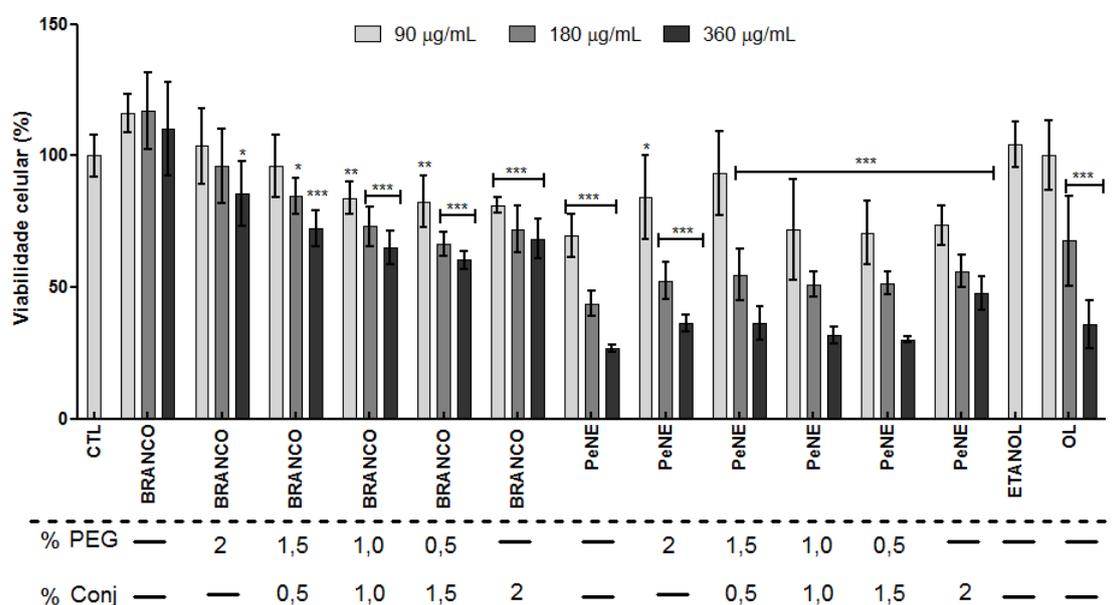


Figura 24 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de mama (4T1), submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações ($90\mu\text{g/mL}$, $180\mu\text{g/mL}$, $360\mu\text{g/mL}$) de PeNE (nanoemulsão de pequi); Branco (formulação lecitina e PBS) em diferentes proporções de PEG e Conj (conjugado ácido fólico PEG); Etanol e OL (óleo livre) comparados com controle por 24 horas. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,001$).

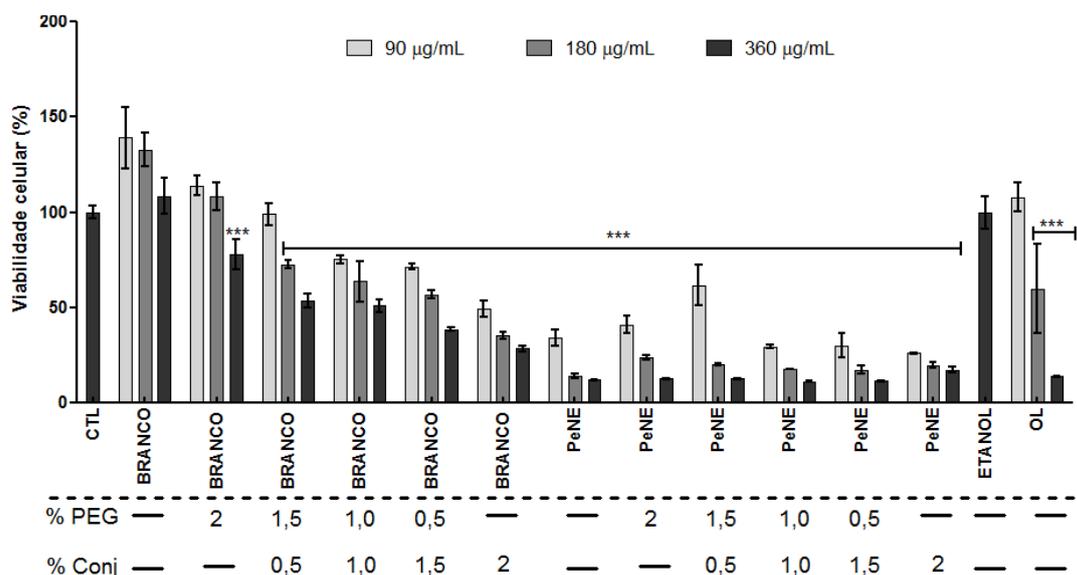


Figura 25 - Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de mama (4T1), submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações (90µg/mL, 180µg/mL, 360µg/mL) de PeNE (nanoemulsão de pequi); Branco (formulação lecitina e PBS) em diferentes proporções de PEG e Conj (conjugado ácido fólico PEG); Etanol e OL (óleo livre) comparados com controle por 48 horas. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,001$)

Como todas as formulações apresentaram o mesmo perfil de citotoxicidade, o critério de desempate para a escolha da proporção de PEG a ser utilizada nos próximos experimentos foi a citotoxicidade dos respectivos brancos de cada formulação. O Branco com 2% de PEG na concentração de 360µg/mL reduziu um pouco a viabilidade celular para $\pm 80\%$, sendo pouco significativo. Analisando isoladamente os demais brancos que possuem o conjugado, é possível notar que o branco com 2% de conjugado foi o que apresentou uma maior toxicidade em comparação aos demais, sendo assim uma proporção já descartada. As proporções de 1,0% e 0,5% de conjugado apresentaram o perfil parecido, então o critério de escolha foi a quantidade de conjugado na formulação, portanto a proporção 1% de PEG e 1% de conjugado foi escolhida para dar continuidade ao estudo, sendo denominada de PeNE+AF.

Já a viabilidade celular analisada no período de 48h (figura 25) mostrou que todas as nanoemulsões reduzem de forma significativa a VC de maneira dose-dependente, mas não havendo mudança entre elas, houve redução da VC para $\pm 11\%$ na maior concentração (360µg/mL). O branco demonstrou um aumento da viabilidade para $\pm 140\%$ quando tratado na menor concentração, podendo ser um indicativo de proliferação celular. Como nesse período de análise, os tratamentos reduziram muito a viabilidade celular, se torna inviável

usar esse tempo para os demais ensaios, visto que não haverá número de células suficiente para a realização dos mesmos, sendo assim foi selecionado o período de 24h para dar continuidade aos ensaios.

Em estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (OMBREDONE, 2018) utilizando nanoemulsão a base de óleo de pequi associada a ácido anacárdio em células 4T1-Luc, observou-se uma redução da viabilidade dose dependente, chegando até a 30% de VC na maior concentração testada que foi 540 µg/mL, demonstrando o efeito citotóxico desse tratamento. Já em estudos realizados por Yassemi et al, 2020, revela que há um aumento da citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas quando modificadas com ácido fólico em células de câncer de mama MCF-7, o que pode ser atribuído à endocitose mediada por receptor de folato.

.4.7. Morfologia Celular

A morfologia celular é um importante indicativo de viabilidade, alterações severas desencadeadas por agentes citotóxicos geralmente culminam na modificação da morfologia celular. Portanto células 4T1 foram avaliadas quando aos seus aspectos morfológicos após 24h de tratamento com nanoemulsões de pequi na concentração de 180µg/mL.

Como observado nas imagens, obtidas por microscopia de contraste de fase (figura 26), as células do grupo controle (sem tratamento) apresentaram morfologia peculiar desta linhagem (4T1) contendo características como presença de várias projeções da membrana citoplasmática e formato fusiforme. Já as células expostas aos tratamentos com as nanoemulsões mostraram-se menores e mais arredondada, o que sugere uma morte celular por apoptose, pois células apoptóticas são caracterizadas pela desidratação e redução do volume e granulosidade celular, ondulações na membrana plasmática, aumento do volume mitocôndrial e condensação do material genético (MAJNO, 1995; DARZYNKIEWICZ et al., 1997)

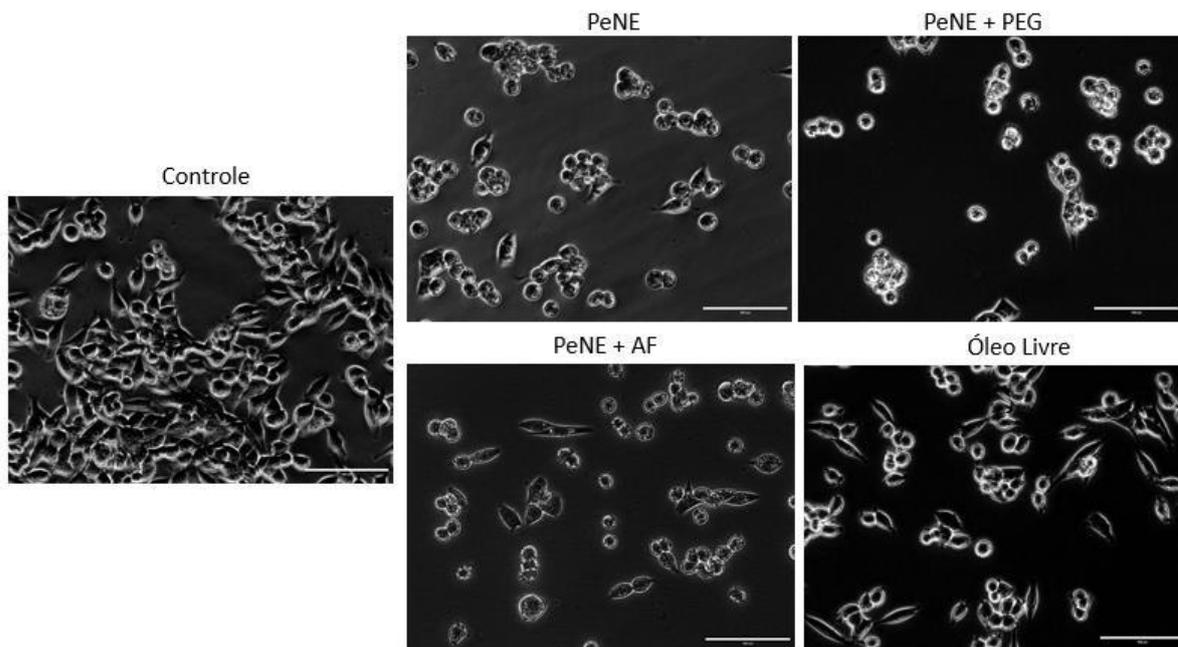


Figura 26 - Aspecto morfológico de células de câncer de mama (4T1-Luc) por microscópio de contraste de fase 40x. Representadas na escala de 100µm. As células foram expostas nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL.

4.8. Efeito das nanoemulsões à base de óleo de pequi na proliferação celular de 4T1.

O controle da proliferação celular em células tumorais é considerado uma eficiente estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral (MOLINARI, 2000). Para analisar se as nanoemulsões alteram a proliferação celular de células de câncer de mama 4T1, foram avaliados seus efeitos no número de células e no ciclo celular após o tratamento na concentração de 180µg/mL no período de 24h, sendo uma avaliação a curto prazo (figuras 27 e 28) e também foi avaliado sua proliferação celular a longo prazo através do ensaio de clonogenicidade (figura 28).

Como é possível observar na figura 27 após 24 horas de incubação, PeNE+PEG e PeNE+AF reduziram significativamente o número de células 4T1 (1,59 e 1,64 x 10⁶ células/mL, respectivamente; p < 0,05), quando comparada ao controle. Tais dados mostram que esses tratamentos estão relacionados a redução da proliferação celular. Os brancos, PeNE e o óleo livre não apresentam redução significativa do número total de células. Para melhor investigar esse

efeito a fragmentação de DNA e o ciclo celular de células 4T1 também foram avaliados.

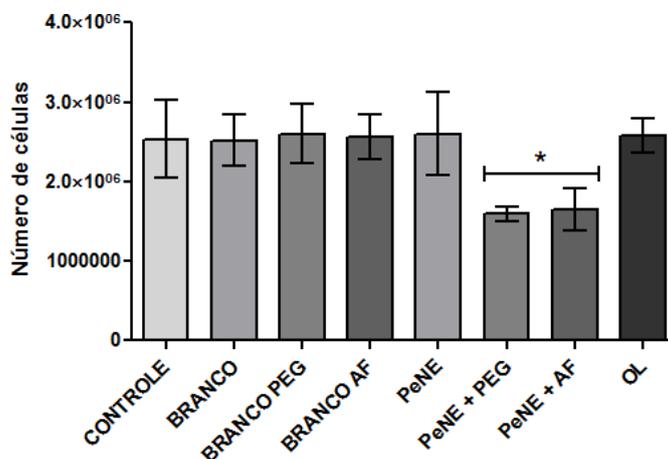


Figura 27 - O número total de células de câncer de mama (4T1-Luc) tratadas com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por 24h. Esse resultado obtido por meio da contagem total das células em câmara de Neubauer após o tempo de incubação. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (*: $p < 0,05$)

Para a avaliação do ciclo celular foi realizado ensaio de citometria de fluxo nas mesmas condições citadas anteriormente. Como ilustrado na figura 28, é possível observar que ambas condições em que as células foram expostas cerca de $\pm 60\%$ das células estão na fase G1, $\pm 20\%$ na fase S e $\pm 20\%$ corresponde a fase G2/M em, demonstrando que nenhum tratamento alterou de forma significativa o perfil do ciclo celular de células 4T1 quando comparadas ao controle, o mesmo efeito foi observado em Ombredone 2018. Portanto podemos inferir que a diminuição da proliferação celular induzida por PeNE+PEG e PeNE+AF não está associada a alteração do ciclo celular.

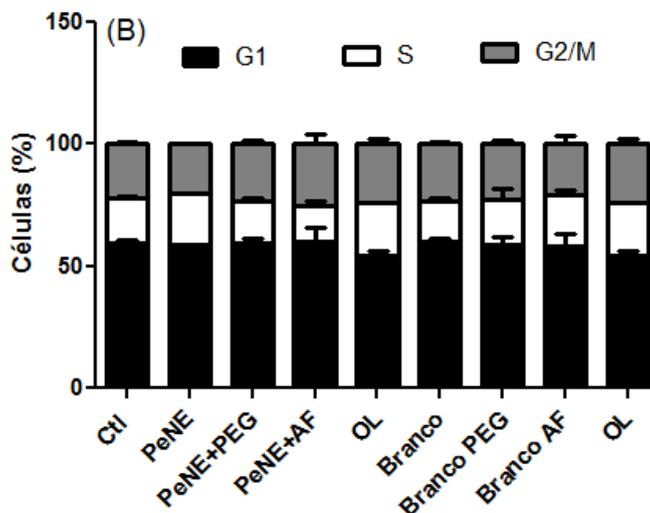


Figura 28 - Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo de células de câncer mama (4T1 - Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas a nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+ AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por 24 horas. O tampão fosfato foi usado como controle. Sendo avaliada pela média geométrica

Além disso, as células também foram avaliadas quanto a formação de colônias após a exposição ao tratamento por 24h. Após 5 dias de incubação as células apresentaram formação de colônias e estavam firmemente aderidas à placa de cultura, que depois de coradas foi realizada a contagem do número de colônias e calculada a fração de sobrevivência (FS) das células, representando a proliferação celular a longo prazo.

Como podemos observar na figura 29, as células expostas aos tratamentos PeNE e PeNE+AF reduziram a fração de sobrevivência das células para $\pm 0,43$ e $\pm 0,33$, respectivamente, sendo significativo quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$). Os brancos, PeNE+PEG e o óleo livre não apresentam redução significativa da FS.

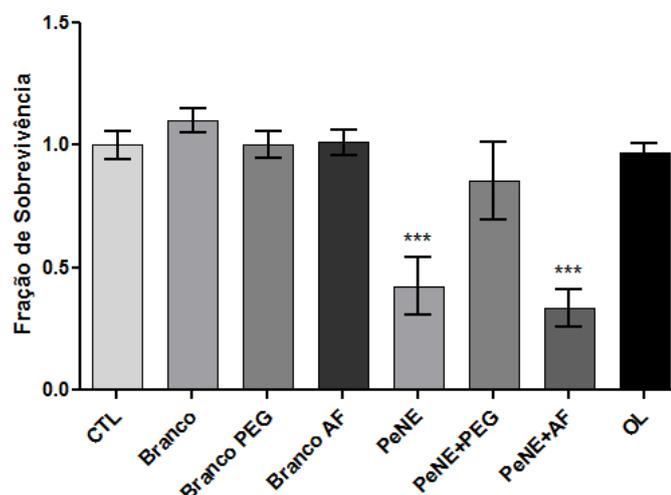


Figura 29- Ensaio de formação de colônias. Fração de sobrevivência de células de câncer de mama (4T1-Luc) tratadas com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por um período total de 5 dias. Representação de média ± desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,001$)

O tratamento com PeNE+AF foi a formulação que reduziu a proliferação celular em ambas as análises, tanto em curto quanto a longo prazo, porém sem apresentar mudança no ciclo celular. Em seguida, os efeitos das nanoemulsões em estruturas celulares importantes como o DNA, o lisossomo, a mitocôndria e a membrana plasmática foram analisadas.

4.9. Citometria de Fluxo (Fragmentação de DNA, Lissosomo, Potencial de membrana mitocondrial e integridade de membrana)

Ensaio de citometria de fluxo foi realizado para investigar o efeito das amostras na fragmentação do DNA das células de adenocarcinoma mamário murino 4T1-luciferase após período de 24h de exposição. Esse fenômeno é considerado como sendo um índice de morte celular por apoptose tardia, desencadeado após a ativação de caspases, que ativam endonucleases contribuindo para a intensa fragmentação de DNA e condensação da cromatina (SAVILL et al., 2000) e/ou necrose. Como observado na Figura 30, foi possível observar que PeNE+PEG e PeNE+AF teve $\pm 18,60\%$, $\pm 21,23\%$ de DNA fragmentado, respectivamente, sendo estatisticamente significativo em

comparação ao controle. O óleo livre e os brancos não apresentaram fragmentação de DNA.

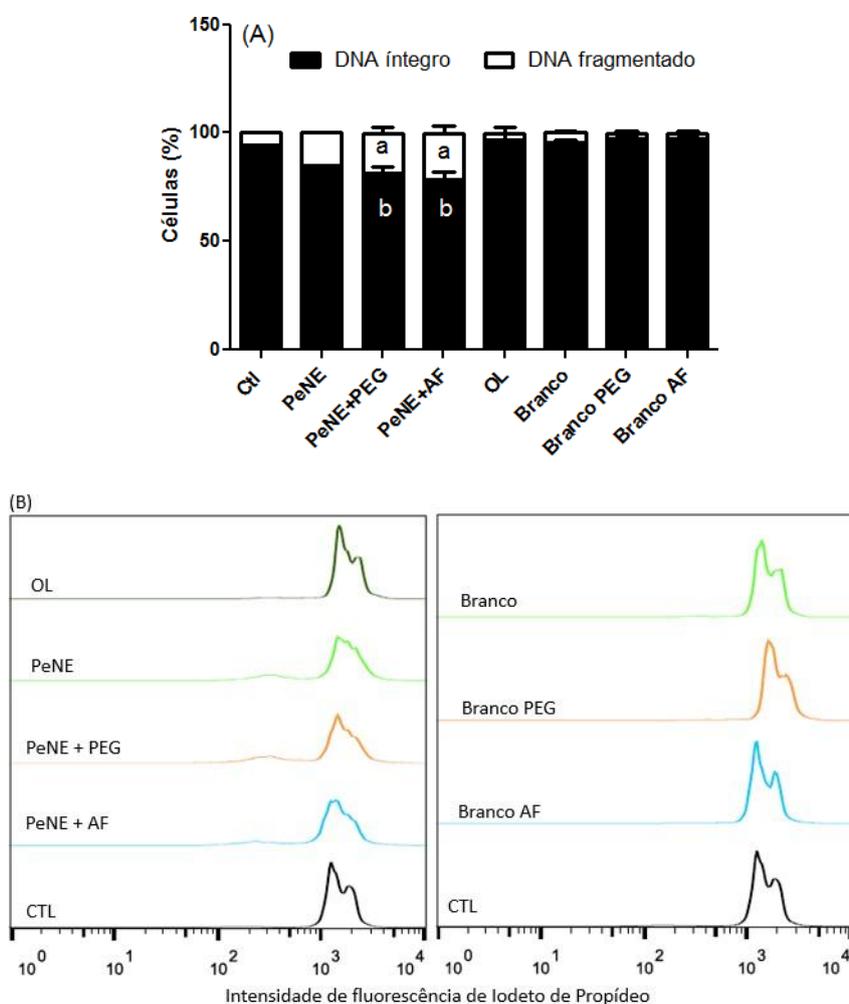


Figura 30 - Avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas a nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por 24 horas. O tampão fosfato foi usado como controle. A avaliação de fragmentação de DNA foi avaliada pela média geométrica (A) e pela intensidade de fluorescência de Iodeto de Propídeo (B). ANOVA a dois fatores: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos .

Também foi realizado ensaio de citometria de fluxo para avaliar a permeabilização da membrana lisossômica (PML) em células 4T1, após 24 horas de exposição aos tratamentos na concentração de 180µg/mL para investigar se a associação do ácido fólico na superfície da nanoemulsão à base de óleo de pequi aumenta sua internalização e se há mudança no PML das células,

sabendo que em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa nanoemulsões à base de óleo de pequi alteram esse parâmetro (OMBREDONE, 2018).

Após a exposição ao tratamento com as nanoemulsões houve uma redução significativa do sinal de fluorescência do laranja de acridina em ambos os tratamentos como é possível observar na figura 31, porém não há mudança significativa entre os tratamentos, demonstrando que mesmo com a modificação da superfície o efeito da nanoemulsão não modificada foi preservada nesse aspecto. O óleo livre e os brancos não alteraram a acidez do lisossomo, demonstrando que os excipientes da formulação não alteraram o PML das células de câncer de mama 4T1 nessa concentração e tempo analisados, evidenciando que a nanoemulsão potencializa o efeito do óleo e ele que proporciona tais efeitos celulares

Por um longo tempo, os lisossomos eram vistos apenas como compartimentos de reciclagem e lixo das células (TODKA, et al., 2017). mas hoje em dia, também são vistos por sua permeabilização lisossômica e a liberação de proteases no citosol e recentemente tem sido associado às mitocôndrias por desempenhar um papel na morte das células cancerosas (BARTEL K, 2019). Sabe-se que o lisossomo está ligado aos processos de morte celular, como apoptose e autofagia, portanto a presença de proteases lisossômicas no citosol desencadeia a liberação e a disfunção mitocondrial (GUICCIARDI, et al., 2004).

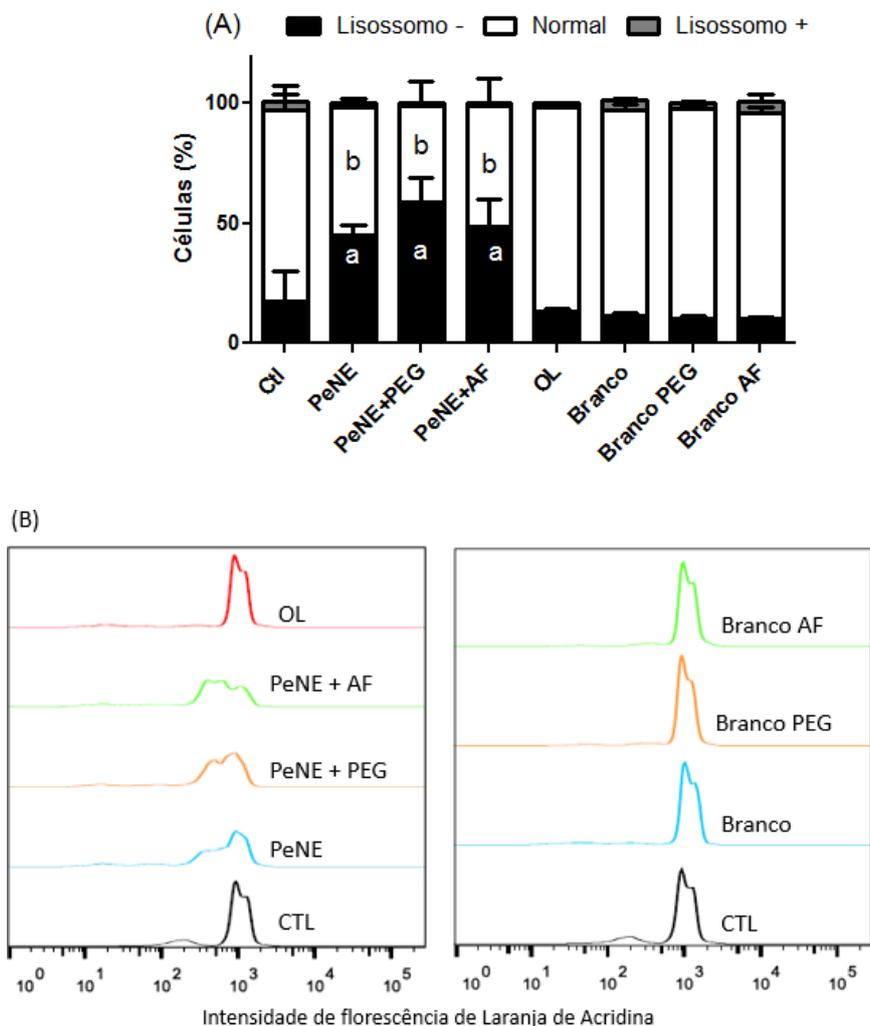


Figura 31- Atividade lisossômica de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas PeNE(nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL. O tampão fosfato foi usado como controle. O estado funcional do lisossomo foi medido por Laranja de Acrídita (LA) com representação da porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência da LA (B). ANOVA a dois fatores: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

O potencial da membrana mitocondrial (PMM) foi outra análise realizada por citometria de fluxo. A mitocôndria é responsável pela produção de energia celular e tem um papel crucial no processo de apoptose, principalmente pela via intrínseca 21. A alteração da MMP 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 22.

Como observado na figura 32, houve despolarização significativa em células expostas à todas as nanoemulsões e ao óleo livre, já os brancos não

alteraram de forma significativa o PMM em relação ao controle. Sendo que PeNE e óleo livre apresentaram maior despolarização sendo equivalente a $\pm 90\%$ e $\pm 87\%$ respectivamente, PeNE+PEG de $\pm 81,6\%$ e PeNE+AF apresentando o menor despolarização sendo equivalente a $\pm 42,5\%$. Essa despolarização pode estar associada com o mecanismo de morte celular por apoptose pela via intrínseca. Demonstrando assim que a modificação da nanoemulsão com ácido fólico alterou o parâmetro analisado.

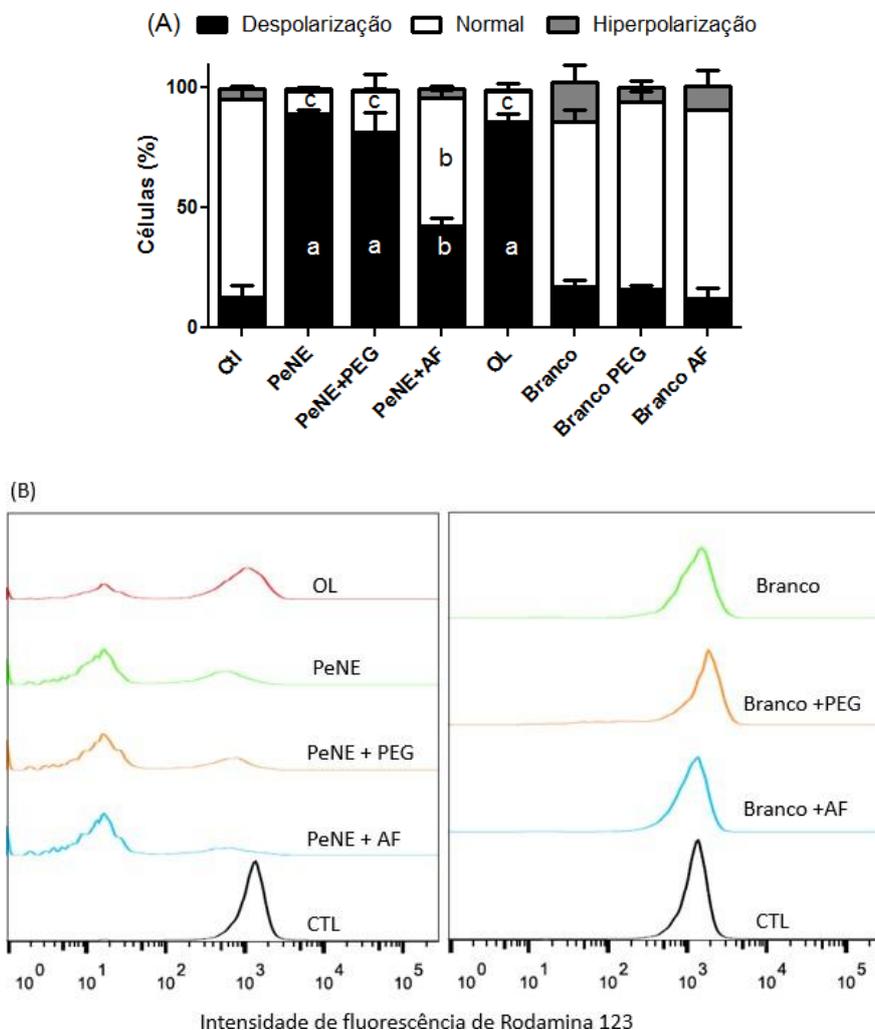


Figura 32- Atividade do potencial de membrana mitocondrial (PMM) de células de câncer mama (4T1-Luc) por citometria de fluxo. As células foram expostas PeNE(nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de $180\mu\text{g}/\text{mL}$. O tampão fosfato foi usado como controle. O estado funcional do PMM foi medido por Rodamina. com representação da porcentagem de células (A) e intensidade de fluorescência da LA (B). ANOVA a dois fatores: diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$ (teste post hoc de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

Diante dos resultados apresentados podemos inferir que um possível mecanismo de ação dessas nanoemulsões seria a morte celular por apoptose, que é um modo de morte celular programada para eliminar danos e células antigas do sistema sem afetar outros tecidos, no entanto, as células cancerosas evitam a apoptose e sustentam a proliferação. A indução de apoptose usando agentes antitumorais é uma estratégia essencial para dominar a carcinogênese. A apoptose é coordenada por componentes críticos conhecidos como caspases. A caspase-3 desempenha um papel crucial no processo de apoptose. A ativação da caspase-3 finalmente leva à fragmentação do DNA e morte celular (YASSEM, et al., 2019).

A alteração do PML pode desestabilizar as trocas de cálcio (Ca^{2+}) com outra organela abundante, o retículo endoplasmático (RE). O RE é responsável pela regulação da síntese de proteínas e da homeostase do Ca^{2+} 29. O Ca^{2+} é principalmente armazenado no RE e realiza um papel importante como regulador do metabolismo celular e está envolvido em processos fisiológicos como proliferação celular e apoptose. Portanto pode-se inferir que há um desequilíbrio de Ca^{2+} provocado pelas nanoemulsões, sugerindo um possível mecanismo de morte celular por apoptose.

Estudos realizados por Atefeh Yassem, 2019, demonstraram claramente que nanopartículas lipídicas sólidas modificadas com ácido fólico pode ser benéfico para induzir apoptose mediada por caspase-3 de maneira específica a células de câncer de mama MCF-7. O ácido fólico (AF) é um ligante de alta afinidade para o receptor de folato (RF), sendo assim o AF é um dos ligantes mais estudados no direcionamento de medicamentos. Os RF mediam a internalização celular via endocitose mediada por recepto de conjugados de folato mesmo após a derivatização de um de seus grupos carboxila, podendo assim ser um método para a entrega intracelular direcionada de agentes terapêuticos para as células que expressam RF (NOGUEIRA et al, 2015).

Portanto, uma via de interação nanoemulsão-célula possível, seria a endocitose mediada por receptor, uma vez que começa com os conjugados de folato se ligando a superfície celular com RF, após a invaginação e internalização da membrana para formar uma vesícula endocítica, o pH do lúmen da vesícula diminui pela ação das bombas de prótons localizadas na membrana endossômica. Essa acidificação permite a liberação do ligante e sua entrega no

citossol ou ao lisossomo, através de uma alteração conformacional na proteína. Finalmente, o FR é reciclado de volta à superfície da célula, permitindo a entrega de folatos adicionais que se conjugam na célula alvo. (NOGUEIRA et al, 2015).

Outra característica analisada foi a integridade de membrana das células após o tratamento. Como ilustrado na Figura 33, as células tratadas com as nanoemulsões demonstraram $\pm 20\%$ de células com membrana lesionadas. Não apresentando diferença estatística entre as diferentes nanoemulsões.

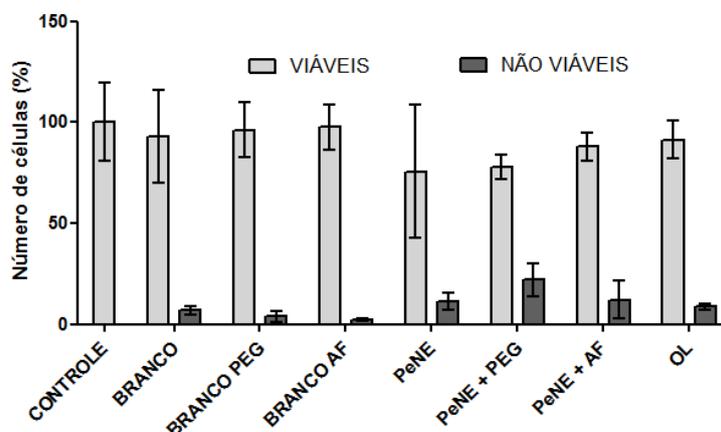


Figura 33 - Ensaio de azul de Tripán. Células de câncer de mama (4T1-Luc) tratadas com a nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de $180\mu\text{g/mL}$ (A) As células viáveis (células não tingidas) e as células não viáveis (células tingidas) foram contadas no hematocitômetro e os dados são representados em porcentagem de células. As experiências foram realizadas em triplicata e bidirecional ANOVA foram realizadas (*: $p < 0,05$).

Geralmente, a alteração na membrana plasmática é uma característica atribuída ao tipo de morte celular denominado necrose. Resumidamente, a necrose inicia com danos físicos severos à célula, levando à ruptura abrupta da membrana plasmática e à liberação do seu conteúdo citoplasmático (MAJNO, 1995). No entanto, é preciso ter cautela ao associar essa característica somente à necrose. Células em estágios avançados de apoptose são semelhantes as células necróticas. Essa semelhança é de tal ordem que alguns autores sugeriram um termo para caracterizar esse estágio: “necrose apoptótica” (MAJNO, 1995). Sendo assim, células na fase final da apoptose também apresentam alterações na estrutura da membrana plasmática (LEIST et al., 2001).

4.10. Ensaios de migração e invasão (*wound healing* e RTCA)

Migração e invasão são fatores biológicos vitais e característicos de células tumorais agressivas e malignas. A metástase é um grande problema no tratamento do câncer e um indicador de mau prognóstico entre pacientes com câncer, é um tumor fisiológico bastante complexo, que pode se desenvolver depois de anos ou mesmo décadas do diagnóstico do tumor primário. O carcinoma mamário 4T1 é uma linhagem altamente tumorigênica e agressiva, podendo migrar para vários locais distantes, incluindo linfonodos, sangue, cérebro, pulmão, fígado e osso (Yueh-Jung Wu, 2020). Para superar esse obstáculo, é necessário estratégias para interromper as atividades fisiológicas necessárias para o crescimento e sobrevivência do tumor.

A fim de investigar a capacidade de migração das células sobreviventes após o tratamento com as nanoemulsões foi realizado o ensaio de *wound healing* em células 4T1 após o tratamento com as nanoemulsões na concentração de 180 ug/mL por um período de 24h, onde após esse período foi feita uma ferida nas células sobreviventes e foi feito o registro das fotos no tempo de 0h e após 24h (figura 34), para assim analisar a área inicial e final da ferida, comparando aos seus respectivos poços iniciais, identificando a porcentagem de migração das células.

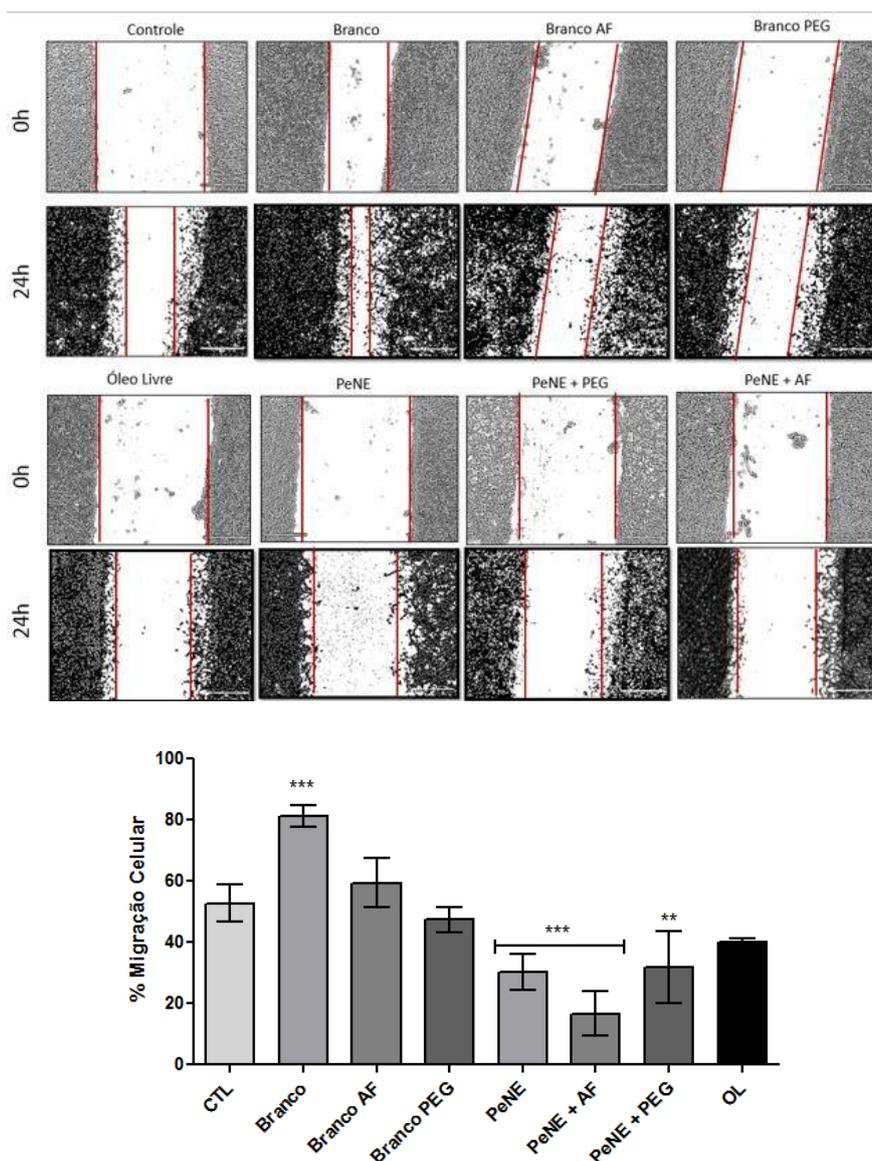


Figura 34 - Migração de células de câncer de mama (4T1-Luc) medida pelo ensaio wound healing. As células foram previamente tratadas com nanoemulsão à PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); Branco (formulação lecitina e PBS); Branco PEG (formulação lecitina, PEG e PBS); Branco AF (formulação lecitina, Ácido Fólico e PBS); OL (óleo livre), na concentração de 180µg/mL comparados com controle por 24 horas. Linhas vermelhas representam a área da ferida. Quantificação da porcentagem de fechamento da ferida em relação ao controle medida pela Imagem J. ANOVA de uma via (***) $p < 0,05$.

Depois de calculada a porcentagem de migração, todos os grupos foram avaliados em comparação ao grupo controle no que diz respeito a porcentagem de migração após 24h, onde o fechamento da ferida foi equivalente a $\pm 53\%$ após 24h, demonstrando como esperado a capacidade de migração das células 4T1. O grupo tratado com o Branco apresentou um fechamento $\pm 81\%$, mostrando uma capacidade de migração estatisticamente significativa maior comparada ao grupo controle, colaborando com o resultado de MTT no período de 24h onde a

viabilidade celular também foi maior em relação ao controle, onde podemos inferir que teve um aumento no número de células nessa condição (figuras 33). Já os brancos PEG e AF migraram equivalente ao controle.

Quando comparamos os tratamentos feitos com as nanoemulsões, PeNE+PEG, PeNE, PeNE+AF, a ferida foi fechada $\pm 32\%$, $\pm 30\%$ e $\pm 17\%$ respectivamente, demonstrando uma redução significativa da migração comparados aos controle, onde PeNE+AF foi a que melhor inibiu a migração. O óleo livre não teve diferença em comparação ao controle, evidenciando que quando ele é nanoestruturado seu efeito é potencializado (figura 34).

O analisador de células em tempo real (RTCA) é uma tecnologia baseada em impedância que pode ser usada para monitoramento em tempo real das propriedades das células, como aderência, proliferação, migração, invasão e citotoxicidade ((MORINI et al., 2015). Resultados obtidos no RTCA, todas as formulações reduziram a migração, com destaque para a PeNE+PEG e PeNE+AF que reduziram significativamente a migração celular comparada ao controle como observado abaixo na figura 35. Essa diminuição da migração corrobora com resultados obtidos pelo ensaio de *wound healing*, O óleo livre migrou como o controle, demonstrando assim que mais uma vantagem no uso sistema nanoestruturado.

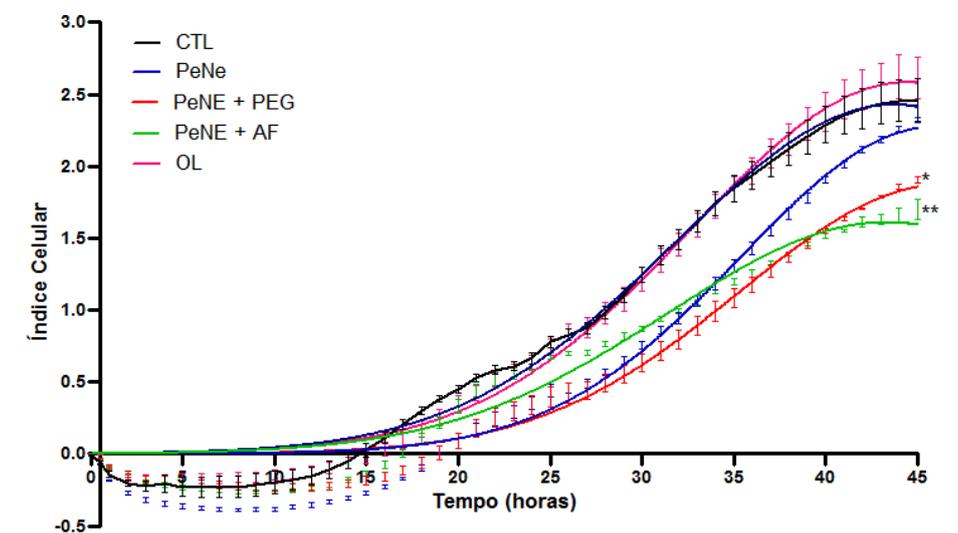


Figura 35- Análise de migração em células em tempo real. Perfil da migração de células de câncer de mama (4T1-Luc), após o tratamento com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de $180\mu\text{g/mL}$ ANOVA unidirecional (pós-teste de Tukey) ** = $p < 0,05$

Em estudo realizado por PAKDEMİRLİ, et al 2019, que examinou o efeito do ácido fólico em células endoteliais, observou-se que entre os grupos tratados, a taxa mais rápida de fechamento de feridas foi observada nas células tratadas com ácido fólico. Já Hui- Chen Wang et al, 2019, investigaram se o ácido fólico associado a progesterona (que é uma indutora de proliferação celular) interfere na migração de células de câncer de mama, onde foi observado que essa associação aboliu a proliferação e migração de células de câncer de mama. Esse efeito também foi visto em Reza Abazari et al, 2019, demonstrou que estrutura metal-orgânica funcionalizada com amina do ácido fólico também inibe a migração de MCF-7.

Para o ensaio de invasão também utilizando a técnica de RTCA, foi possível observar na figura 36, que as células tratadas com PeNE+AF e PeNE perderam de maneira significativa a capacidade de invasão. Já PeNE+PEG aumento essa capacidade em comparação ao controle. Portanto com base nos resultados apresentados as células tratadas com PeNe+AF foram as que apresentação menor índice de migração e invasão de células 4T1.

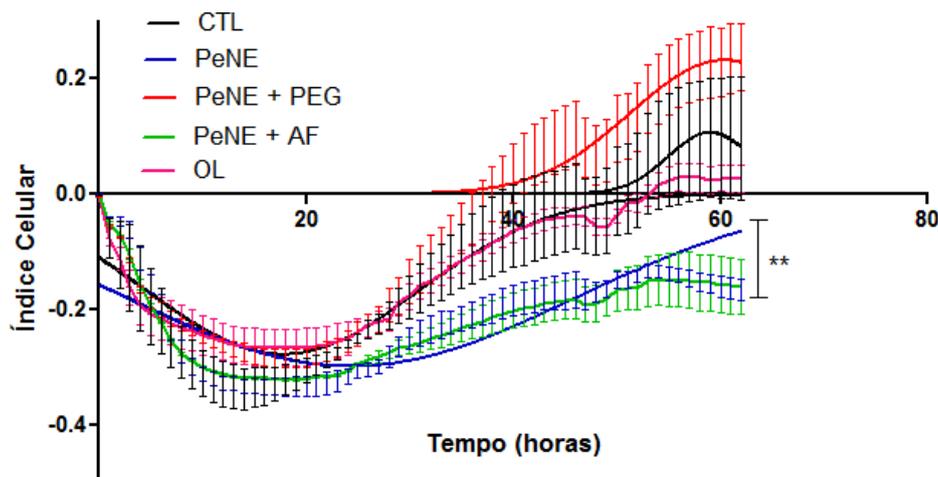


Figura 36 - Análise de invasão de células em tempo real. Perfil de invasão de células de câncer de mama (4T1-Luc), após o tratamento com nanoemulsão PeNE (nanoemulsão de pequi); PeNE+PEG (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com PEG); PeNE+AF (nanoemulsão de óleo de pequi revestida com Ácido Fólico); OL (óleo livre) por 24 horas na concentração de 180µg/mL ANOVA unidirecional (pós-teste de Tukey) ** = p <0,01.

Os resultados dos ensaios biológicos em células de câncer de mama (4T1) após 24 horas de exposição às PeNE, PeNE+PEG e PeNE+AF foram compilados na tabela 4.

Tabela 4 - Compilação dos resultados dos ensaios biológicos em células de câncer de mama 4T1 após 24h de exposição a nanoemulsões a base de óleo de pequi na concentração de 180µg/mL

ENSAIOS IN VITRO	PeNE	PeNE+PEG	PeNE+AF
VIABILIDADE CELULAR	+++	+++	+++
MORFOLOGIA	++	++	++
PROLIFERAÇÃO CELULAR CP	---	++	++
PROLIFERAÇÃO CELULAR LP	++	---	++
FRAGMENTAÇÃO DE DNA	+	++	++
CICLO CELULAR	---	---	---
PERMEABILIZAÇÃO DA MEMBRANA	++	++	++
LISOSSÔMICA			
POTENCIAL DA MEMBRANA	++	++	+
MITOCONDRIAL			
INTEGRIDADE DE MEMBRANA	+	++	+
MIGRAÇÃO WH	+	++	+++
MIGRAÇÃO RTCA	+	++	+++
INVASÃO RTCA	+	---	++

5. CONCLUSÃO

Foi possível obter o conjugado de ácido fólico com PEG40 e com isso desenvolver as nanoemulsões à base de óleo de pequi modificadas eficazmente, sendo estáveis quando armazenadas a 4°C por 30 dias. Também possuem a capacidade de se manterem estáveis a alterações de pH e diluições, o que propicia à administração endovenosa dessas formulações, pois neste processo há alternâncias de diluição na corrente sanguínea e o pH do alvo pode ser diferente do pH das nanoemulsões.

Foi observado que em teste de viabilidade celular, células de câncer de mama 4T1 apresentaram uma significativa citotoxicidade. As células tratadas com PeNE+AF apresentaram fragmentação de DNA, alteração do potencial mitocondrial, lesão de membrana plasmática e reduziu a proliferação celular a curto e a longo prazo ao serem expostas por 24 horas na concentração de 180µg/mL, não se pôde determinar com exatidão o tipo de morte das células, mas ficou evidente que a maioria delas estavam em processo de mortalidade por apoptose. Porém mais estudos são necessários para confirmação de seus mecanismos.

Em suma, as nanoemulsões modificadas com ácido fólico apresentam promissoras atividades antitumorais. Espera-se que futuramente essa estratégia possa ser uma possibilidade de tratamento ou tratamento adjuvante para o câncer de pele não melanoma, uma vez que esse tipo de câncer tem expressivas taxas de incidência no Brasil e seu tratamento atual pode apresentar efeitos colaterais severos.

6. REFERÊNCIAS

ABAZARI, R. et al. **A Luminescent Amine-Functionalized Metal-Organic Framework Conjugated with Folic Acid as a Targeted Biocompatible pH-Responsive Nanocarrier for Apoptosis Induction in Breast Cancer Cells.** [s.l: s.n.]. v. 11

AGUILAR, A.; TWARDOWSKI, T.; WOHLGEMUTH, R. **Bioeconomy for Sustainable Development.** [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2019. v. 14

ALEMRAYAT B, Elhissi A, Younes HM. 2019. Preparation and characterization of letrozole-loaded poly (D, L-lactide) nanoparticles for drug delivery in breast cancer therapy. **Pharm Develop Technol.** 24(2):235–242.

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

ARAUJO, V.H.S., **Nanoemulsões à base de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*): Síntese, caracterização e avaliação do efeito em células de carcinoma mamário,** Monografia de trabalho de conclusão de curso. Universidade de Brasília, 2016.

ARAUJO, V.H.S., ROCHA, C.O., JOANITTI, G.A. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleos de frutos nativos do Cerrado associados à polímeros de quitosana.** Edital ProIC 2013-2014CNPq/UnB.

BAE, Y. et al. Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. **Molecular BioSystems**, v. 1, n. 3, p. 242–250, 2005.

BALUZ, K.; CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48(4), p. 597-607, 2002.

BATES, D. O. et. al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 6, p. 581-597, jun 2002

BENESCH, M. G., Mannock, D. A., Lewis, R. N., & McElhaney, R. N., A DSC and FTIR spectroscopic study of the effects of the epimeric 4-cholesten-3-ols and 4-cholesten-3-one on the thermotropic phase behaviour and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: Comparison with their 5-cholesten analogues. **Chemistry and physics of lipids**, 177, 71-90 (2014).

BERRIDGE M V, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem Biophys**. 1993;303(2):474–82

BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.66, p. 2-25, 2014.

BERTRAND, N.; LEROUX, J. C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n.2, p.152-163, jul 2012.

BHANDARI, P. R.; PAI, V. V. Novel medical strategies combating nonmelanoma skin cancer. **Indian journal of dermatology**, v. 59, n. 6, p. 531–46, nov. 2014.

BHARALI, D. J. et al. **Folate-receptor-mediated delivery of InP quantum dots for bioimaging using confocal and two-photon microscopy**. [s.l: s.n.]. v. 127

BHAT, P. et al. **Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 127

BONIFÁCIO, B. V. et. al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014.

BRUXEL, J. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quimica. Nova**, Faculdade de Farmácia - Rio Grande do Sul, vol. 35, nº. 9, 1827-1840, 2012.

CASIRAGHI, A. et al. **The influence of the polar head and the hydrophobic chain on the skin penetration enhancement effect of poly(ethylene glycol) derivatives**. [s.l: s.n.]. v. 13

CASTRO, A.J.S. **Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2007. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

CHAO, Y. *et al.* Synthesis and application of polyethylene glycol/vinyltriethoxysilane (peg/vtes) copolymers. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 59, p. 12754-12761, out. 2011.

CHEN, C. et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 486–489, 2013.

COLOMBO, N. B. R. et al. *Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852–862, 2015.

CORNING. The Ultimate Guide to Corning® Matrigel® Matrix. [s.d.].

COWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 21, 93-102, 2005.

DEFINED. Inform whitepaper, 2011.
http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wpcontent/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf

DESHPANDE, D. et al. Comparative pharmacokinetics and tissue distribution analysis of systemically administered 17- β -estradiol and its metabolites in vivo delivered using a cationic nanoemulsion or a peptide-modified nanoemulsion system for targeting atherosclerosis. **Journal of Controlled Release**, vol 180, 117–124, 2004.

DO NASCIMENTO, R. T.; Silva, H. S.; Matos, J. M. E.; Morais, M. R.; Santos, C. *In vitro* release and antioxidative potential of pequi oil-based biopolymers (*Caryocar barsiliense* Cambess). **Journal of Polymer Research**, v. 26, n. 183, p. 1-13, 2019.

DOH, K.; YEO, Y. Application of polysaccharides for surface modification of nanomedicines. **Therapeutic delivery**, v. 3, n. 12, p. 1447-1456, 2012.

FARIA, B.C.A.O. et al. **Efeitos de óleos de frutos nativos do Cerrado em células de câncer de pele não-melanoma, *in vitro***. Edital ProIC 2014-2015 CNPq/UnB.

FARIA-MACHADO, A. F. et al. Discrimination of Pulp Oil and Kernel Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense*) by Fatty Acid Methyl Esters Fingerprinting, Using GC-FID and Multivariate Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p. 10064–10069, 2015.

FENG, R. et al. Y-shaped Folic Acid-Conjugated PEG-PCL Copolymeric Micelles for Delivery of Curcumin. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 599–607, 2016.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Natures Reviews: Cancer**, v. 5, p. 161-171, mar. 2005

FURUKAWA A. et al. Nanopartículas de quitosana modificadas com peg como uma alternativa para a administração de biofármacos. **Revista Ciência Farmácia Basica Apl.** V. 35 Supl.1, agosto 2014.

GARCIA-MARTIN, M. L. et al. High resolution pHe imaging of rat glioma using pHdependent relaxivity. **Magnetic resonance in medicine**, v. 55, n. 2, p. 309-315, 2006.

GOMATHI T, Sudha PN, Florence JAK, Venkatesan J, Anil S. 2017. Fabrication of letrozole formulation using chitosan nanoparticles through ionic gelation method. **Int J Biol Macromol.** 104: 1820–1832.

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

HARRIS, T. J.; MALTZAHN, G.; BHATIA, S. N. Multifunctional Nanoparticles for Cancer Therapy. In: Taylor & Francis Group. **Nanotechnology for Cancer Therapy**, 2007. p. 59-75.

HE, Y. Y.; Wang, X. C.; Jin, P. K.; Zhao, Bo.; Fan, X. Complexation of anthracene with folic acid studied by FTIR and UV spectroscopies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 72, p. 876-879, 2009

HOBBS, S. K. et al., Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, fev. 1998.

HONARY, S., ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**,

v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Disponível em:

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma, acessado em 10 de fevereiro de 2020.

JANG, S. H. et al. Drug delivery and transport to solid tumors. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9, p. 1337-1350, set. 2003.

JAVID, A. et al. Biocompatible aptes-peg modified magnetite nanoparticles: effective carriers of antineoplastic agents to ovarian cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 36-54, mar. 2014.

JOANITTI, G.A., AZEVEDO, R.B., and FREITAS, S.M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Lett.** 293, 73 -81, 2010.

KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 284, n. 1-2, p. 109-122, out. 2004

KITAGAWA KIPP, J. E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 284, n. 1-2, p. 109-122, out. 2004.

KOIRALA, N. et al. Folic acid conjugated polymeric drug delivery vehicle for targeted cancer detection in hepatocellular carcinoma. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 107, n. 11, p. 2522-2535, 2019.

KOURNIATIS, L.R.; SPINELLI, L.S.; MANSUR, C.R.E. Nanoemulsões de óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, Rio de Janeiro, vol. 33, nº. 2, 295-300, 2010.

KULBACKA, J.; CHODACZEK, G. Nanoemulsion structural design in co-encapsulation of hybrid multifunctional agents: Influence of the smart plga polymers on the nanosystem-enhanced delivery and electro-photodynamic treatment. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, 2019.

KULIGOWSKI, J., Quintás, G., Esteve-Turrillas, F. A., Garrigues, S., & De la Guardia, M., On-line gel permeation chromatography–attenuated total reflectance–Fourier transform infrared determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements. **Journal of Chromatography A**, 1185, 71-77 (2008).

, F. *et al.* One-step preparation of amino-peg modified poly(methylmethacrylate) microchips for electrophoretic separation of biomolecules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 535, n. 59, p. 1272-1277, ago. 2010.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, VT de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LE, T. T.; KIM, D. Folate-PEG/Hyd-curcumin/C18-g-PSI micelles for site specific delivery of curcumin to colon cancer cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Materials Science and Engineering C**, v. 101, n. September 2018, p. 464–471, 2019.

LEWIS, S. *et al.* Living Well? Strategies Used by Women Living with Metastatic Breast Cancer. **Qualitative Health Research**, v. 26, n. 9, p. 1167-1179, jul. 2016.

LI, J. *et al.* Docetaxel/S-1 versus docetaxel/capecitabine as first-line treatment for advanced breast cancer: A retrospective study. **Medicine (United States)**. V. 94 p. 1-5, 2015

LIAO, R. *et al.* Folic-Acid-Targeted Self-Assembling Supramolecular Carrier for Gene Delivery. **ChemBioChem**, v. 16, n. 11, p. 1622–1628, 2015.

LIU, D.Z. *et al.* Microcalorimetric studies on the physical stability of poly-ethyleneglycol-grafted liposome *Colloids Surf. A*, 212 (2003), pp. 227–234.

LUO, J. et al. Efficient syntheses of pyrofolinic acid and pteroyl azide, reagents for the production of carboxyl-differentiated derivatives of folic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 42, p. 10004–10013, 1997.

LUO, X. et al. Folic acid-functionalized polyethylenimine superparamagnetic iron oxide nanoparticles as theranostic agents for magnetic resonance imaging and PD-L1 siRNA delivery for gastric cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5331–5343, 2017. YIKRAZUUL **Methotrexate skeletalWikipedia**, 2008. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4117211>

MAKLUF, A. S. D.; DIAS, R. C.; BARRA, A. A. Quality of life assessment in women with breast cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 49-58, ago. 2005.

Malvern Instruments. DYNAMIC LIGHT SCATTERING COMMON TERMS

MERZEL, R. L. et al. Conjugation Dependent Interaction of Folic Acid with Folate Binding Protein. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 2350–2360, 2017. **Figura-3-Estrutura-quimica-do-acido-folico**. , [s.d.].

MIRANDA-VILELA, A. **Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antioxidantes e farmacológicos de extratos da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* CAMB)**. 2009. 188 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*.1983;65(1-2):55–63. **Nature Publishing Group**; 2009 Apr 9;458(7239):719–24

NAKAMURA, K. et al. Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. **Biochimica et**

Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes Volume 1818, Issue 11, November 2012, Pages 2801–2807.

NASCIMENTO-SILVA, N. R. R. DO; NAVES, M. M. V. Potential of Whole Pequi (Caryocar spp.) Fruit-Pulp, Almond, Oil, and Shell-as a Medicinal Food. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 9, p. 952–962, 2019.

NASR, R. et al. **Induction of apoptosis and inhibition of invasion in gastric cancer cells by titanium dioxide nanoparticles.** [s.l: s.n.]. v. 33

NGWULUKA NC, Kotak DJ, Devarajan PV. 2017. Design and characterization of metformin-loaded solid lipid nanoparticles for colon cancer. **AAPS PharmSciTech.** 18(2):358–368.

NOGUEIRA, E. et al. **Design of liposomal formulations for cell targeting.** [s.l.] Elsevier B.V., 2015. v. 136

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

OMBREDANE, A. S. **INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO ÁCIDO ANACÁRDICO E DOCETAXEL EM NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEO DE PEQUI COMO TERAPIA COMBINATÓRIA CONTRA O CÂNCER DE MAMA *in vitro* E *in vivo*.** Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2018

PAKDEMIRLI, A. et al. **Role of mesenchymal stem cell-derived soluble factors and folic acid in wound healing.** [s.l: s.n.]. v. 49

PALMEIRA, S. M. et al. Chemopreventive effects of pequi oil (Caryocar brasiliense Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of

hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 4, p. 299–305, 2016.

PARK, Y. et al. Ionically crosslinked Ad/chitosan nanocomplexes processed by electrospinning for targeted cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 75–82, 2010. **US6291673.pdf**, [s.d.].

PATEL, N. R. et al. In Vitro and In Vivo evaluation of a novel folate-targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel for imaging and improved anticancer activity against ovarian cancers. **Cancer Biology and Therapy**, v. 19, n. 7, p. 554–564, 2018.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B., Misiak, L. E., Zarzyka, B., Paduch, R., Gawron, A., & Gruszecki, W. I. FTIR, ¹H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1828, 518–527 (2013)

PEREIRA, Gabriela G. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões**. 2008. 110f. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

PRABHAKAR, K. et al. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, p. 2013, 345-353

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & therapeutics**, v. 99, n. 1, p.1-13, 2003.

RIBEIRO, M. V. DE M. et al. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 741–750, 2016.

ROCHA, C.O. et al. **Efeitos de óleos de frutos nativos do Cerrado, na forma livre ou nanoestruturada, em células de câncer de mama, in vitro.** Edital ProIC 2013- 2014 CNPq/UnB.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 6. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009. 917 p.

SAMPOGNA-MIRELES, D. et al. Structural analysis of binding functionality of folic acid-PEG dendrimers against folate receptor. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 72, p. 201–208, 2017.

SEN, S.; PUSKAS, J. E. Green polymer chemistry: Enzyme catalysis for polymer functionalization. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9358–9379, 2015. BAZYLIŃSKA, U.;

SHAHVERDI, A. R. et al. Characterization of Folic Acid Surface-Coated Selenium Nanoparticles and Corresponding In Vitro and In Vivo Effects Against Breast Cancer. **Archives of Medical Research**, v. 49, n. 1, p. 10–17, 2018.

SHRIKHANDE, G.; PUSKAS, J. E. Synthesis of mono- and dithiols of tetraethylene glycol and poly(Ethylene glycol)s via enzyme catalysis. **Catalysts**, v. 9, n. 3, 2019.

SILVA, L.R.A. JOANITTI, G.A. **Investigação de mecanismos de ação de óleo do Cerrado nanoestruturado envolvidos na toxicidade de células de câncer de mama, in vitro.** Edital ProIC 2014-2015 CNPq/UnB.

SILVA, P. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. p. 136, 2012. SHI, Y. et al. Multistep targeted nano drug delivery system aiming at leukemic stem cells and minimal residual disease. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2479–2489, 2013.

TAMILVANAN, Shanmugaperumal; BENITA, Simon. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. **European Journal of Pharmaceutics and**

Biopharmaceutics, vol. 58, 357–368, 2004.

TRAESEL, G. K. et al. Safety assessment of oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the potential genotoxic and clastogenic effects. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 8, p. 804–811, 2017.

USUNA, A.; Fetih, G.; El-Faham, T. El. Performance of Meloxicam Niosomal Gel Formulations for Transdermal Drug Delivery. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12(2), p. 1-14, 2016

VIEIRA, D.B., GAMARRA, L.F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (são Paulo)**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.99-103, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082016rb3475>.

VERMA, A. et al. Folate Conjugated Double Liposomes Bearing Prednisolone and Methotrexate for Targeting Rheumatoid Arthritis. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 8, 2019.

XIAO, S. et al. Preparation of folate-conjugated starch nanoparticles and its application to tumor-targeted drug delivery vector. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 14, p. 1693–1697, 2006.

WANG, H. C.; HUO, Y. N.; LEE, W. SEN. **Folic acid prevents the progesterone-promoted proliferation and migration in breast cancer cell lines**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2019.

WANG, J. et al. **Hyaluronic acid-modified liposomal honokiol nanocarrier: Enhance anti-metastasis and antitumor efficacy against breast cancer**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2020. v. 235

WU, Y.-J. et al. Hinokitiol reduces tumor metastasis by inhibiting heparanase via extracellular signal-regulated kinase and protein kinase B pathway. **International**

Journal of Medical Sciences, v. 17, n. 3, p. 403–413, 2020. Scheme for the Synthesis of Glycals. [s.d.].

YANG, C. et al. **Development of a folate-modified curcumin loaded micelle delivery system for cancer targeting**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 121

YASSEMI, A.; KASHANIAN, S.; ZHALEH, H. **Folic acid receptor-targeted solid lipid nanoparticles to enhance cytotoxicity of letrozole through induction of caspase-3 dependent-apoptosis for breast cancer treatment**. [s.l.] Taylor & Francis, 2019. v. 0

ZHANG, Q. et al. Construction and in vitro and in vivo evaluation of folic acid-modified nanostructured lipid carriers loaded with paclitaxel and chlorin e6. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. July, p. 118595, 2019.

ZHANG, X. et al. Tumor-targeting micelles based on folic acid and α -tocopherol succinate conjugated hyaluronic acid for paclitaxel delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 177, n. 74, p. 11–18, 2019.

ZHANG, L. et al. Self-Assembled Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. **ACS Nano**, v. 2, n. 8, p. 1696-1702, ago. 2008.