

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA)

Davi Trombini Aleixo

**Avaliação do efeito do óleo da polpa de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.
ex Mart. (Macaúba) associado a nanoestruturas poliméricas em células de
câncer de mama**

JUIZ DE FORA
2020

Davi Trombini Aleixo

Avaliação do efeito do óleo da polpa de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Macaúba) associado a nanoestruturas poliméricas em células de câncer de mama

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella

Coorientador: Prof.(a) Dr.(a) Jacy Gameiro

Coorientador: Prof. Dr. Maurilio de Souza Cazarim

JUIZ DE FORA

2021

Davi Trombini Aleixo

Avaliação do efeito do óleo da polpa de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Macaúba) associado a nanoestruturas poliméricas em células de câncer de mama

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia.

Aprovado em 07 de Dezembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Pittella – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.(a) Dr.(a) Jacy Gameiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Leônidas João de Mello Junior
Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe Simone e ao meu padrasto/pai Manoel, pelo amor, carinho e todas as oportunidades que eles me proporcionaram nesses anos.

Agradecimento a todos os meus amigos da faculdade, colégio e da vida, por todos os momentos de felicidade.

Ao meu professor e orientador Frederico Pittella, por todos esses anos de trabalho junto, desde a monitoria até o mestrado, e todo o aprendizado e oportunidades que ele me proporcionou ao longo da minha educação.

Aos meus orientadores Jacy Gameiro, por me abrir as portas do seu grupo de pesquisa e me possibilitar muitas oportunidades, e Maurílio Cazarim, pelo apoio e ensinamento.

Aos amigos do laboratório LDNano, em especial a Bia, Kézia Cristine, Miguel e Milena, pela ajuda, disposição, companheirismo e felicidade proporcionadas na presença dos mesmos.

A Ana Gualberto, por toda amizade, aprendizado, ensinamentos e oportunidades que proporcionou a minha pesquisa e a mim como pesquisador, além da possibilidade de irritá-la sempre que possível e mesmo assim nunca me agredir por isso.

Ao Luan, pelo auxílio, companheirismo e risadas e engrandecimento, e por todo o resto da equipe LIDIPO, Leticia, Sara e Diego, pelos mesmos motivos.

Aos PPGCBIO e seus funcionários, por auxiliarem na minha formação acadêmica.

A Capes e ao CNPq, pelo auxílio financeiro essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos que não foram citados, mas que auxiliaram esse trabalho de alguma forma.

E por fim ao meu pai Luiz, que veio a falecer dois meses antes dessa defesa, e infelizmente não pode acompanhar o fim do meu processo de crescimento. Todo agradecimento e que esteja em paz.

“Der Anfang ist das Ende und das ende ist der anfang”

Dark

RESUMO

A Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) é uma planta nativa que está presente em grande parte da América do Sul. Sabe-se que o óleo oriundo da polpa do fruto é rico em ácidos graxos insaturados, carotenoides e fenóis totais, possuindo assim aplicação para a indústria alimentícia, de pecuária e energética. Além disso, estes compostos são comumente relatados por suas atividades antioxidantes, que são de grande valor para a indústria farmacêutica no processo de regulação das espécies reativas de oxigênio (EROS). Em processos de metabolização celular são comuns a liberação dessas espécies que, em desequilíbrio, podem causar danos as células levando a processos tumorais. Dados de 2018 indicam cerca de 9,6 milhões de óbitos mundialmente pela doença, sendo o tipo mamário o maior causador de morte entre mulheres no cenário brasileiro e global. Tratamentos tradicionais como cirurgias, radioterapias, quimioterapias e hormonioterapias apresentam diversos efeitos colaterais e dificuldade de ação em alguns tipos de câncer de mama. Visando encontrar uma alternativa terapêutica, micelas contendo óleo de polpa de macaúba (MP-OM) foram desenvolvidas e avaliadas frente sua atividade citotóxica, antiproliferativa e antimigratoria *in vitro* e na inibição do crescimento tumoral *in vivo*. A caracterização físico-química demonstrou que as micelas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios de 105 nm, índice de polidispersão (Pdl) de 0,12 e potencial Zeta de -17,5 mV. A MP-OM apresentou diminuição da viabilidade de células tumorais (MDA-MB-231 e 4T1) na concentração de 0,386 µg/mL (C1) em 48h e 72h. Não foi observada nenhuma toxicidade em células não tumorais (L929). O ensaio de clonogenicidade apresentou redução que variou de 97% a 81,9% na concentração mais alta de MP-OM, enquanto o de migração (*Wound Healing*) reduziu em mais de 40% quando comparado ao grupo controle. *In vivo*, a MP-OM inibiu significativamente o aumento tumoral. Concluímos que o método utilizado para a produção das MP-OM foi efetivo para a obtenção de nanopartículas com tamanho satisfatório e distribuição homogênea, e os resultados dos testes de viabilidade celular, proliferação, migração e *in vivo* demonstraram resultados promissores para o tratamento de células de câncer de mama.

Palavras-Chave: Óleo de Macaúba. Micela Polimérica. Nanocarreador, câncer de mama, *in vivo*, *in vitro*.

ABSTRACT

Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) is a native plant that is present in much of South America. It is known that the oil from the fruit pulp is rich in unsaturated fatty acids, carotenoids and total phenols, thus having application in the food, livestock and energy industries. In addition, these compounds are commonly reported for their antioxidant activities, which are of great value to the pharmaceutical industry in the process of regulating reactive oxygen species (ROS). In processes of cellular metabolism, the release of species that, in imbalance, can cause damage to cells leading to tumor processes are common. Data from 2018 indicate about 9.6 million deaths worldwide from the disease, with the breast type being the biggest cause of death among women in the Brazilian and global scenario. Traditional treatments such as surgery, radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy have several side effects and difficulty in acting in some types of breast cancer. Aiming to find a therapeutic alternative, micelles containing macaúba pulp oil (MP-OM) were developed and evaluated for their cytotoxic, antiproliferative and antimigratory activity *in vitro* and in the inhibition of tumor growth *in vivo*. The physicochemical characterization showed that the micelles presented mean hydrodynamic diameters of 105 nm, polydispersity index (Pdl) of 0.12 and Zeta potential of -17.5 mV. MP-OM showed a decrease in tumor cell viability (MDA-MB-231 and 4T1) at a concentration of 0.386 $\mu\text{g/mL}$ (C1) at 48h and 72h. No toxicity was observed on non-tumor cells (L929). The clonogenicity assay showed a reduction ranging from 97% to 81.9% at the highest concentration of MP-OM, while the migration assay (Wound Healing) reduced by more than 40% when compared to the control group. *In vivo*, MP-OM significantly inhibited tumor growth. We conclude that the method used for the production of MP-OM was effective for obtaining nanoparticles with satisfactory size and homogeneous distribution, and the results of cell viability, proliferation, migration and *in vivo* tests showed promising results for the treatment of cells of breast cancer.

Keywords: Macaúba Oil. Polymeric Micelle. Nanocarrier, breast cancer, *in vivo*, *in vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Exemplar da espécie <i>Acrocomia aculeata</i>	18
Figura 2	- Constituição do fruto da macaúba.....	19
Figura 3	- Óleoresina de macaúba.....	21
Figura 4	- Estrutura das moléculas de (a) ácido oléico (b) α -tocoferol e (c) β -caroteno.....	24
Figura 5	- Anatomia da mama feminina.....	27
Figura 6	- Etapas para a migração e formação de metástases oriundos do câncer de mama.....	30
Figura 7	- Progressão do tumor e sinalização que implicam o aumento das ROS em células tumorais.....	32
Figura 8	- Processo de micelização das micelas poliméricas.....	34
Figura 9	- Estrutura do Pluronic® F127.....	37
Figura 10	- Efeito EPR atuando auxiliando no efeito passivo de permeabilização do fármaco em sítios tumorais.	38
Figura 10	- Esquema de preparação da Micela polimérica.....	45
Figura 11	- Gráfico de distribuição de tamanho por intensidade da (A) MP-OM e (B) MP-B.....	59
Figura 12	- Ilustração da provável conformação da micela polimérica de óleo de macaúba.....	60
Figura 13	- Soluções de MP-OM das amostras (A) de temperatura ambiente e (B) geladeira, após 6 meses que foram preparadas.....	63
Figura 14	- Estabilidade coloidal das MP-OM estocadas em temperatura ambiente (TA) para (A) Diâmetro e (B) Potencial Zeta.....	64
Figura 15	- Estabilidade coloidal das MP-OM estocadas em Geladeira (4°C) para (A) Diâmetro e (B) Potencial Zeta.....	65
Figura 16	- Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama MDA-MB-231 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba em diferentes concentrações por (a) 24 hrs, (b) 48 hrs e (c) 72 hrs.....	69
Figura 17	- Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama 4T1 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba	

	em diferentes concentrações por (a) 24 hrs, (b) 48 hrs e (c) 72 hrs..	71
Figura 18	- Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de fibroblastos L929 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba em diferentes concentrações por (a) 24 hrs, (b) 48 hrs e (c) 72 hrs.....	75
Figura 19	- Número de colônias (A), % de absorvância (B) e (C) Fotografia dos poços corados com cristal violeta pelo ensaio de clonogenicidade (proliferação) em células de fibroblastos MDA-MB-231 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba.....	77
Figura 20	- Resultados do ensaio de migração (<i>wound healing</i>) de células MDA-MB-231 após tratamento simulado de MP-OM e OM-Livre...	80
Figura 21	- Volume tumoral relativo, peso do tumor e variação de peso de camundongos Balb/c portadores de tumor de mama.....	83
Figura 22	- % de absorvância (B) pelo ensaio de clonogenicidade (proliferação) feito a partir do flushing da médula óssea de camundongos Balb/c o tratamento com MP-OM.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição da Micelas Polimérica de óleo de macaúba.....	45
Tabela 2	- Composição em ácidos graxos (CG) de amostras de óleo da polpa de frutos de macaúba (%).....	54
Tabela 3	- Fenólicos totais e β -caroteno da polpa da macaúba.....	56
Tabela 4	- Perfil antioxidante do óleo da polpa da macaúba e da rutina, expressos em IC50.....	57
Tabela 5	- Caracterização físico-química das Micelas Poliméricas da polpa do Óleo de Macaúba (MP-OM).....	58
Tabela 6	- Valores de IC50 calculados para a MP-OM e OM-Livre em células tumorais MDA-MB-231 e 4T1.....	72
Tabela 7	- Porcentagem de área livre do ensaio de migração <i>Wound Healing</i> em células MDA-MB-231.....	81
Tabela 8	- Parâmetros hematológicos de camundongos tratados por via intravenosa com MP-OM.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AT	Timina
ATCC	American Type Culture Collection
BCC	Conferência Internacional de Câncer de Mama
BCL-2	Célula-B linfoma 2
BCL-xL	Linfoma de células B - extra grande
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
C _x	Concentração
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CHCM	concentração média de hemoglobina corpuscular
C-KIT	Gene que auxilia no crescimento da proteína encontrada na superfície de muitos tipos diferentes de células
CMC	Concentração Micelas Crítica
CMT	Temperatura Crítica da Micela
CNPJ	Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica
CO ₂	Dióxido de Carbono
D1	Diâmetro horizontal
D2	Diâmetro vertical
DHM	Diâmetro hidrodinâmico médio
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	2,2-diphenil-1-picrilhidrazila
EAT	Ácido Tânico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de Encapsulação
EGFR	Proteína receptora do fator de crescimento epidermal
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aprimorada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FPS	Fator de Proteção Solar
FGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
GAPDH	Proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GEIMM	Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas
INCA	Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir metade da atividade do composto

HCT	Hematócrito
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HER2	Gene receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2
HGB	Concentração de hemoglobina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
KEAP1	proteína associada a ECH 1 do tipo Kelch
Lat	Latitude
Long	Longitude
MCV	volume corpuscular médio
MG	Minas Gerais
MIC-1	Citocina 1 inibidora de macrófago
MMP-2	Gene metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	Gene metaloproteinase de matriz 9
MP	Micela polimérica
MPB	Micela polimérica sem ativo encapsulado
MP-OM	Micela polimérica com óleo de polpa de macaúba nanoencapsulado
NK	Célula natural killer
NP	Nanopartículas
MTT	Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
NRF2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
OM-Livre	Óleo de macaúba livre solubilizado em Tween 80 e DMSO
OMS	Organização Mundial da Saúde
p27Kip1	Inibidor de quinase dependente de ciclina
PBS	Salina tamponada com fosfato
PdI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PF-127	Pluronic® F-17
PF-68	Pluronic® F-68
PKM2	Enzima piruvato quinase M2
PLT	Plaquetas
PPO	Poli óxido de propileno
RBC	Glóbulos vermelhos
RE	Receptores de estrogênio
RES	Resveratrol
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP	Receptores de progesterona
SA	Sociedade Anônima
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SEM	Média do erro padrão
SFB	Soro fetal bovino
STATs	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TA	Temperatura ambiente
TNBC	Câncer de mama Triplo-Negativo
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	World Health Organization

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

µL – Microlitro

dL - decilitro

g – Gramas

kg – kilograma

mg – miligrama

mL - Mililitro

mV - Milivolts

m/v – Massa / volume

nM – Nanomolar

nm - Nanômetros

v/v – volume/volume

xg – Força g

W - Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	ESPÉCIE <i>ACROCOMIA ACULEATA</i>	18
2.1.1	Potencial econômico e possíveis aplicações industriais	19
2.1.2	Constituintes presentes no óleo da polpa e suas atividades terapêuticas	22
2.2	CÂNCER DE MAMA.....	26
2.3	NANOCARREADORES.....	33
2.3.1	Copolímeros em bloco	35
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	REAGENTES E MATERIAIS.....	42
4.2	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDEOS PRESENTES NO ÓLEO DA POLPA DE MACAÚBA ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (CG).....	42
4.3	DETERMINAÇÃO DOS CAROTENÓIDES TOTAIS.....	43
4.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR FENÓLICO.....	43
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	44
4.6	PREPARO DAS MICELAS POLIMÉRICAS.....	44
4.7	CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS.....	45
4.7.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersão das micelas poliméricas	45
4.7.2	Determinação da carga superficial das partículas	46
4.7.3	Determinação da eficiência de encapsulação das Micelas Poliméricas ..	46
4.7.4	Determinação da estabilidade coloidal das Micelas Poliméricas	47
4.8	CULTURA CELULAR.....	47
4.8.1	Ensaio de viabilidade celular por MTT	48
4.8.2	Ensaio de antiproliferativo (clonogenicidade) <i>in vitro</i>	49
4.8.3	Ensaio de migração (<i>wound healing</i>)	49

4.9	ENSAIOS DE AVALIAÇÃO ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i>	50
4.9.1	Animais	50
4.9.2	Delineamento experimental	51
4.9.3	Efeito de inibição de tumor <i>in vivo</i>	51
4.9.4	Análise hematológica	52
4.9.5	Ensaio antiproliferação (clonogenicidade) <i>ex vivo</i>	52
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA POLPA DE MACAÚBA.....	54
5.1.1	Perfil dos ácidos graxos	54
5.1.2	Quantificação de compostos fenólicos e carotenoides	55
5.1.3	Atividade antioxidante por DPPH•	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS.....	58
5.2.1	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (Pdl) e Potencial Zeta	58
5.2.2	Estabilidade coloidal das Micelas Poliméricas	62
5.2.3	Eficiência de encapsulação do óleo da polpa de macaúba	66
5.3	VIABILIDADE CELULAR.....	67
5.3.1	Ensaio de citotoxicidade por MTT	67
5.3.2	Ensaio de clonogenicidade (proliferação) celular <i>in vitro</i>	76
5.3.3	Ensaio de avaliação antimetastática <i>in vitro</i> por <i>Wound Healing</i>	79
5.4	EFICÁCIA DE INIBIÇÃO DE TUMOR <i>IN VIVO</i>	82
5.5	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	86
5.6	ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO (CLONOGENICIDADE) <i>EX VIVO</i>	87
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	90
7	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. é o nome científico da conhecida popularmente como "Bocaiuva" ou "Macaúba", palmeira de ampla distribuição no Brasil e no continente Americano. Seus frutos possuem grande quantidade de óleo de polpa, ricos em ácidos graxos saturados de cadeia curta (ácido láurico e ácido oleico como os principais), além de compostos bioativos, como β -caroteno e α -tocoferol, de importante ação antioxidante (ROCHA *et al.*, 2013; ARENA *et al.*, 2018; BAZZO *et al.*, 2018).

Estudos vem demonstrando os benefícios da macaúba como fonte alternativa em tratamento de patologias. Silva (2018) demonstrou que o óleo da polpa apresentou atividades no controle da diabetes e antioxidantes sem causar citotoxicidade *in vivo* em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Outro trabalho, realizado por Magoso (2016) indicou a utilização do óleo da amêndoa e a polpa do fruto da Macaúba como substâncias quimiopreventivas, garantindo efetividade e prevenindo efeitos adversos dos tratamentos convencionais do câncer.

O câncer é conhecido como um grupo de doenças caracterizadas por um crescimento descontrolado e intensa divisão celular (HARFOUCHE e MARTIN, 2010). Em 2018, dados indicaram que a patologia superou a marca de 9,6 milhões de óbitos mundialmente, sendo assim a segunda maior causa de mortes nos tempos atuais (WHO, 2018). Dentre os tipos de câncer, o mamário aparece correspondendo a principal incidência de morte entre mulheres no cenário brasileiro e global, tanto em países de alta, quanto os de baixa renda. Dados do Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva (INCA) estimam um impacto epidemiológico de 66 mil novos casos (ambos os sexos) para o triênio de 2020-2022 (BRASIL, 2020).

Existem diversos tratamentos direcionados para o câncer de mama, sendo esses divididos em locais (cirurgias conservativas ou mastectomia e radioterapia) ou sistêmicos (quimioterapia, imunoterapia e hormonioterapia). Entretanto, ambos os tipos apresentam diversos efeitos colaterais significativos, como problemas imunológicos, cardiovasculares, dermatológicas, dores,

endócrinos, sexuais, gastrointestinais, psicológicos, estéticos e outros (SAAD *et al.*, 2002; ACS, 2018).

Nesse contexto, buscando encontrar uma nova alternativa terapêutica no tratamento de tumores aos tratamentos convencionais, a macaúba surge como uma fonte em potencial para o desenvolvimento de pesquisas e exploração na área.

Uma forma de potencializar seu efeito é utilizar nanocarreadores, estruturas usadas para modular a entrega e liberação de fármacos e substâncias. Dentre os diversos modelos de nanoestruturas, as micelas poliméricas se destacam como uma tecnologia promissora, devido ao seu tipo de estrutura, que possui um núcleo interno hidrofóbico, podendo hospedar drogas hidrofóbicas e melhorar sua solubilidade aquosa, e um revestimento externo hidrofílico que serve como uma interface estabilizadora entre o núcleo hidrofóbico e o ambiente aquoso (KATAOKA *et al.*, 1990; BATRAKOVA e KABANOV, 2008, ALMEIDA *et al.*, 2017).

Desse modo, o presente trabalho tem o objetivo o desenvolvimento de micelas poliméricas contendo óleo da polpa de macaúba com o intuito de avaliar a atividade antitumoral contra o câncer de mama na forma encapsulada e livre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ACROCOMIA ACULEATA

“Macaúba” é o nome popularmente conhecido da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., pertencente à família *Arecaceae*. Também chamada por “Bocaiúva”, “Macaúba”, entre outros, é uma planta de ampla distribuição na América, frequentemente encontradas na faixa entre o México até a Argentina. No Brasil, grande parte está presente na região Centro-Oeste, chegando a colonizar também as regiões Sudeste, Nordeste e Norte. Essa ampla área de cobertura demonstra uma característica já conhecida da macaúba: a facilidade de adaptação a diversos ecossistemas, potencializando a sua utilização como forma de reabilitar pastagens degradadas ou em sistemas agroflorestais (DE OLIVEIRA, 2016; BAZZO *et al.*, 2018).

A espécie se destaca por ter em média de 10 a 15 metros de altura, podendo alcançar até os 25 metros e de 0,2 a 0,3 metros de diâmetro em seu tronco. Suas folhas possuem cerca de 4 a 5 metros de comprimento e recobrem o cume da palmeira, associados a espinhos que se distribuem de maneira irregular (HENDERSON *et al.*, 1995; ABREUS *et al.*, 2011; BAZZO *et al.*, 2018).

O período de floração acontece entre os meses de abril e junho, com o amadurecimento dos frutos entre novembro e janeiro, podendo apresentar cerca de 40 a 60 frutos por cada um dos cachos (LORENZI, 1996; DE OLIVEIRA, 2016; MAGOSSO, 2015).

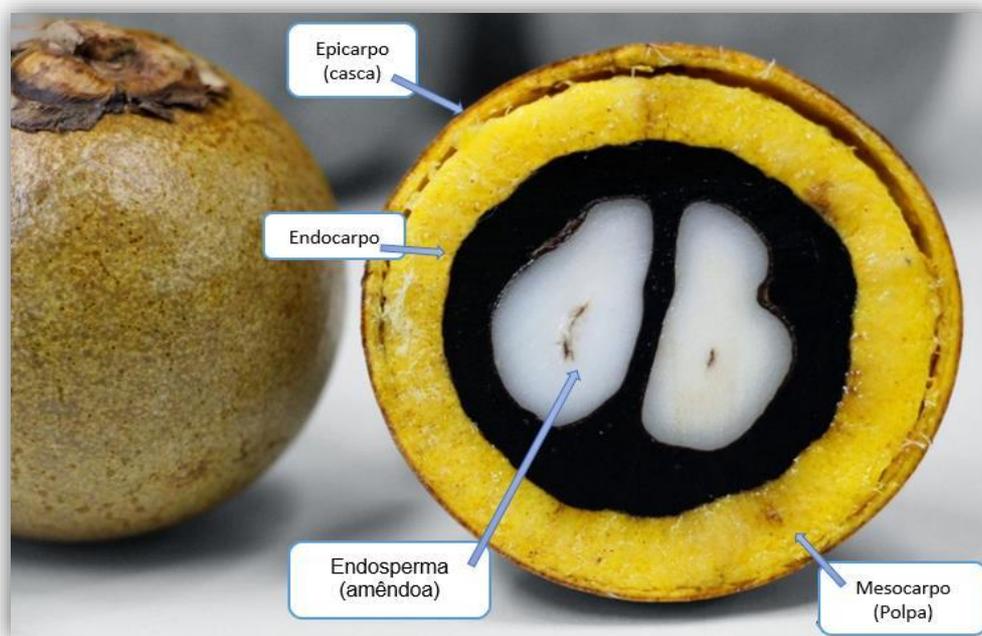
Figura 1. Exemplar da espécie *Acrocomia aculeata*.



(Fonte: Elaborada por Rodrigues, 2013).

O fruto da macaúba é constituído por epicarpo (casca) de coloração amarelada; mesocarpo comestível, mucilaginoso e fibroso (polpa); endocarpo (tegumento) duro e denso, firmemente aderido ao mesocarpo; e semente (amêndoa) adnata ao endocarpo, geralmente uma por fruto, sendo oleaginosa e comestível. Possuem formato esférico ou sutilmente achatado e seu diâmetro costuma variar de 2,5 a 5 centímetros (HENDERSON *et al.*, 1995; DE OLIVEIRA, 2016; BAZZO *et al.*, 2018).

Figura 2. Constituição do fruto da macaúba.



(Fonte: Adaptada de Paulo Hilst, 2020).

2.1.1 Potencial econômico e possíveis aplicações industriais

A Macaúba destaca-se economicamente através da sua alta produção de óleo vegetal a partir de seus frutos e sementes, que permitem uma gama de possibilidades de sua utilização. Seu caráter de maior longevidade da espécie (50 a 150 anos), a alta capacidade de desenvolvimento em solos degradados, funcionando como uma solução trifuncional de recuperação ambiental, integração social e desenvolvimento econômico, somados ainda ao fácil plantio, a tolerância em temperaturas extremas e secas, e a possibilidade de utilização

de todas as partes da planta são sedutores para produtores rurais e de grandes produções que buscam lucro. Em média, cerca de 80 kg do fruto da espécie são produzidos anualmente, o que pode gerar cerca de até 5000 kg de óleo por hectare. Essas características podem representar geração de receita ao produtor de cerca de 30 mil reais por hectare plantado, aproximadamente, sendo uma produtividade maior do que de outras espécies, como o óleo de palma, apenas por meio do plantio de sementes não selecionadas colhidas de plantas silvestres (TICKEL, 2000; MAGOSSO, 2015; DE OLIVEIRA, 2016; CARVALHO, 2018; COLOMBO *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que a macaúba possui diversos tipos de aplicações, que variam conforme a porção da planta, da madeira ao fruto. No setor alimentício, a polpa e a amêndoa são apreciadas na forma *in natura*, ou após o cozimento, e são escolhas de consumo pela população e por povos tradicionais, como os quilombolas e indígenas. Além disso, podem ser utilizadas para o preparo de outros tipos de alimentos como sorvetes, bolos, paçoca doce, cocada, farinhas artesanais, “chiclete” de bugre, óleo de cozinha, e outros (RAMOS *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA, 2016).

Componente majoritário da porção mesocarpo do fruto, o óleo da polpa é rico em ácido oleico, e tem chamado a atenção do setor alimentício devido a sua maior estabilidade oxidativa e operabilidade em baixas temperaturas. Além disso, diversos estudos realizados apontam que o desenvolvimento da acidez no óleo da polpa de macaúba acontece de forma muito mais lenta quando comparado ao óleo de palma, comumente utilizado. Dessa forma, os frutos colhidos diretamente do cacho ou caídos que não tenham tocado no solo podem ser armazenados em condições ambientais, sem longos custos, durante 16 dias sem acidez superior a 5%, ou até 180 dias, caso receba um tratamento adequado (CAVALCANTI-OLIVEIRA, 2015; DOMICINIANO *et al.*, 2015; COLOMBO *et al.*, 2018).

Na indústria de matrizes energéticas, em busca de novas matrizes energéticas, a macaúba se destaca como fonte viável de biocombustíveis no Brasil. Segundo relatos, o uso do óleo produzido pelo fruto tem potencial de reduzir em até 45% no uso de combustíveis fósseis por meio da substituição da bioenergia sustentável, com níveis de produtividade e qualidade comparados a

outras espécies já consolidada mundialmente, como a Dendê Africana (*Elaeis guineensis*) e a Soja (*Glycine max*). Soma-se ainda a possibilidade de plantio sem agressão do solo, a recuperação ambiental e a menor necessidade de utilização de água, fatores que incentivam ainda mais a exploração da macaúba como fonte promissora na busca de opções viáveis ao combustível fóssil e a essas outras duas fontes de óleo vegetal já utilizadas, que correspondem a 122 dos 187 milhões de toneladas produzidos no mundo e que, apesar de substituir antigas fontes de energia que produzem carbono, ainda causam certo dano ambiental, como a substituição e queima de florestas para o plantio das mesmas (DE OLIVEIRA, 2016; COLOMBO *et al.*, 2018).

Além da majoritária presença de ácidos graxos de cadeia insaturada, o óleo de polpa da macaúba, de coloração amarelada e viscoso, como pode ser observado na Figura 3, também há compostos bioativos, como carotenos, α -tocoferol, vitamina C e flavonoides, de importante ação antioxidante (ROCHA *et al.*, 2013; ARENA *et al.*, 2018; BAZZO *et al.*, 2018).

Figura 3. Óleoresina de macaúba.



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2021).

Dados em literatura indicam que a concentração de carotenóides totais no óleo da polpa chega a ser de 378 $\mu\text{g/g}$ de lipídios totais, sendo que desses cerca de 70% a 80% deles são identificados como β -carotenos. Além disso, os picos

apresentados em cromatogramas do extrato indicam a presença de 1-zeaxantina, 4-transciclopeno, 5-a-criptoxantina ou zeinoxantina, 6-cislicopeno, 7 e 8-g-caroteno, 9-trans b-caroteno e 10-13-cis -b-caroteno (RAMOS *et al.*, 2008; SCHEX *et al.*, 2018; COLOMBO *et al.*, 2018).

Outro grupo de grande presença, os tocoferóis, representados pelas vitaminas α -, β -, γ - e δ - tocoferol, se encontram em abundância na espécie. Trabalhos anteriores indicam uma concentração que varia de 213 μg à 286 μg tocoferóis por g de lipídios totais. Desses, o α - tocoferol é o de maior abundância e o de mais fácil quantificação, com valores que vão de 468 a 2943 $\mu\text{g}/100\text{g}$, variando conforme o estágio de maturação do fruto (COIMBRA e JORGE, 2012; SCHEX *et al.*, 2018)

Assim, a presença desses bioativos já relatadas anteriormente fazem com que o fruto seja uma fonte de exploração e pesquisa para o uso na indústria farmacêutica, com aplicações cosméticas e terapêuticas contra uma gama de patologias (DE OLIVEIRA, 2016; COLOMBO *et al.*, 2018).

2.1.2 Constituintes presentes no óleo da polpa e suas atividades terapêuticas

Alguns autores sugerem a utilização do óleo (Figura 3) da polpa da macaúba para o tratamento de alguns distúrbios, como inflamação, doenças respiratórias, diabetes, além terem atuação como algumas de suas propriedades farmacêuticas, como diuréticos, laxantes, analgésicos e restauradores, além de prevenção a danos toxico-genéticos. Sua composição rica em compostos bioativos naturais, que permite que o mesmo tenha uma alta capacidade antioxidante, também garante presença da utilização do óleo na indústria dos cosméticos, já que há descrições de seu uso para hidratação e rejuvenescimento da pele, explorando a característica de agente quimio-preventivo (LIMA *et al.*, 2003; LESCANO *et al.*, 2014; MAGOSSO *et al.*, 2016; ARENA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

O ácido oleico (Figura 4a), constituinte já relatado nesse trabalho como principal constituinte encontrado no óleo da polpa da macaúba, foi sugerido por Sánchez-Muniz e colaboradores (2003) como um inibidor de agregação

plaquetária, além de aumentar o chamado “colesterol bom”, do tipo Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e diminuir o colesterol total do organismo, garantindo uma prevenção nutricional contra o desenvolvimento de doenças coronárias ateroscleróticas. Outros estudos também apresentaram resultados promissores na redução do estresse oxidativo causado a nível celular (NAGARAJU e LOKESHI, 2007).

A capacidade de redução do estresse oxidativo em células é bastante documentada em outros constituintes presentes no óleo de macaúba, como os carotenóides e tocoferóis. Essa capacidade de redução se dá através da regulação das espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas por possuírem atividade na regulação de alguns processos fisiológicos. Sua formação se dá nos próprios processos aeróbicos celulares e outras diversas reações oxidativas que ocorrem no processo aeróbico das células, e são de extrema importância para a vitalidade dos seres vivos. Porém, seu descontrole pode levar a processos danosos a nível celular e a todo organismo (YANG *et al.*, 2018; KASHYAP *et al.*, 2019).

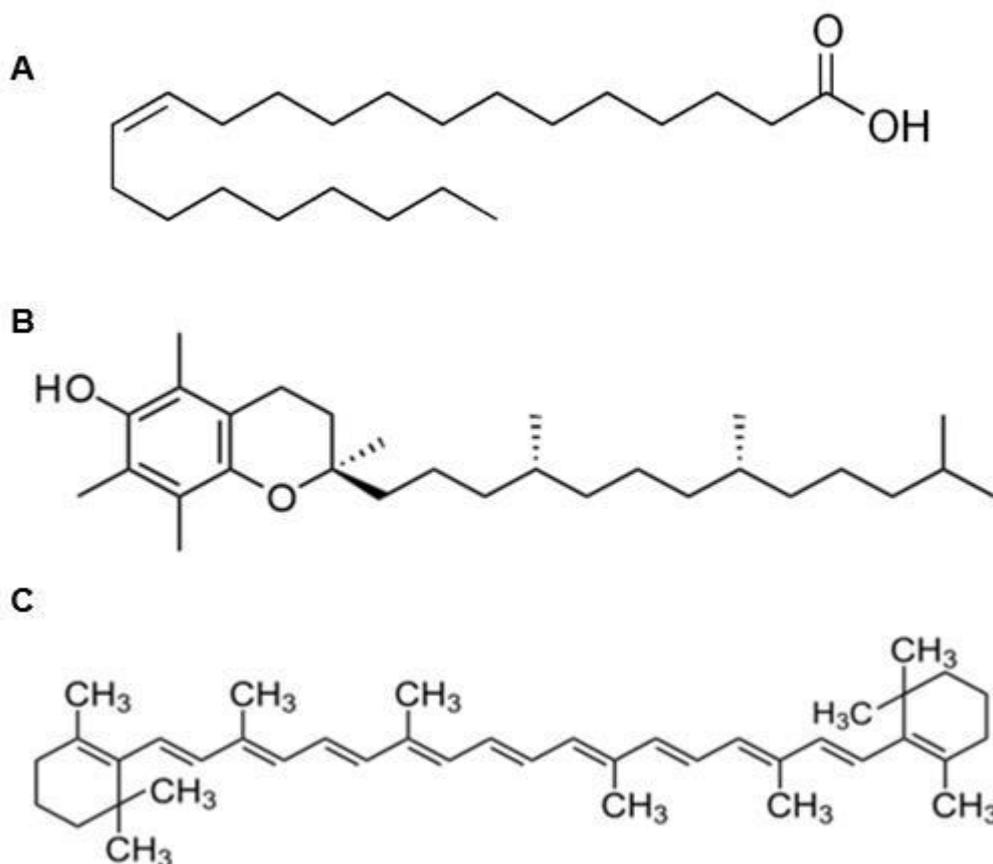
As EROs são moléculas que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, o que as torna extremamente instáveis e reativas. Sua ação pode se dar de três maneiras: através da transferência de elétrons para moléculas instáveis; abstração de hidrogênio; e por adição. Esses compostos possuem ligações duplas conjugadas permitem que os carotenoides aceitem os EROs, extinguindo-os posteriormente. Em altas concentrações, essas espécies podem promover danos a diversas moléculas de extrema importância para o mecanismo celular, como DNA, carboidratos, lipídeos e proteínas, o que desencadeia alterações nas funções das células saudáveis. Danos nas fitas de DNA, por exemplo, podem ocasionar processos mutatórios, contribuindo assim para o desenvolvimento de carcinomas em seres humanos (MILANI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018; SHIN *et al.*, 2020; PREVEDELLO e COMACHIO, 2021).

Dentre esses compostos, o α -tocoferol (Figura 4b), principal tocoferol constituinte da macaúba, é também conhecido como um dos precursores da vitamina E. Por ser lipossolúvel, possui atuação de proteção das membranas celulares da ação dos radicais livres, além de também auxiliar as lipoproteínas

de baixa densidade no transporte do colesterol no organismo. É considerado, segundo diversos autores, um antioxidante lipossolúvel extremamente potente, reduzindo a peroxidação lipídica e o vazamento de íons do organismo (AHMAD *et al.*, 2017; TAM *et al.*, 2018; LALARUKH e SHAHBAZ, 2020)

Principal carotenoide presente na macaúba, o β -caroteno (Figura 4c) é naturalmente de coloração alaranjada, é geralmente encontrado em frutos de coloração amarelo-laranja e vegetais folhosos verde-escuro, e é conhecido como precursor da vitamina A. Seu elemento estrutural importante é uma espinha dorsal de polieno que consiste em uma série de ligações C = C conjugadas, como mostrado na Figura 4b, sendo essa característica a principal responsável pela pigmentação e a capacidade de interação com as EROs (ROCHA *et al.*, 2018; YOUNG e LOWE, 2018).

Figura 4. Estrutura das moléculas de (a) ácido oléico (b) α -tocoferol e (c) β -caroteno.



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2020).

Explorando as qualidades naturais e esses bioativos presentes no fruto da macaúba, uma pesquisa conduzida por De Oliveira (2016) utilizou o óleo de polpa encapsulado nas formas de micela polimérica (MP) e nanopartícula lipídica sólida (NLS) para ação hidratante, antienvhecimento e fotoproteção em formulações bases de Fator de Proteção Solar (FPS). Essa associação garante ao material diferentes propriedades físico-químicas e biológicas quando comparadas às formulações em escala macro, alcançando melhorias nos produtos. Ainda atribuindo ao estudo anterior, foi demonstrado que esse sistema apresentou resultados promissores como coadjuvante potencializador de formulações fotoprotetoras, aumentando a espalhabilidade e oclusividade dos FPS (DE OLIVEIRA, 2016).

Magoso e colaboradores (2016) avaliaram a ação antígenotóxica, antimutagênica, imunomoduladora e apoptótica do óleo extraído da polpa e amêndoa da *A. aculeata*, sozinha e em combinação com o agente antitumoral ciclofosfamida em espécies de camundongos. Em grupos selecionados previamente pelos autores, os extratos do óleo de amêndoa e polpa de macaúba foram incorporados a dieta dos animais e analisados livres e associados a ciclofosfamidas. Ao fim do trabalho, os seus resultados indicaram uma boa atividade na quimiopreventiva, com a diminuição dos danos sofridos que variaram de 69,73% a 90,03% de redução quando comparado ao grupo controle.

Arena e colaboradores (2018) conseguiram através da associação com o óleo da macaúba, inibir a toxicidade reprodutiva induzida em ratos machos, alterando o peso dos órgãos reprodutivos, níveis hormonais, contagem de espermatozoides e histologia testicular, além de proteger o sistema reprodutivo masculino do efeito adverso causado pelo fármaco ciclofosfamida, atuando como antioxidante e aumentando a expressão genética do *C-kit*. O óleo da polpa também apresentou resultados promissores como atividade antidiabéticas e antioxidantes, reduzindo os níveis de glicose em ratos diabéticos em dois estudos (NUNES *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

Por ser uma espécie ampla, nativa, com grande potencial de exploração e com grande aceitação popular na região do Cerrado, mais estudos das

propriedades farmacológicas da macaúba se tornam necessários para ampliação e descrição de efeitos benéficos dessa espécie.

2.2 CÂNCER DE MAMA

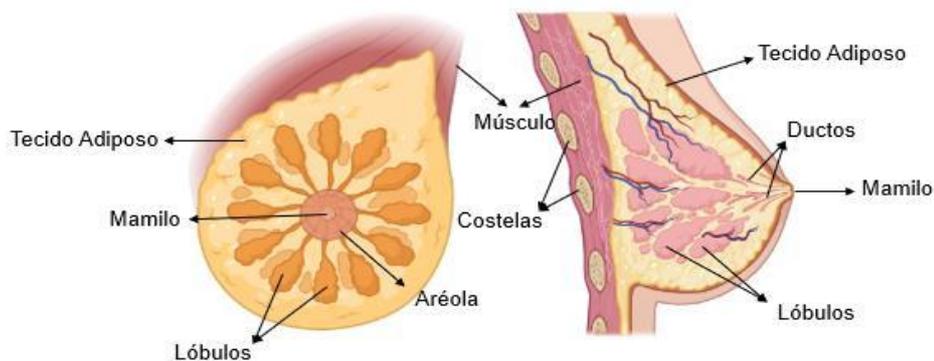
A manutenção eficiente da homeostase dos tecidos e reparo de suas lesões é caracterizada quando há um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Eventualmente, esse sistema apresenta rupturas ou falhas, que podem gerar alterações na estrutura da molécula de DNA, denominadas mutações, que desencadeiam modificações no processo de tradução de suas fitas. Esses processos podem ser originados de forma hereditária ou provocado pela ação de agentes mutagênicos físicos (raio-X), químicos (substâncias específicas, como o parafenilenodiamina em produtos capilares) e biológicos (agentes virais). Normalmente, quando há a ruptura da homeostase, a correção pode ocorrer pelo sistema imunológico dos indivíduos, ou por “checkpoints” durante o ciclo celular, corrigidos pelo próprio sistema de divisão. Caso esse mecanismo celular não consiga corrigir a falha, ocorre então uma proliferação de células mutadas, em um processo conhecido como a tumorigênese, que tende a se desenvolver e levar a patologia conhecida mundialmente como câncer, nome dado a um grupo de doenças que levam a um crescimento descontrolado e intensa divisão celular (SAINI, 2012; MAGOSSO, 2016).

O câncer é mundialmente a segunda maior causa de mortes nos últimos tempos. Dados mais atualizados indicam que a doença já tenha superado a marca de 9,6 milhões de óbitos (WHO, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estipulou que, até o ano de 2030, cerca de 75 milhões de pessoas em todo o mundo desenvolverão algum tipo de tumor e, dentre esses, aproximadamente 27 milhões serão malignos e levarão ao óbito cerca de 13,2 milhões de indivíduos em todo mundo, sendo que 7,5% do esperado seja no Brasil. Para o triênio 2020-2022 espera-se que ocorram 625 mil casos em território nacional, projeção em que o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Esse visível aumento no número de ocorrências é reflexo do estilo de vida contemporâneo,

caracterizado pelo envelhecimento populacional e da elevada prevalência dos fatores de risco, que podem favorecer a formação de tumores. Dentre suas variações, o câncer de mama aparece como sendo o segundo tipo mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo (WHO, 2018; BRASIL, 2019; BRAY *et al.*, 2018; BRASIL, 2020).

Segundo a literatura, a classificação do câncer de mama, antigamente se dava a partir de aspectos histológicos e morfológicos ou moleculares. O histológico, relacionado a qual região da mama o tumor se situa (Figura 5) pode ser dividido em não invasivos ou pré-invasivos (carcinoma ductal in situ e lobular in situ) ou invasivos (ductal invasivo ou lobular invasivo). Os não invasivos ficam restritos a região do ducto ou do lóbulo, enquanto os invasivos são classificados desse tipo quando há disseminação para o restante do tecido mamário adjacente (FABBI, CARCANGIU, CARBONE, 2008; RAKHLIN *et al.*, 2018).

Figura 5. Anatomia da mama feminina.



Created in BioRender.com 

(Fonte: JOHNSON, 2010 & MCGUIRE, 2016, com modificações).

Apesar de utilizada por muito tempo, a classificação histológica-morfológica era insuficiente para caracterizar os carcinomas da mama, uma vez que os tumores com mesmo tipo histológico podem apresentar diferentes

prognósticos e respostas à terapia. Nesse contexto, uma nova classificação foi apresentada no Painel de Especialistas na Conferência Internacional de Câncer de Mama (BCC) de St. Gallen, baseada nas características moleculares dos tumores. Essa classificação, realizada a partir do perfil de expressão gênica e a presença de alguns marcadores moleculares, permitiu definir pelo menos quatro grupos distintos: HER2+; luminal A; luminal B; e triplo negativo (VIEIRA *et al.*, 2008; SIERRA *et al.*, 2014; VALLE, 2019).

O câncer de mama Luminal A se caracteriza com reduzida taxa de proliferação e expressão de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), além de ausência de HER2. Já o Luminal B difere do A pela alta taxa de proliferação, além da maior expressão dos receptores de progesterona e de HER2. O subtipo super expressivo do HER2 recebe esse nome por possuir esse fenótipo positivo, RE negativo, alta taxa de proliferação e ausência de receptores hormonais. O subtipo basal, também conhecido como triplo negativo, é conhecido por ser o mais agressivo dentre esses, constituindo cerca de 10 a 20% de todos os tumores mamários, com alta proliferação e taxa de metástase, além de pior prognóstico e alvo terapêutico não definido. A nível molecular, pode ser caracterizado pela ausência de expressão dos receptores hormonais RE, RP e HER2 negativo (SIERRA *et al.*, 2014; DELMONICO *et al.*, 2015; TURASHVILI e BROGI, 2017).

Normalmente, a neoplasia mamária pode ser detectada pelo autoexame, sendo necessária a avaliação clínica e a realização de mamografia e/ou ultrassonografia. Os casos irregulares são confirmados por meio da biópsia tecidual. Além disso, a utilização de diagnóstico a partir das características moleculares permite a busca de um tratamento mais certo, aumentando as chances de eficácia terapêutica do paciente, impedindo casos de metástase e tentando contornar as dificuldades nos presentes tratamentos dos tumores (MARTINS *et al.*, 2017).

Atualmente, os tratamentos consistem naqueles de atuação local, como cirurgias conservativas ou mastectomia e radioterapia, ou aqueles que possuem atividade sistêmica, caso das quimioterapias, imunoterapias e hormonioterapias (ACS, 2018; MILLER *et al.*, 2019; VALLE, 2019).

Apesar dessa variedade e dos avanço tecnológico no tratamento terapêutico, é comum a presença de efeitos adversos nos métodos citados anteriormente, o que gera a diversos transtornos aos pacientes, como problemas imunológicos (alergias, reações autoimunes e de hipersensibilidade), cardiovasculares (arritmias, edemas, taquicardias, bloqueio atrioventricular, isquemias), dermatológicas (reações cutâneas, alopecia, fotossensibilidade, alterações de pigmentação, reação à radiação), dores (abdominais e cólicas, óssea, no peito, cefaleia, mialgia, neuropática), endócrinos (ginecomastia, hipotireoidismo), sexual (impotência, perda de libido, infertilidade), gastrointestinais (anorexia, colite), psicológicos (depressão, ansiedade), estéticos, e outros (SAAD *et al.*, 2002; CLEELAND *et al.*, 2012; NIH, 2015).

Além dos efeitos colaterais, os métodos terapêuticos disponíveis atualmente podem não ser totalmente eficazes. No caso do câncer de mama triplo-negativo (TNBC), objeto de estudo desse trabalho, é comum a reincidência da doença entre o primeiro e terceiro ano depois do diagnóstico, chegando a 35% dos pacientes em até 6 anos após o tratamento, e com reincidivas relatadas de 8 a 10 anos depois, que acabam apresentando metástases mais agressivas que os outros subtipos de câncer de mama (BLOWS *et al.*, 2010; CRISCITIELLO *et al.*, 2012; POGODA *et al.*, 2013; COLLINGNON *et al.*, 2016).

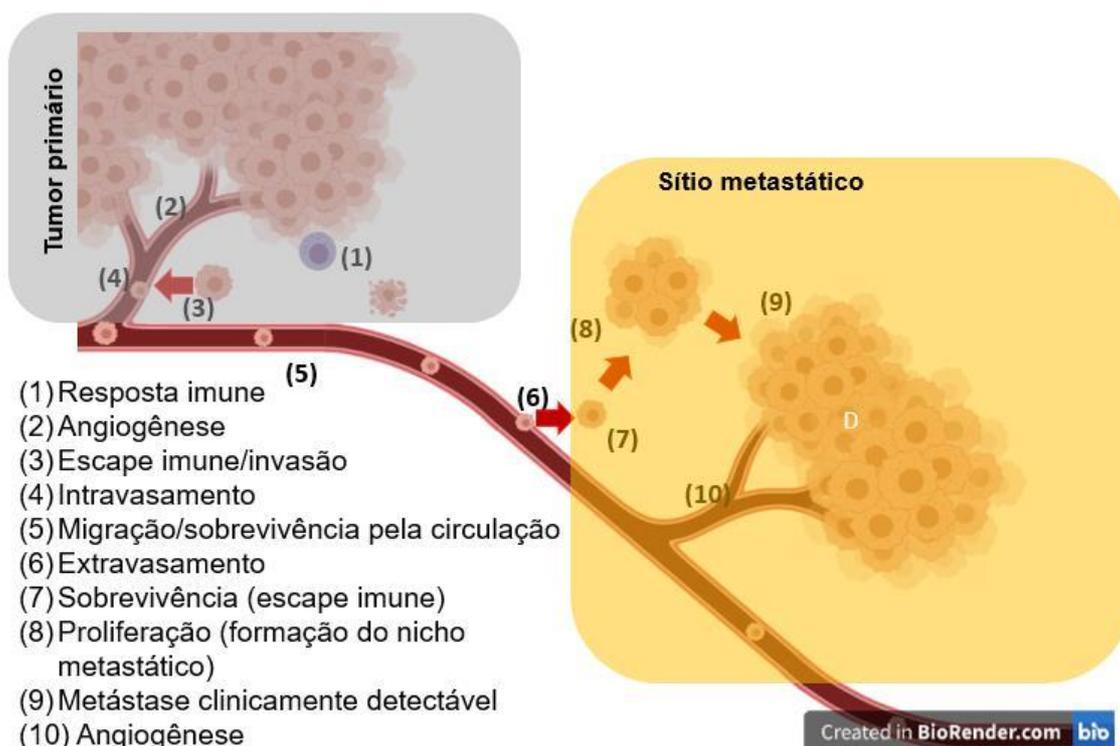
Dados indicam que a maior causa de morte por câncer de mama não é devido ao tumor primário em si, mas sim pela formação de sítios secundários oriundos do processo metastático, que leva a óbito cerca de 90% dos casos, geralmente nos pulmões, ossos, fígado, cérebro, tecidos moles e glândulas suprarrenais. Dados em literatura sugerem que os tratamentos convencionais, como a imunoterapia e a quimioterapia possuem sucesso limitado em reverter a progressão, devido ao recrutamento de células imunossupressoras para tumores, auxiliando assim na proteção de células tumorais metastáticas da vigilância, anulando os efeitos desses tratamentos (PERRET e CRE, 2008; SCULLY *et al.*, 2012; KITAMURA, QIAN, POLLARD, 2015).

O desenvolvimento de metástases em TNBC inclui várias etapas, como demonstrado na figura 6. Seu processo é extremamente complexo e de entendimento limitado à luz do conhecimento atual, relacionado a diversas etapas, como alterações genéticas e epigenéticas, escape da resposta

imunológica, intravasamento através da membrana basal, sobrevivência na circulação, extravasamento em tecidos distais, interações tumor-estroma e angiogênese (KITAMURA, QIAN, POLLARD, 2015).

Ao contrário do que sugeriam os primeiros modelos de câncer metastático, segundo os quais a disseminação do tumor ocorria em estágios tardios da carcinogênese, os estudos mais recentes mostram que a metástase se dá de forma mais precoce durante a progressão do tumor mesmo nos pacientes diagnosticadas em estágios iniciais, justificando a necessidade de mais estudos da doença metastática nesses pacientes (FREUDENBERG, 2009; CHAFFE *et al.*, 2011).

Figura 6. Etapas para a migração e formação de metástases oriundos do câncer de mama.



(Fonte: Elaborado pelo autor, 2021).

Neste cenário, a busca de testes e tratamentos moleculares que forneçam alternativas terapêuticas mais adequadas aos tratamentos se tornaram de extrema importância. Estudos recentes indicam que a saída para encontrar uma solução viável está na busca de terapias que foquem na supressão de proteínas

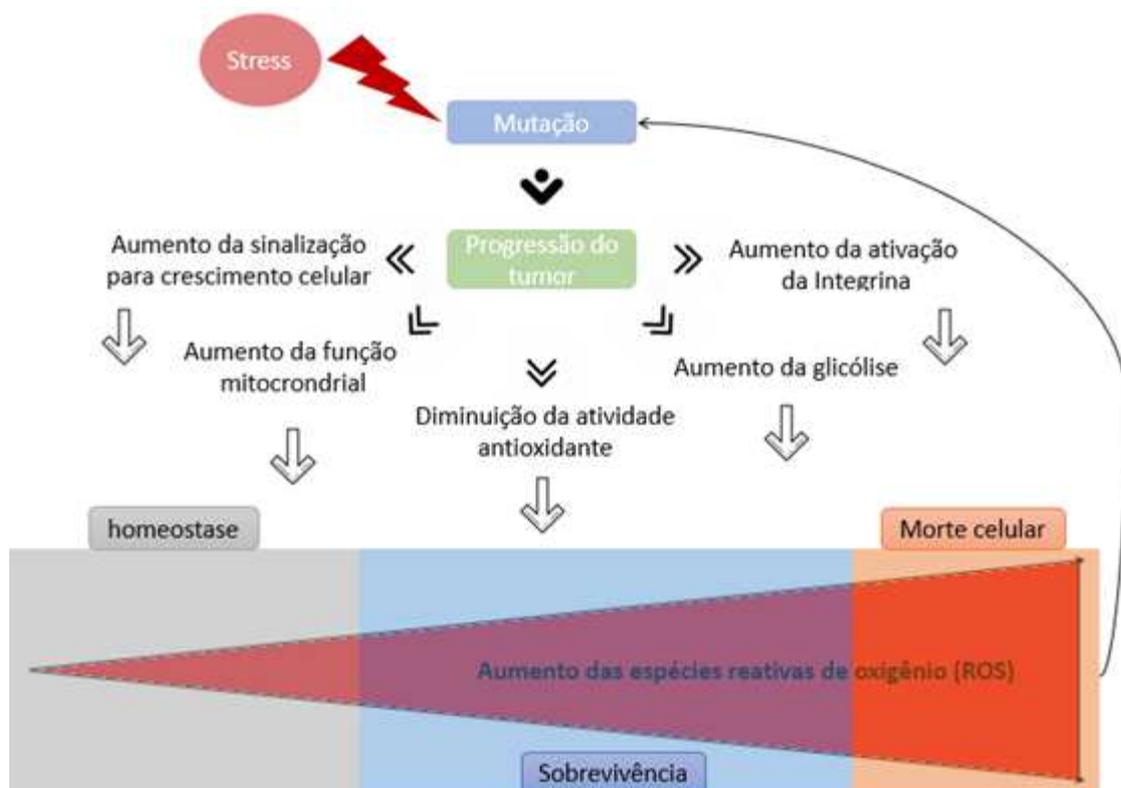
relacionadas a esse tipo de câncer, como a EGFR conhecida pela especificidade para TNBC (quando comparado com outros subtipos de câncer de mama), e relacionada geralmente pelo aumento da resistência deste tipo de células cancerosas às terapias convencionais. Além disso, as metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 são capazes de modular a progressão do tumor no manejo da transição epitelial-mesenquimal, invasão, metástase e crescimento do tumor, além de participar na formação de nicho pré-metastático e induzir respostas inflamatórias. Outro tratamento em potencial se relaciona no controle das espécies reativas de oxigênio, conhecidas por induzirem danos as fitas de DNA por meio da oxidação de núcleo bases, além de alterar os processos celulares por meio de seus efeitos na função das proteínas, dependendo do grau de oxidação da mesma (DENG, *et al.*, 2013; AL-MAHMOOD, *et al.*, 2018; ZHAO, *et al.*, 2019).

Os efeitos das EROs estão relacionados ao grau de oxidação das proteínas. Quando há uma maior oxidação por parte dessas espécies, as estruturas proteicas acabam perdendo a sua função, evento denominado como oxidação terminal. Nesse sentido, a influência de EROs na iniciação e promoção do tumor é complexa e está relacionada à quantidade, duração, localização e contexto. Ainda assim, as modificações causadas em proteínas podem desempenhar um papel fundamental para a adaptação ao estresse oxidativo para facilitar o metabolismo dessas espécies reativas em enzimas relacionadas a esse processo, como as KEAP1, GAPDH ou PKM2 (HARRIS e DENICOLA, 2020).

Muitos estudos definiram funções variadas das EROs no tratamento de tumores, agindo como promotor ou supressor desses, com abundantes evidências apoiando ambas as teses. Como essas espécies são um subproduto inevitável do metabolismo celular, o aumento da atividade metabólica que nutre o aumento da proliferação nas células cancerosas leva ao aumento natural da produção das EROs, como demonstrado na Figura 7. Tendo conhecimento desse mecanismo, uma grande parte dos quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento das carcinogêneses eleva os níveis intracelulares dessas espécies reativas de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo dessas células e levando a morte das mesmas. Porém, a não especificidade desses recursos

terapêuticos acaba levando a morte das células saudáveis conjuntamente, trazendo efeitos adversos aos pacientes em tratamento. De maneira geral, as teorias até então formuladas indicam que o aumento das EROs durante o desenvolvimento do tumor fornece ao mesmo uma vantagem de sobrevivência da célula tumoral. Assim, existe a possibilidade de exploração da eliminação dessas espécies reativas para controle e supressão do crescimento tumoral em pacientes (SCHUMACKER, 2006; WANG e YI, 2008; YANG *et al.*, 2018).

Figura 7. Progressão do tumor e sinalização que implicam o aumento das ROS em células tumorais.



(Fonte: YANG *et al.*, 2018, com modificações).

Nesse cenário, a utilização dos bioativos antioxidantes, como os já anteriormente citados aqui, carotenos, tocoferóis e ácidos graxos livres presentes no óleo de polpa da macaúba aparecem como alternativa promissora e natural no desenvolvimento de formulações no tratamento de controle dessas EROs. O β -caroteno, constituinte já relatado aqui anteriormente como presente

no óleo de macaúba, é constantemente apresentado em literatura como pró-vitamínicos, antioxidante e antineoplásicos. Goora (2020) comprovou através de da utilização de dieta com vegetais de folhas verdes houve o controle do estresse oxidativo oriundos da utilização dos carotenoides presentes nestes, e a sua importância de utilização como ingredientes culinários para a saúde humana. Outro estudo também demonstrou a atividade antineoplásica através da ação desse composto na regulação da diferenciação celular, regressão celular, biogênese da membrana, síntese de DNA, RNA, proteínas e colágeno, bem como reduzindo a transformação de células pré-tumorais em células tumorais. Os tocoferóis, também presentes no óleo da polpa da macaúba, também possuem estudos significativos para validação de sua atividade. Em um desses trabalhos pesquisadores visualizaram a diminuição da viabilidade de células MDA-MB-231 após tratamento com α -tocoferol (BERTRAM, 2004; TAM *et al.*, 2018).

Ainda assim, não há relatos em literatura que avaliem a atividade antitumoral do óleo de macaúba, sendo esse o primeiro trabalho a ação da polpa do fruto dessa espécie em literatura. Infelizmente, a aplicação farmacêutica de óleo de polpa de macaúba é muito limitada por suas propriedades físico-químicas, incluindo o caráter apolar do óleo e a perda de estabilidade dos compostos bioativos com fatores exógenos, requerendo assim a produção de uma formulação adequada a fim de superar as fracas propriedades biofarmacêuticas e explorar totalmente seu potencial terapêutico. Nesse cenário, a utilização de formulações que reduzem o tamanho para escala nanométrica vem garantindo o interesse de pesquisadores na busca de uma entrega eficaz desses compostos (MITTAL e BANERJEE, 2016; OVIDI *et al.*, 2020).

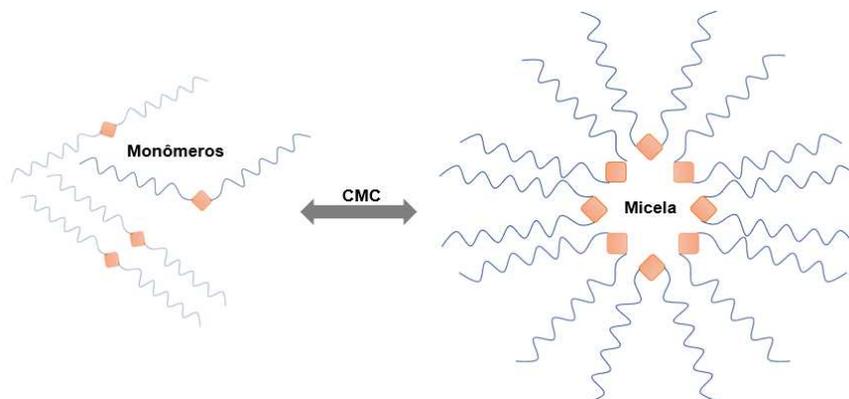
2.3 NANOCARREADORES

Baixa solubilidade aquosa, absorção, biodisponibilidade, acúmulo inespecífico fora do alvo e rápida excreção são alguns dos desafios para o desenvolvimento farmacêutico de novos sistemas de medicamentos. Esses parâmetros podem ser melhorados significativamente com o uso de nanossistemas de entrega. Pode-se definir esse sistema como um mecanismo

de transporte em escala nanométrica, que tem como objetivo carrear um composto (fármacos, moléculas, etc.) pelo sistema biológico até entrega-lo em um tecido alvo. Os sistemas nanoestruturados estão sendo amplamente utilizados devido ao seu pequeno tamanho, que fornece características físicas, químicas mecânicas e ópticas únicas, o que garante vantagens especiais, como o aprimoramento da relação ao mesmo material quando comparado em escala maior (RAWAT; SINGH; SARAF, 2006; PADMAVATHI, 2013; MITTAL e BANERJEE, 2016).

Dentro da alta diversidade de dispositivos nanoestruturados, compostas por nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas metálicas e outras, as micelas poliméricas (MP) a partir de copolímeros aparecem sendo uma tecnologia altamente promissora. A micelização a partir de copolímeros deu-se pela primeira vez no início dos anos 90 pelo grupo de pesquisa do Prof. Kataoka, da Universidade de Tóquio, Japão. Este sistema é gerado pela auto- associação de unidades moleculares de copolímeros anfifílicos em estruturas supramoleculares, quando eles estão acima de uma concentração micelar crítica (CMC), como demonstrado na Figura 8. Além da CMC, a temperatura mínima em que o polímero inicia o processo de micelização é denominada temperatura micelar crítica (CMT) (KATAOKA *et al.*, 1990; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006; BATRAKOVA, KABANOV, 2008).

Figura 8. Processo de micelização das micelas poliméricas.



(Fonte: Elaborada pelo autor, 2021).

Essas micelas apresentam um núcleo interno hidrofóbico, que pode hospedar fármacos hidrofóbicos e melhorar sua solubilidade aquosa, e uma concha externa hidrofílica, que serve como uma interface estabilizadora entre o núcleo hidrofóbico e o ambiente aquoso. Além disso, a camada externa pode hospedar drogas hidrofílicas ou moléculas específicas de direcionamento (ligadas por conjugação química), permitindo o controle da biodistribuição e direcionamento específico (KATAOKA *et al.*, 1990; LOURENÇO, 1996; RAWAT; SINGH; SARAF, 2006; BATRAKOVA e KABANOV, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2017).

As MP apresentam uma grande estabilidade estrutural em corrente sanguínea. Essa boa atividade é devida a sua superfície com carga estável e o seu tamanho reduzido de 200 nm, que acaba criando uma camada de água em sua interface, permitindo a “camuflagem” desse nanosistema frente ao sistema imune do indivíduo. Essa atividade é conhecida como estratégia de furtividade, e permite à amplificação das aplicações terapêuticas de compostos que anteriormente não conseguiriam realizar tal atividade, como o óleo de macaúba. Além disso, o sistema de micela ainda permite uma lenta dissociação do fármaco, o que permite o aumento da circulação sanguínea, e seu alto peso molecular dificulta a filtração glomerular renal, que se torna mais lenta do que em comparação aos fármacos usuais (CHIAPPETTA e SOSNIK, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2017).

A utilização de micelas baseadas em copolímeros vem ganhando destaque nos últimos tempos. Além dos fatores anteriormente citados, a diversidade de polímeros, a sua biocompatibilidade e as inúmeras possibilidades de estruturação e associação dos mesmos seguidamente em blocos acrescentam ainda mais na atratividade aos olhos do mercado (DE FARIA, 2014; PINHO e FIGUEIRAS, 2016).

2.3.1 Copolímeros em bloco

Polímeros são macromoléculas com alta massa molecular, que possuem características especiais devido ao seu tamanho, forma tridimensional e assimetria. São constituídos por unidades repetidas, os monômeros. Dentro

dessa classe encontram-se os copolímeros em bloco, grupo específico de polímeros em que diferentes tipos de homopolímeros estão ligados entre si por ligação covalente, formando seções homogêneas na cadeia principal, denominadas blocos (CAVALCANTE, 2009; DE FARIA, 2014).

Copolímeros em blocos podem se apresentar nas formas sequenciais dibloco, tribloco e multibloco, ou nas formas radiais, como a de estrela ou enxertado, variando de acordo com as condições de síntese, a quantidade distinta de homopolímeros por seção e a utilização ou não por segmentos mais complexos, como proteínas ou blocos quirais (COELHO e GOMEZ, 2007; CAVALCANTE, 2009).

Graças a essas características particulares, a utilização de polímeros e seus grupos tem sido alvo de desenvolvimento e pesquisa nas áreas industriais, de biotecnologia, nanotecnologia e tecnologia ambiental. Outro fator que agrega a importância dos copolímeros em bloco é a possibilidade de combinação dessas estruturas com natureza química distintas, podendo assim manipular as propriedades finais dessas estruturas em bloco (CAVALCANTE, 2009; DE FARIA, 2014).

Combinações entre blocos hidrofóbicos e hidrofílicos gera uma separação de fases específicas no copolímero em bloco, graças a imiscibilidade termodinâmica, uma vez que as ligações entre diferentes blocos são feitas por ligação covalente. Assim, esta separação de fases induz a formação de diversas estruturas nos copolímeros em bloco, as quais são denominadas de estruturas supramoleculares auto-associadas (DE FARIA, 2014).

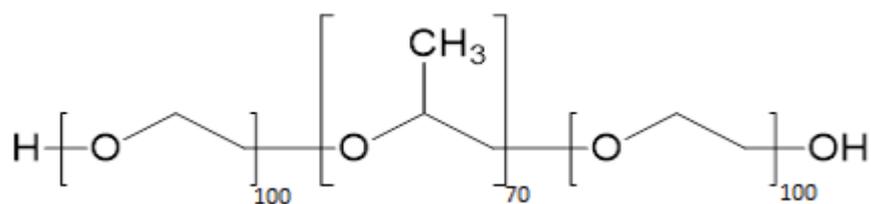
Dentro do grupo de polímeros comercialmente disponíveis, *Pluronic® F-127* (PF-127) se destaca por sua grande variedade de aplicações biomédicas, garantindo padronização na preparação e estruturação de variados tipos de nanopartículas (CAI, 2015; FANG, 2016; WANG, 2019).

O *Pluronic® F127* [Poloxamer 407, Mw 12500] possui a capacidade de se auto conjugar e formar uma estrutura em micela. Como visto na Figura 5, sua estrutura é delineada por três blocos ligados covalentemente: poli (etileno glicol) - bloco-poli (óxido de propileno) - bloco-poli (etileno glicol) (PEG-PPO-PEG). A síntese da cadeia formadora do PF-127 se dá através da polimerização aniônica

com a adição de monômeros de óxidos de propileno e etileno de maneira sequencial, com a presença de um catalisador alcalino, sendo os mais comuns utilizados o hidróxido de sódio ou potássio (SCHMOLKA, 1977; NAGARAJAN, 1999; DIAS, 2015).

A solubilidade desse constituinte varia de acordo com a estrutura e da temperatura. De forma geral, o Pluronic® F-127 é termossensível e pertence a uma classe de compostos nomeados como hidrogéis. Isso se deve ao fato da sua capacidade de se manter líquido em temperaturas mais baixas, como a temperatura ambiente, e se converter em um gel semi-sólido em temperaturas mais altas, como a corporal, promovendo a desidratação das unidades de óxido de propileno e os copolímeros em bloco diminuem a solubilidade dos mesmos. Essa propriedade de gelificação na temperatura corporal pode levar a liberação prolongada do medicamento e auxiliar no efeito local, característica bem aproveitável na encapsulação de constituintes para a formação de micelas poliméricas (ALEXANDER *et al.*, 2013; AKASH; REHMAN, 2015; SHRIKY *et al.*, 2020).

Figura 9. Estrutura do Pluronic® F-127.

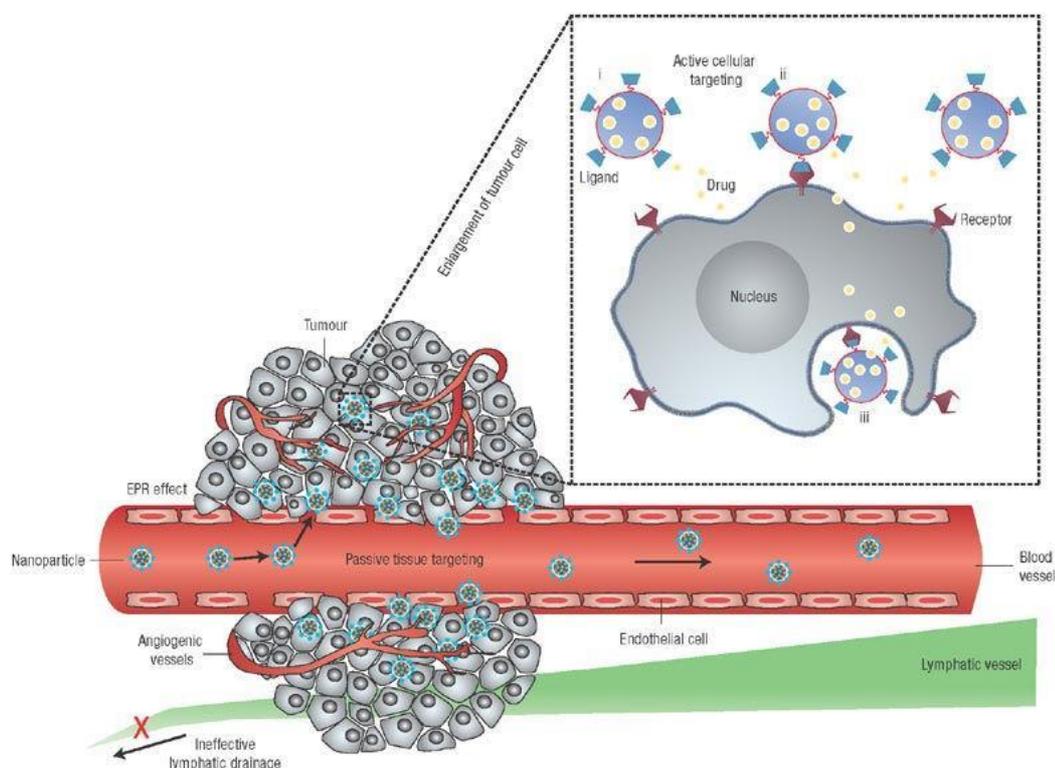


(Fonte: Elaborada pelo autor, 2021).

Usualmente, as micelas poliméricas formadas com o PF-127 apresentam tamanhos variando entre 10-200 nm. Essa mudança de tamanho, a forma e/ou a química da superfície das nanopartículas permite que suas funcionalidades sejam adaptadas para atender a diferentes requisitos, sofrendo assim diferentes interações no organismo, como a questão da furtividade. Como citado anteriormente, a carga superficial neutra das micelas poliméricas utilizando esses polímeros promovem estabilização estérica, o que evita a dissociação do sistema e a liberação precoce do material encapsulado. Além disso, graças ao seu tamanho muito inferior ao usual, os carreadores de drogas nanométricos são direcionados passivamente para os tumores pelo efeito EPR (*Enhanced*

Permeability and Retention) permitindo assim o acúmulo de uma concentração mais alta da droga para o local do tumor. A figura XX apresenta esse efeito. Somado a isso, esses sistemas de copolímero em bloco são apresentados com uma toxicidade diminuída quando comparado ao de administração sistêmica, e são desorganizadas em cadeias únicas de polímero *in vivo* que podem ser facilmente excretadas por filtração renal (KABANOV, 2006; BATRAKOVA, KABANOV, 2008; CAI, 2015; FANG, 2016; FEITOSA *et al.*, 2019; WANG, 2019).

Figura 10. Efeito EPR atuando auxiliando no efeito passivo de permeabilização do fármaco em sítios tumorais.



(Fonte: ZERDA e SANJIV, 2007).

Trabalhos realizados já demonstraram a efetividade desse tipo de polímero na estabilização e encapsulação de outras substâncias. Wang e colaboradores (2018) demonstraram promissores resultados no tratamento direcionado para o câncer de micelas baseadas em Pluronic® F127. Nesse estudo, a bufalina (um tipo de medicamento antitumoral) internalizada possuía liberação acentuadamente acelerada com a exposição a condições

representativas de um ambiente tumoral a partir da variação da temperatura intracelular, característica adquirida pela formação das micelas desse polímero (WANG et al., 2016).

Em outro estudo, as micelas poliméricas com Pluronic® F127 foram utilizadas em associação com o docetaxel e outros polímeros, demonstrando que micelas poliméricas mistas podem ser uma estratégia promissora para distribuição antitumoral e que não há perda da efetividade com a combinação com PF-127 (ZHANG *et al.*, 2017).

Alguns estudos demonstraram que disparidades de características entre micelas preparadas por diferentes métodos são constantemente relatadas. De modo geral, as duas principais estratégias para a preparação de nanopartículas poliméricas são a dispersão de polímeros pré-formados e a polimerização de monômeros. Dessa maneira, várias técnicas podem ser utilizadas nessa preparação, como a evaporação de solvente, *salting-out*, nanoprecipitação, polimerização em emulsão e miniemulsão (THICKETT e GILBERT, 2007; RAO *et al.*, 2016; RAMOS, 2018).

A escolha do método deve ser baseada nas propriedades do polímero e do solvente, bem como nas do medicamento. A escolha correta do método é importante para fornecer condições favoráveis à absorção do medicamento pela via selecionada. Wang (2018) utilizou a nanoprecipitação para formação de micelas de Pluronic® F127 e bufalina. Ramos (2018) formou um sistema micelar através da técnica de miniemulsão a partir dos monômeros de metacrilato de metila, ácido acrílico e ácido metacrílico, utilizando o equipamento de ultrassonificação.

Desta forma, este trabalho pretendeu desenvolver micelas poliméricas preparadas com Pluronic F127 contendo o óleo de macaúba através do método de miniemulsão utilizando o ultrassonificador e avaliou o diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e a citotoxicidade dessas micelas em linhagens MDA-MB-231.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antitumoral, antiproliferativa e antimetastática de micelas poliméricas associadas ao óleo da polpa de macaúba em modelos *in vitro* e *in vivo* de câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo da polpa da macaúba;
2. Determinar a atividade antioxidante e a quantificação dos carotenoides totais e compostos fenólicos presentes no óleo de polpa de macaúba;
3. Desenvolver micelas poliméricas contendo o óleo da polpa de macaúba e Pluronic® F-127;
4. Caracterizar as micelas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta;
5. Verificar a eficiência de encapsulação de óleo de macaúba nas micelas desenvolvidas;
6. Avaliar a estabilidade coloidal das micelas poliméricas contendo óleo de macaúba ao longo do tempo;
7. Avaliar a viabilidade de células das linhagens MDA-MB-231, 4T1 de câncer de mama e de fibroblasto L929 através do ensaio de MTT, após o tratamento com as micelas poliméricas contendo óleo de macaúba;
8. Realizar ensaios de clonogenicidade *in vitro* em linhagens de célula MDA-MB-231, tratadas com as micelas poliméricas contendo óleo de macaúba;
9. Avaliar a atividade anti-migratória da micela polimérica contendo óleo de macaúba através do ensaio de migração em linhagens de célula MDA-MB-231;

10. Verificar a ação da micela polimérica contendo óleo de macaúba no crescimento do tumor de câncer de mama induzido *in vivo* em camundongos Balb/c;

11. Avaliar os parâmetros hematológicos e analisar o tamanho e o peso dos tumores dos animais tratados com a micela polimérica contendo óleo de macaúba;

12. Avaliar a atividade antiproliferativa da micela polimérica de óleo de macaúba em modelo *ex vivo* através do ensaio de clonogenicidade;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

O óleo de da polpa macaúba foi adquirido de Mundo dos Óleos, Brasília (CNPJ: 33.460.511/0001-45). O Pluronic® F-127, Cloreto de sódio e o meio RPMI foram obtidos de Sigma-Aldrich (EUA). Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), o soro fetal bovino (SFB) e a tripsina foram adquiridos da Gibco (EUA). Azul tripan e brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT) adquiridos da Invitrogen (EUA). O DMSO foi adquirido da Dinâmica (BRA). Fosfato de sódio monobásico, o fosfato de sódio dibásico, e o paraformaldeído foram obtidos da Synth (BRA). O SDS foi obtido de Bio-rad (EUA). Cristal violeta foi adquirido da Cromoline (BRA). Os microtubos de EDTA foram comprados da Biocon (BRA). Acetato de etila, o metanol e a Rutina foram adquiridos da Vetec (BRA). O Folin-Ciocalteu foi adquirido da MP Biomedicals (EUA). DPPH e o betacaroteno foram adquiridos da Merck (Alemanha). O carbonato de sódio foi adquirido da Panreac (EUA).

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDEOS PRESENTES NO ÓLEO DA POLPA DE MACAÚBA ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (CG)

Para a caracterização qualitativa do óleo da polpa de macaúba, foi utilizada a metodologia de cromatografia em fase gasosa, com o auxílio do equipamento Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent, EUA) equipado com detector por ionização de chamas. Utilizando uma coluna SUPELCOWAX-10 30m x 0,2mm x 0,2 µm (SIGMA ALDRICH) com gradiente de temperatura de: coluna = inicial de 120°C, aumentando-se cerca de 2,5 °C por minuto até atingir-se 240 °C; Injetor: 240 °C Split: 1/10 e Detector: 260 °C. A identificação dos picos foi feita através de análise comparativa com padrões de ácidos graxos metilados Supelco37 Fame mix (Supelco cat no 47885-U).

4.3 DETERMINAÇÃO DOS CAROTENÓIDES TOTAIS

O ensaio de carotenoides totais foi realizado segundo Pereira (2016), com modificações. Cerca de 1 mL do óleo da polpa da macaúba foi dissolvido em acetato de etila (0,1 mg/mL), seguida da adição de uma solução de NaCl 0,5% e centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, 250 µL do sobrenadante foram coletados e solubilizados em metanol, em concentrações que variavam de 7,5 a 350 µg/mL. A partir dessa solução, uma alíquota da mesma foi utilizada para leitura em espectrofotômetro a 460 nm (Spectramax 190 (Molecular Devices, California, EUA) e o número de carotenoides totais da amostra foi expresso em mg equivalente de µg/mL. Como comparativo, uma curva de um padrão de betacarotenoide foi utilizado como controle.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR FENÓLICO

A determinação do teor de fenóis foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu com pequenas modificações (DOWD,1959; FOLIN,1927). O ácido tânico foi utilizado como padrão. A curva de calibração foi preparada, com concentrações que variaram de 7,5 a 350 µg/mL de uma solução metanólica de ácido tânico (500 µg /mL). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 µL do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 µL da amostra e 100 µL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm.

Para o doseamento do óleo de polpa da macaúba foi preparada uma solução estoque a 500 µg/mL em metanol. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 120 µL do reagente Folin Ciocalteu 20%, 30 µL da amostra e 100 µL de carbonato de sódio 4%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 770 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e a média ± desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

A atividade antioxidante do óleo da polpa de macaúba foi realizada conforme apresentado por Brand-Williams e colaboradores (1995), com modificações, através do método de redução do radical DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazila). Para tal, 1 mg do óleo foi solubilizado em 1 mL metanol, seguido de homogeneização. A partir dessa mistura, uma curva com as concentrações de 250 a 049 µg/ml foi feita de maneira seriada, e o cálculo da redução do radical foi possível a partir da adição do DPPH solubilizado em metanol (20 µg/ml).

As diluições foram mantidas longe da luz e em temperatura ambiente por 30 minutos e, finalizado o período de tempo, o potencial antirradical foi expresso como a concentração das amostras capazes de inibir 50% da absorbância do DPPH (IC₅₀ estimado) por espectrofotometria Spectramax 190 (Molecular Devices, California, USA) na região da radiação visível de 517 nm. Como grupo controle positivo, uma solução de DPPH e Rutina (flavonoide) foi também preparada e testada em mesmas concentrações. Para quantificar o resultado, a atividade antioxidante foi calculada através da equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs (DPPH)} - \text{Abs (a)}}{\text{Abs (DPPH)}} \times 100$$

Onde:

Inibição % = Atividade Antioxidante

Abs (DPPH) = Absorbância do grupo controle DPPH em metanol

Abs (a) Absorbância da amostra

4.6 PREPARO DAS MICELAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas de micelas poliméricas foram preparadas conforme no trabalho realizado por Rapaport e colaboradores (1999), com modificações. Inicialmente, o Pluronic® F-127 foi pesado e solubilizado em água MilliQ separadamente (0,7% m/v). Posteriormente, como esquematizado na Figura 10, a solução foi adicionada ao óleo da polpa de macaúba previamente pesada, na concentração de 1,0% m/v (demonstrado na Tabela 1), que foi submetida a

irradiação ultrassônica (315W) em homogeneizador ultrassônico (Ultrasonics) durante o período de 3 minutos por 3 vezes em sequência.

Figura 11. Esquema de preparação da Micela polimérica.



(Fonte: Elaborado pelo próprio autor, 2020).

Tabela 1. Composição da Micelas Polimérica de óleo de macaúba

	Micela Polimérica F-127	% (m/v)
Composição	Solução Pluronic® F-127	0,70
	Óleo da polpa de macaúba	1,00

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS

4.7.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersão das micelas poliméricas

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição do tamanho e do índice de polidispersão das nanopartículas foram realizados através da utilização do equipamento Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), a partir da técnica de espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS), sob a utilização de um laser de He-Ne (633 nm) com feixe incidente em ângulo de detecção de 173° utilizando cubeta de quartzo (ZEN2112) a 25°C. A técnica se baseia na análise das flutuações de intensidade de espalhamento de luz de NP em movimento Browniano em um

determinado ângulo, quando um feixe de luz é incidido sobre a suspensão. Essas flutuações são analisadas pelo método cumulante e o coeficiente de difusão obtido é utilizado para cálculo dos diâmetros hidrodinâmicos e índice de polidispersão (Pdl) da população usando a equação de Stokes-Einstein. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.7.2 Determinação da carga superficial das partículas

A determinação do potencial Zeta das micelas foi obtida a partir do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Para isso, as nanopartículas foram diluídas em solução de NaCl 1mM (1:400 v/v) e submetidas a um campo elétrico com potencial estabelecido de aproximadamente 150 mV, utilizando uma cubeta específica (DTS1060). O potencial Zeta refere-se ao potencial elétrico na interface da dupla camada de íons entre a partícula e o meio dispersivo. É resultado pela medida da velocidade com que a partícula se move em direção a um eletrodo de carga oposta quando um campo elétrico é aplicado. A velocidade é proporcional à força do campo e ao seu potencial Zeta. Assim, conhecendo a força do campo, ao medir a velocidade de movimento usando eletroforese laser Doppler, calcula-se o potencial Zeta (MALVERN, 2019).

4.7.3 Determinação da eficiência de encapsulação das Micelas Poliméricas

A porcentagem de óleo encapsulada nas micelas poliméricas foi determinada de forma indireta, a partir da coleta do sobrenadante (óleo não encapsulado após centrifugação a 15.000 rpm por 20 minutos). O filtrado foi coletado e medido em espectrofotômetro Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) em comprimento de onda 280 nm. A partir da curva de calibração foi possível encontrar a concentração de óleo da polpa de macaúba livre no filtrado e calcular a Eficiência de encapsulação EE (%) através da fórmula:

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentração total} - \text{Concentração de óleo no sobrenadante}}{\text{Concentração total}} \times 100$$

4.7.4 Determinação da estabilidade coloidal das Micelas Poliméricas

A estabilidade das micelas poliméricas foi avaliada através de leituras feitas mensalmente, em um período de seis meses (Fev/2021 à Ago/2021). Durante esse período, soluções de MP foram estocadas em temperatura ambiente e em refrigeração (4°C) e avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta por meio das técnicas de DLS e mobilidade eletroforética, conforme já descrito no item 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente.

4.8 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) utilizada nos experimentos foi doada pelo Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas-GEIMM da Universidade Federal de Santa Catarina. A linhagem de carcinoma de mama é triplo-negativo, de origem humana e com morfologia epitelial, derivada de um sítio metastático, com alta taxa de proliferação, não expressando receptores de estrógeno, de progesterona e nem receptores do tipo HER, segundo a American Type Culture Collection (ATCC, VA, EUA) (WELSH, 2013; FALÇÃO *et al.*, 2015).

A linhagem celular de câncer de mama Triplo-Negativa 4T1 (ATCC CRL-2539™) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essa linhagem é oriunda de câncer de mama *Mus musculus*, extraído de glândula mamária, que mimetiza o modelo de câncer de mama humano; Estágio IV. Apresenta-se aderida quando em cultura (PULASKI e OSTRAND-ROSENBERG, 1998).

Visando avaliar os impactos da MP-OM em células saudáveis, a linhagem de fibroblasto L929 (ATCC # CCL-1 CCL-1™) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essa linhagem é oriunda derivada de um camundongo C3H/An macho, do ano de 1948, do tipo aderente em cultura, não primária (KARAPINAR-KAZANDAG *et al.*, 2011).

Manteve-se as células em garrafas de cultura celular com meio de cultura recomendado pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ): meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado, 4.500 mg/L de glicose, 1.500

mg/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino inativado, além de 1% de penicilina-estreptomicina. Após adição do meio, as garrafas com as células foram encubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de 1 x 10⁶ células por garrafa e submetidas a troca do meio de cultura a cada 48h em fluxo laminar.

Para a realização dos experimentos, as células em garrafa foram ressuspensas, tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de meio de cultura recomendado. A contagem de células viáveis foi avaliada através do método de exclusão do Azul de Tripán, corante utilizado pela incapacidade das células de o internalizarem, por apresentarem membrana plasmática íntegra. Dessa forma, as únicas células coradas são aquelas com membrana danificada, indicando morte celular (FRESHNEY, 1987). Foram escolhidas as culturas de células com ao menos 90% de viabilidade celular a partir da análise a olho da confluência de aderência das mesmas.

4.8.1 Ensaio de viabilidade celular por mtt

Culturas de células das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo-negativo humana) 4T1 (triplo-negativo murina), e L929 (fibroblasto murino) foram selecionadas e semeadas em 100µL de meio DMEM High 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 96 poços estéreis à uma densidade de 5 x 10³ por poço e incubadas *overnight* a 37°C em 5% CO₂. Suspensões de micela polimérica contendo óleo de macaúba (MP-OM) foram adicionadas aos poços para a obtenção de concentrações finais de 0,386 mg/ml (C₁), 0,193 mg/l (C₂), 0,0965 mg/ml (C₃), 0,04825 mg/ml (C₄). O óleo da polpa livre solubilizado em DMSO e Tween 80 foi utilizado como controle, com as mesmas concentrações do MP-OM. Além desse. Além desses grupos, poços de células tratadas com meio DMEM HIGH 10% SFB, micela polimérica branca, isso é, sem óleo (MP-B), e DMSO e Tween 80, na proporção 1:9 (v/v) também foram utilizados como controles negativos.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24h, 36h e 48h. Após o tempo de incubação, o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-

2yl)-2,5-difenil tetrazolium]] foi adicionado e as placas foram novamente incubadas por 4h nas condições anteriores. Os precipitados de formazan formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) após o tempo determinado. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, California, EUA) em comprimento de onda 540nm. O grupo controle contendo apenas meio de cultura foi considerado como 100% de células viáveis e comparado aos tratamentos, sendo os resultados expressos em porcentagem.

4.8.2 Ensaio de antiproliferativo (clonogenicidade) *in vitro*

O ensaio de clonogenicidade se caracteriza como um ensaio de sobrevivência celular baseado na capacidade de uma única célula proliferar e conseguir formar uma colônia (FIEBIG, MAIER, BURGER, 2004; SAMPAIO, 2015).

Cerca de 300 células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 6 poços e tratadas uma vez com os seguintes grupos: MP-OM em concentrações de 0,386 mg/ml (C₁) e 0,0965 mg/ml (C₃), MP-B, OM-LIVRE e meio DMEM (Controle) com 10% de SFB no volume de 2 ml por poço. Após o período de duas semanas (14 dias), as células foram lavadas com PBS 1x e as colônias foram fixadas com paraformaldeído por 15 minutos. Realizou-se novamente a lavagem com PBS 1x, sendo coradas com cristal violeta 0,5% por 1 minuto. Ao fim desse tempo, os poços foram lavados com água milli-Q e as colônias foram fotografadas e contadas com o auxílio do aplicativo CFU Scope (Medixgraph, California, EUA). Em seguida, utilizou-se solução de SDS 1% e agitação por uma hora a 37°C para que as células fossem solubilizadas e posteriormente serem quantificadas em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, California, EUA) através da absorbância em comprimento de onda de 620 nm com posterior análise estatística.

4.8.3 Ensaio de migração (*wound healing*)

A capacidade de migração celular em tratamento com MP-OM foi avaliada em linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231. Inicialmente, uma concentração de 5×10^4 células/poço foram semeadas em placas de 24 poços estéreis e tratadas com 500 μ L de DMEM High contendo 10% de soro fetal bovino. A placa foi incubada a 37°C e 5% CO₂ e, a partir do momento que as células atingiram cerca de 90% de confluência, com um auxílio de ponteiros p200 um risco (*scratch*) foi feito no centro da camada celular em cada poço, a fim de remover as células aderidas naquela área. Em seguida, os poços foram lavados com PBS em abundância para a remoção de restos celulares. Após essa etapa, os poços foram tratados, em triplicata, com os seguintes grupos: MP-OM em concentrações de 0,386 mg/ml (C₁) e 0,0965 mg/ml (C₃), MP-B, OM-LIVRE e meio DMEM sem SFB como controle negativo. Posteriormente, as regiões riscadas em cada poço foram fotografadas nos tempos 0h, 12h, 24h, 36h e 48hr com auxílio de microscópio invertido acoplado à câmera fotográfica no aumento 10x. Os resultados desse ensaio são apresentados em imagens, calculando-se a área da ferida e sua evolução diária até o fechamento, através do programa ImageJ (National Institute of Health, Maryland, EUA).

4.9 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO ANTITUMORAL IN VIVO

4.9.1 Animais

Para o experimento, foram utilizados 8 camundongos fêmeos BALB/c com idade entre 4 e 6 semanas e peso médio de 25g obtidos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR/UFJF). Os animais foram acondicionados em caixa de propileno recobertas por maravalha e alimentados com ração comercial Nuvilab e água filtrada oferecida *ad libitum*. Foram mantidos sob condições padronizadas de climatização em estantes climatizadas, com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro controladas automaticamente durante todo o procedimento experimental. O protocolo experimental do presente trabalho foi submetido. À Comissão de Ética no uso de animais da UFJF, recebendo aprovação certificada no protocolo n° 024/2020 – CEUA.

4.9.2 Delineamento experimental

Para desenvolvimento dos experimentos de avaliação da micela polimérica contendo macaúba, cerca de 0,2 ml de meio DMEM HIGH 10% SFB contendo uma concentração de 1×10^5 células da linhagem 4T1 foram injetadas no tecido adiposo da quarta mama de camundongos fêmeas Balb/c conforme realizado por Souza & colaboradores (2021). A injeção foi realizada com auxílio de uma seringa de 10 μ L nos animais.

Após o período de tempo de 10 (dez) dias, os animais foram analisados e aqueles que apresentaram o tumor visível e palpável foram divididos randomicamente em 2 grupos (Controle salina e MP-OM), cada um com 4 camundongos. O tratamento se deu no 1°, 5°, 8°, 12° e 15° dia, em concentrações de 100 mg/kg para o tratamento. A injeção foi realizada lentamente para evitar possíveis efeitos colaterais indesejados.

No 19° dia após o primeiro tratamento a eutanásia dos animais foi realizada. Durante todo o período do experimento os camundongos foram monitorados através do peso corporal. Os animais que apresentaram dor ou dificuldade com o tratamento foram acompanhados e, se necessário, a eutanásia do mesmo foi realizada para evitar seu sofrimento.

4.9.3 Efeito de inibição de tumor *in vivo*

As MP-OM foram administradas através de injeção intravenosa na região da cauda dos camundongos balb/c, em concentração de 100 mg/kg, com volume de aplicação de 0,2 ml. O grupo controle foram tratados com solução de NaCl (0,7%), em mesmo volume de aplicação que os da micela polimérica. Nos dias em que houve tratamento, os tamanhos dos tumores foram monitorados por paquímetro (Western® PRO digital caliper 6'') até o 19° dia, quando os animais foram anestesiados e sacrificados. Além disso, os tumores também foram extirpados, pesados e fixados em formaldeído (10%). Os volumes de cada dia foram calculados com base na fórmula descrita abaixo:

$$Volume = (D1 \times D2^2) \frac{1}{2}$$

Onde: D1 = diâmetro horizontal; D2 = diâmetro vertical

4.9.4 **Análise hematológica**

O sangue total foi retirado por punção intra-cardíaca em 3 animais de cada grupo, seguido do armazenamento em microtubos com EDTA, congelados em freezer e enviados para a análise no Vivanálises Laboratório Veterinário (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). As células brancas totais e diferenciais, plaquetas (PLT), glóbulos vermelhos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), porcentagem de hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV) e concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) foram medidos. Os parâmetros foram determinados em analisador de hematologia SDH-3 (Labtest Diagnostica SA, MG, Brasil).

4.9.5 **Ensaio antiproliferação (clonogenicidade) *ex vivo***

Os membros inferiores dos camundongos foram coletados em fluxo laminar e dissecados para o isolamento do fêmur e da tíbia, visando a separação da medula óssea dos animais.

Com auxílio de tesouras e pinças, houve a remoção das epífises dos ossos para o *flushing*, método que consiste em lavar com PBS 1x o interior da tíbia dos animais, até que a mesma fique transparente, indicando a remoção quase total do conteúdo celular em seu interior. Após isso, o líquido coletado foi centrifugado por 10 (dez) minutos, a 400 xg, em temperatura ambiente (24° C). O *pellet* formado foi ressuscitado em meio RPMI-1640 com 10% SFB e 1% antibiótico e, em placas de 6 poços, cerca de 1×10^6 células/mL foram plaqueadas e mantidas em estufas a 5% de CO₂ a 37° C por 14 dias. Ao final do período de diferenciação, o sobrenadante foi descartado as células foram fixadas com uma solução de metanol durante 5 (cinco) minutos e em seguida foram coradas com cristal violeta a 5% por 1 (um) minuto. Ao fim, uma solução de SDS 1% foi adicionada em cada poço e mantida sobre agitação por 1 hora, até que fosse possível a quantificação da absorbância por Espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, California, EUA) em comprimento de onda de 620 nm com posterior análise estatística.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) e teste t foram realizadas para testar os efeitos entre os grupos de tratamentos individuais, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

Para os ensaios que se avaliavam o IC_{50} os valores foram calculados através da expressão dos resultados com um percentual de controle, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com um intervalo de confiança próximo a 95%.

Os resultados apresentados foram expressos em valores médios \pm erro padrão da média, exceto quando devidamente identificado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA POLPA DE MACAÚBA

5.1.1 Perfil dos ácidos graxos

Para se verificar os perfis de ácidos graxos presentes na amostra, utilizamos a cromatografia em fase gasosa (CG). Os constituintes presentes e a porcentagem de concentração dos mesmos podem ser observados na Tabela 2. O ácido oleico (C 18:1) foi o ácido graxo predominante na amostra, com 45,5% da área. Em seguida, o ácido linoleico apareceu com 26,8% e o ácido palmítico, com 12%. No geral, a composição se apresentou como sendo 17,5 % ácidos de cadeia saturada, 41,7% de cadeia monoinsaturada e 37,1% poli-insaturado.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos (CG) de amostras de óleo da polpa de frutos de macaúba (%).

COMPOSIÇÃO QUÍMICA		
Pico	Composto	Área (%)
1	C12:0-láurico	1,2
2	C14:0-mirístico	0,4
3	C16:0-palmítico	12,0
4	C18:1-palmitoléico	1,1
5	C18:0-esteárico	3,3
6	C18:1-oleico	45,5
7	C18:1 ω 7	1,9
8	C18:1 ω 15	1,0
9	C18:2-linoleico	26,8
10	C18:3-y-linolénico	2,3
11	C20:0-araquídico	0,3
12	C20:1-gadoléico	0,2
13	C22:0-behênico	0,4
	Outros	3,7
	Saturados	17,5
	Monoinsaturados	41,7

(FONTE: Elaborada pelo autor, 2021).

Del Río & colaboradores (2016) observaram uma concentração de 55% de ácido oleico, 23% de ácido palmítico e 10% de ácido linoleico nas amostras de *Acrocomia aculeata* oriundas da região de Mirabela – Minas Gerais (lat S16°29'55", long W44°04'14" datum WGS 84). Em outro trabalho, De Oliveira (2016) encontrou uma maior concentração de ácido oleico, cerca de 78,10%, seguido do palmítico e linoleico, 11,64% e 5,88%, respectivamente. Em geral, os trabalhos apontam uma concentração que varia de 80 à 45% do ácido oleico, além de 25 a 10% para o palmítico e 20% a 5% para o linoleico. Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças de localidade, clima, temperatura, umidade, altitude e idade da extração da amostra, que podem levar a alterações da porcentagem dos constituintes e são consideradas naturais. Ainda assim, os valores encontrados nesse trabalho estão condizentes aos observados em literatura para o óleo de polpa da macaúba (NASCIMENTO *et al.*, 2008; DO AMARAL *et al.*, 2011; LIEB *et al.*, 2019).

5.1.2 Quantificação de compostos fenólicos e carotenoides

Os valores encontrados de compostos fenólicos e carotenoides presentes no óleo da polpa de macaúba podem ser vistos na Tabela 3. Baseando-se no método proposto por De Oliveira (2016), com modificações, nosso trabalho encontrou uma concentração de $2,81 \pm 0,18$ mg/100g de concentração para carotenoides totais. Em outro trabalho, Lima & colaboradores (2017) também encontraram valores mais baixos, que variavam de 44,29 mg/100g a 7,33 mg/100g, dependendo do solvente utilizado. Já Tapeti e colaboradores (2013) demonstraram que o tempo que a amostra foi coletada também interfere nos valores de concentração dos carotenoides, onde após 31 dias, houve uma queda drástica dos valores apresentados por esse constituinte. Desta forma, mesmo estando abaixo, os valores encontrados estão condizentes com os encontrados em literatura, visto que a amostra utilizada em nosso trabalho tem um período maior que os 31 dias propostos por Tapeti (2013). Essa diminuição no valor da amostra é justificada pela instabilidade dos carotenoides, que com o tempo,

sofrem por processos de oxidação e isomerização a partir da exposição à luz, temperatura, radicais livres ou de alta concentração do oxigênio, o que acarreta na diminuição da sua concentração e conseqüentemente na diminuição da possível atividade antioxidante e pró-vitáminica (RIOS *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2017).

Tabela 3. Fenólicos totais e β -caroteno da polpa da macaúba.

Determinação	Amostra (1 mL = 0,856g)
Carotenoides totais (mg/100g)	2,81 \pm 0,18
Teor de fenol equivalentes em ácido tânico (mg/100g)	632 \pm 41

Fonte: Elaborado pelo autor (2021). Todos os valores representam média \pm DP (n=3).

Quanto ao teor de fenol equivalentes encontrado, por nosso trabalho o valor encontrado foi de 632 \pm 41 mg/100g equivalentes em ácido tânico. Esse resultado é maior que o encontrado por Callegari, Cren e Andrade (2014), quando convertido, onde o óleo da polpa teve valor de 212,95 mg/100g. Já De Oliveira (2016), citado anteriormente, obteve um valor de 2,69 \pm g/100g de amostra. Esse valor, quando convertido, também se mostra 3x inferior ao encontrado por nosso presente trabalho, e próximos aos encontrados por Andrade (2020), de 262,41 \pm mg/100 g.

Os valores encontrados na nossa amostra de *Acrocomia aculeata* divergem quando comparados a de outras espécies. Para fenóis totais, por exemplo, os valores demonstrados aparecem maiores que os 361 \pm 12.87 mg/100g encontrados em Romã (*Punica granatum* L.), açaí (*Euterpe oleracea*) com 136,8 mg/100g, mas menores que o encontrados em polpa de Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) de 850,62 \pm 4,68 mg/100g, por exemplo (DE OLIVEIRA, 2016; DERAKHSHAN *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2020).

5.1.3 Atividade antioxidante por DPPH•

Tendo em vista a presença dos compostos fenólicos e carotenoides encontrados na amostra, foi possível inferir que a macaúba possuísse algum tipo

de atividade antioxidante. A partir dessa lógica, o método de DPPH• foi escolhido com o intuito de avaliar essa característica.

Este método consiste na doação ou transferência de um próton para a molécula de DPPH•, que se estabiliza na forma diamagnética e forma a reduzida DPPH-H, com a perda da cor violeta. É uma metodologia considerada fácil, precisa, rápida e econômica, com perfeita adequação para a determinação da capacidade antioxidante de compostos naturais (OLIVEIRA, 2015; SIRIVIBULKOVIT, NOUANTHAVONG, SAMMENOI, 2018).

O resultado foi expresso pelo IC₅₀ (Tabela 4), valor referente à concentração necessária para 50% de inibição do radical de DPPH•. Quanto menor o valor do IC₅₀, maior é a capacidade de inibir a oxidação dos radicais em 50%, conforme apresentado na Tabela 4. O flavonoide Rutina foi utilizado como controle positivo. O óleo da polpa de macaúba utilizado em nossos experimentos apresentou um valor de 141,8 µg/mL, um valor que indica um potencial antioxidante inferior ao controle de Rutina (3,371 µg/mL).

Tabela 4. Perfil antioxidante do óleo da polpa da macaúba e da rutina, expressos em IC₅₀.

Determinação DPPH	IC ₅₀ (µg/mL)
Óleo de macaúba	141,8
Rutina	3,371

Fonte: Elaborado pelo autor (2021). Todos os valores representam média ± DP (n=3).

Os valores apresentados em literatura da atividade antioxidante da macaúba pelo método de DPPH• são divergentes. Nosso trabalho possui valores próximos aos apresentados por Da silva & colaboradores (2018), de 102 µg/mL e Monteiro-Alfredo & colaboradores (2020), que encontraram um valor de 117,10 µg/mL. Há também relatos apresentados de menores valores de IC₅₀, caso de Dario & colaboradores (2018), onde a amostra utilizada indicou que uma concentração de 23,89 µg/mL, e por Silva & colaboradores (2021), de 10,69 µg/mL. De Oliveira & colaboradores (2017) e Lopes & colaboradores (2013) também encontraram um valor menor de IC₅₀ para o óleo da polpa, de 63 µg/mL e 17,03 a 19,10 µg/mL, respectivamente.

Em geral, essa diferença nos valores pode ser explicada no tempo de vida de amostra. Tapeti & colaboradores (2013) visualizaram um aumento no valor dos peróxidos inversamente proporcional a diminuição dos carotenoides com o passar dos dias que a amostra havia sido extraída. Esse resultado se confirma ao avaliar a sua absorvidade molar, que passou de 230 nm para 270 nm, indicando a existência de processos de degradação oxidativa, razão que leva a oxidação dos carotenoides, diminuindo então a atividade antioxidante da amostra.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICELAS POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS

5.2.1 Diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (Pdl) e Potencial Zeta

A micela polimérica contendo óleo da polpa de macaúba foi preparada por auto associação utilizando ultrassom para homogeneização. Quando observada de maneira macroscópica, a solução apresentou uma coloração opaca esbranquiçada, com alta fluidez e homogeneidade. Microscopicamente, conforme apresentados na Tabela 5, a MP-OM apresentou diâmetros hidrodinâmicos médios de 105,8 nm, com Pdl de 0,12 e potencial Zeta de -17,2.

Tabela 5. Caracterização físico-química das Micelas Poliméricas da polpa do Óleo de Macaúba (MP-OM).

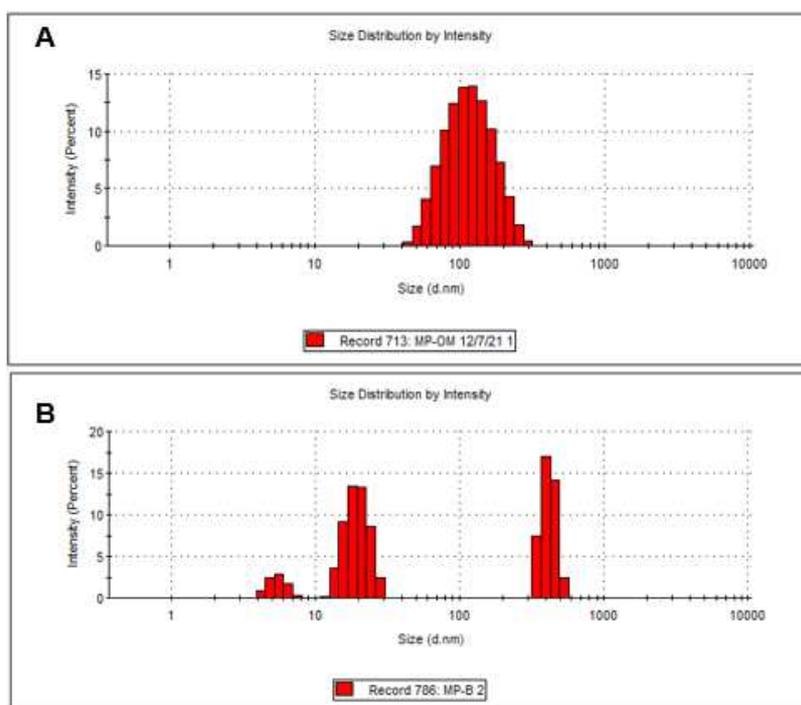
	DHM (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
MP-OM	105,8 ± 0,74	0,12 ± 0,03	-17,20 ± 0,35
MP-B	394,2 ± 205,83	0,54 ± 0,17	-0,17 ± 0,15

Fonte: Elaborado pelo autor (2020). Pdl: Índice de Polidispersão; MP-OM: micela polimérica formada de Pluronic® F-127 e com óleo de macaúba encapsulado; MP-B: micela polimérica sem a presença de ativo; Todos os valores representam média ± erro padrão da média (EPM) (n=3).

Tendo em vista os resultados apresentados para a amostra e, somado as informações apresentadas no gráfico visualizado na Figura 11a, é possível indicar que o método utilizado foi adequado para o preparo da micela, produzindo

sistemas com tamanho e distribuição unimodal. Tem-se ainda o valor baixo de Pdl (menor que 0,2), que sugere uma distribuição estreita do tamanho das partículas, mantendo-se assim um sistema com amostras de baixa dispersividade, em que o seu modelo esperado de forma seja parecido ao apresentado na Figura 12 (MOSQUEIRA *et al.*, 2001).

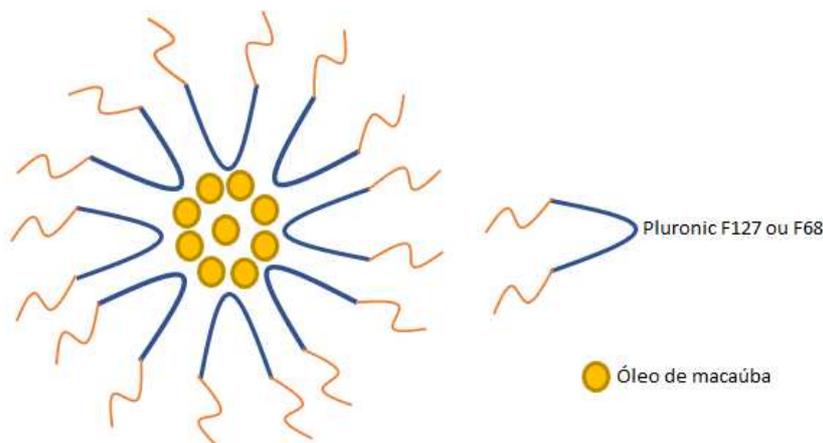
Figura 12. Gráfico de distribuição de tamanho por intensidade da (A) MP-OM e (B) MP-B.



O eixo Y representa a Intensidade (%) sobre tamanho (d.nm) em eixo X. (FONTE: Elaborada pelo autor, 2021).

Quanto a micela polimérica sem o óleo encapsulado (MP-B), os valores de tamanho (394,2 nm) e Pdl (0,5) foram maiores (Figura 11b). O método utilizado em sua formação foi o mesmo para a MP-OM, com a diferença de que apenas a solução de P-F127 foi ultrassonificada. Esses valores indicam que a associação com o óleo de macaúba auxilia na estabilização e em sua formação unimodal. Já o potencial Zeta foi de $-0,17$ mV. Esse valor é condizente com outros valores em literatura, já que o Pluronic® F-127 é conhecido por não apresentar carga elétrica (SEZGIN, YUKSEL, BAYKARA, 2006; NIU *et al.*, 2020)

Figura 13. Ilustração da provável conformação da micela polimérica de óleo de macaúba.



(FONTE: Elaborada pelo autor, 2021).

Há escassos relatos da utilização do óleo de partes da macaúba em sistemas nanoestruturados. Dário e colaboradores (2018) optaram pela utilização de um sistema de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), que encapsulou o óleo da polpa da macaúba utilizando uma partícula formada a partir da junção de tensoativos aquosos lauril sulfato de sódio (aniônico), poloxâmero (não iônico) e monooleato de sorbitano (não iônico), formando NLS que apresentaram valores de $106,9 \text{ nm} \pm 1,6$ e $188,4 \text{ nm} \pm 2,2$ para tamanho, e Potencial Zeta que variou entre -45 e -68 mV . Resultado similar foi apresentado por De Oliveira (2016), que formou uma NLS onde um dos constituintes era o Pluronic® F68 (PF-68), de estrutura semelhante, mas com diferenças no número de monômeros presentes na cadeia. Em seu trabalho, a NLS apresentou tamanho de $127 \pm 3,8 \text{ nM}$, com Pdl $0,18 \pm 0,02$ e Potencial Zeta de $-47,05 \pm 7,10 \text{ mV}$ para o óleo da polpa e $131,3 \pm 5,85 \text{ nM}$, Pdl $0,16 \pm 0,00$, Potencial Zeta de $-44,78 \pm 0,6 \text{ mV}$ para o óleo da amêndoa. Assim, a utilização dessa partícula como micela polimérica ou nanoemulsão não é encontrada em literatura, sendo esse o primeiro trabalho a realizar tal tipo de nanossistema para encapsulação do óleo de macaúba.

Resultados similares foram observados em outros trabalhos que optaram na utilização de óleos como princípio ativo ou constituintes das nanoestruturas. Em um trabalho de Lucia e colaboradores (2017), monoterpenos de óleos

essenciais formaram uma concha de copolímero associada a Pluronic® F127 e apresentaram resultados que variam de 10 a 200 nm, com Pdl entre 0,1 a 0,5. Wulff-Pérez e colaboradores (2008) obtiveram micelas de tamanho médio $94,0 \pm 0,8$ nm utilizando uma solução de PF-68 que se associava ao óleo de oliva, ou gergelim ou soja. Outros trabalhos com Pluronic também apresentaram tamanho de partícula e estabilidade semelhantes. A curcumina encapsulada em uma micela pelo PF-68 apresentou um tamanho de partícula que variou de 114 ± 6 a 132 ± 8 nm e de 114 ± 7 a 134 ± 5 nm a 37 e 4 °C, respectivamente, no estudo de Cai e colaboradores (2016).

Outros resultados, porém na formação de nanoemulsões, também demonstraram características parecidas as formadas em nosso trabalho. Shoorvarzi e colaboradores (2020) utilizaram o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. bloom e surfactantes para a formação de uma nanopartícula. Seus resultados indicaram um sistema unimodal com $76,9 \pm 6,11$ nm de tamanho e Pdl de 0,19. Além disso, uma análise microscópica da morfologia dessas partículas indicou gotas pseudo-esféricas. Xiao e colaboradores (2020) também prepararam essa estrutura de nanossistema para avaliar o potencial antiinflamatório do óleo essencial de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl e garantir sua estabilidade, considerada baixa em sistema aquoso. Utilizando Tween 80 e outros componentes para a formação, seus resultados indicaram uma partícula de tamanho $173,0 \pm 0,12$ nm e um PDI de $0,059 \pm 0,01$. Em outro trabalho, Zhang e colaboradores (2020), utilizaram óleo essencial de *Pinus koraiensis* associado a Tween 80 e outros surfactantes na formação de nanoemulsões que variavam de tamanho entre $17,3 \pm 0,12$ nm até $240 \pm 10,08$ dependendo do método utilizado em sua formação, variando a porcentagem do ativo, do surfactante ou da solução aquosa utilizada. Nesses casos, o Pdl também variou, em soluções que foram de $0,06 \pm 0,01$ até $0,46 \pm 0,074$.

Em relação aos resultados obtidos para o potencial Zeta, foi mostrada uma carga negativa na superfície de ambas as partículas. Pelas características não-iônicas do bloco hidrofílico PEG, presentes no Pluronic® F-127 e F-68, esperava-se carga próxima a 0. O resultado obtido de $-17,5 \pm 0,41$ mV pode ser resultado da ionização dos ácidos graxos do óleo encapsulado, em que o grupamento iônico ficará presente na porção hidrofílica da micela, enquanto sua

cadeia carbônica (hidrofóbica) ficaria associada ao núcleo hidrofóbico. Desta forma, a carga de superfície final torna-se negativa para o sistema. Resultados parecidos de potencial Zeta foram encontrados em diferentes trabalhos. Shoorvarzi e colaboradores (2020), como já relatados aqui anteriormente, demonstraram Zeta com valor de -43.5 mV para a nanoemulsão formada a partir do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. bloom. Em outro trabalho, o nanosistema com óleo essencial de *Pinus koraiensis* demonstrou valor de -34.4 mV, mais próximo ao encontrado pela MP-OM. Essas diferenças de potencial mesmo em óleos podem estar relacionadas as estruturas presentes em cada composto, variação de surfactante ou até mesmo na morfologia dos nanosistemas. Ao fim, tornou-se extremamente importante avaliar a estabilidade coloidal da MP-OM ao longo do tempo para avaliação de seu comportamento e garantir um sistema que preza pela uniformidade dos resultados e de uma boa entrega.

5.2.2 Estabilidade coloidal das Micelas Poliméricas

Duas formas conhecidas que promovem a estabilidade de nanopartículas podem ser analisadas e discutidas: a repulsão de cargas e o efeito estérico resultante de moléculas não iônicas. No primeiro caso, quanto maior a carga de repulsão, ou seja, o valor mais positivo ou negativo do potencial elétrico presente na superfície da estrutura, maior a estabilidade coloidal do sistema. Quanto à segunda variável, quanto maior a concentração de tais moléculas não iônicas, maior a camada hidrofílica entre as partículas, tendendo assim a maior estabilidade (LOURENÇO, 1996; KAKIZAWA *et al.*, 2004; VALLE, 2019).

Visando avaliar se as MP-OM formadas a partir do método de preparação anterior mantinha um DHM, Pdl e potencial Zeta constante ao longo do tempo, o presente trabalho acompanhou a preparação ao longo de 6 (seis) meses ou 185 dias, em temperaturas ambiente (TA) e de geladeira (4°C).

Macroscopicamente, o sistema se manteve opaco, cor opaca esbranquiçada, com alta fluidez e homogeneidade constante, como mostra a Figura 13. Quando avaliado as características ultramicroscópicas, a micela

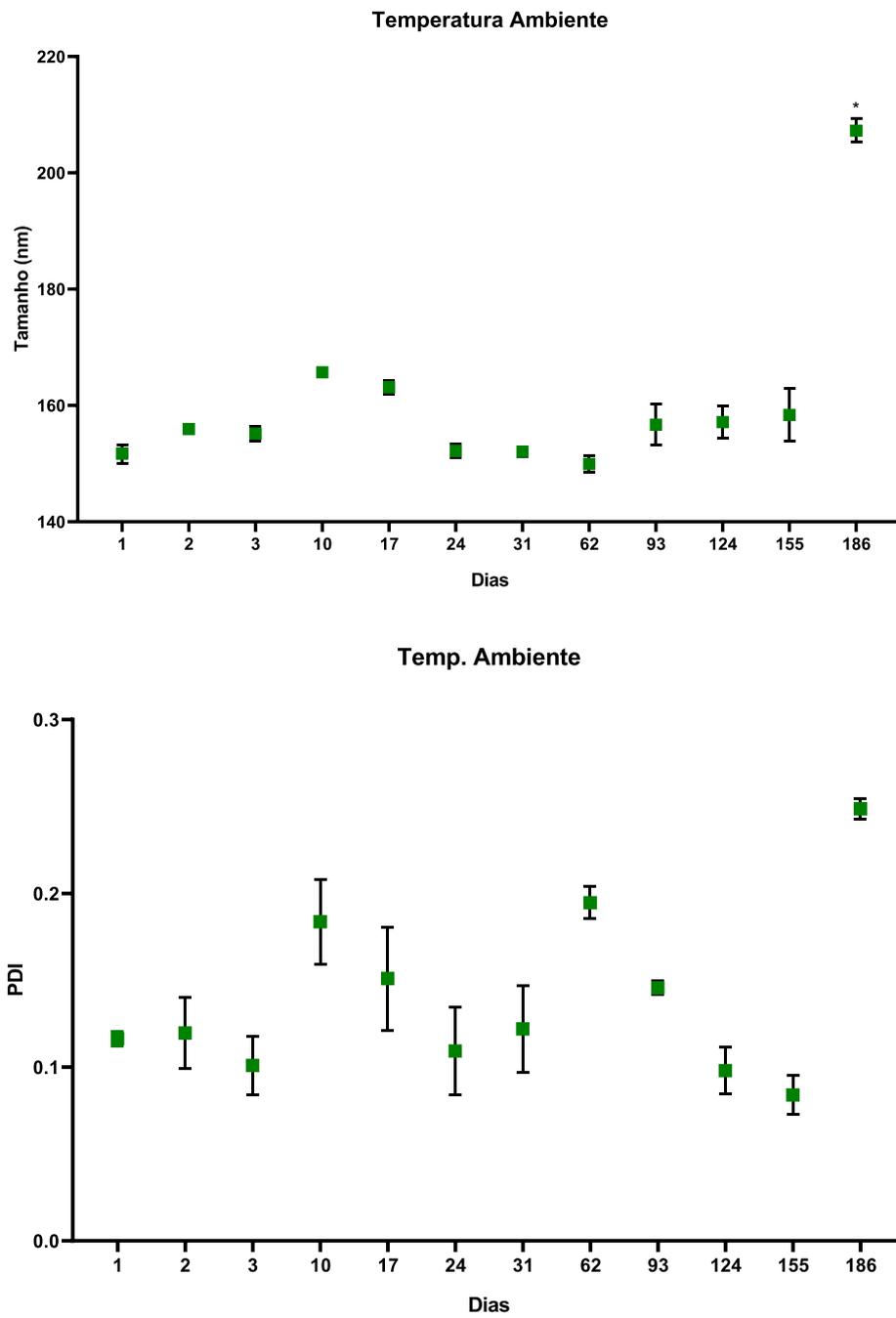
polimérica continuou mantendo uma estabilidade ao longo de 5 (cinco) meses. No entanto, no sexto mês houve um aumento significativo do diâmetro hidrodinâmico médio e do Pdl apenas quando armazenada em temperatura ambiente, como demonstrado na Figura 14. Nesse tempo, o valor de DHM para a amostra nesse armazenamento foi de $207,27 \text{ nm} \pm 2,0$ e Pdl de 0,2. Por outro lado, para a amostra armazenada a 4°C , o aumento do diâmetro pode ser notado a partir do quinto mês, indo para $178,27 \text{ nm} \pm 3,8$ e também no sexto, para $203,5 \pm 0,4 \text{ nm}$. Ainda assim, o Pdl se manteve na faixa de 0,2. Nos meses em que não houve o aumento médio do diâmetro, os valores de média foram de $156,2 \text{ nm} \pm 4,9$ para TA, e de $151,4 \text{ nm} \pm 8,2$ em 4°C . Quanto analisado o valor do potencial Zeta, o mesmo se manteve sem diferença significativa em todos os dias analisados para ambos os tratamentos, como demonstrado na Figura 15, indicando que a MP-OM, mesmo quando há um aumento da nanopartícula, ainda possa ser considerada um sistema com boa estabilidade coloidal sob armazenamento.

Figura 14. Soluções de MP-OM das amostras (A) de temperatura ambiente e (B) geladeira, após 6 meses que foram preparadas.



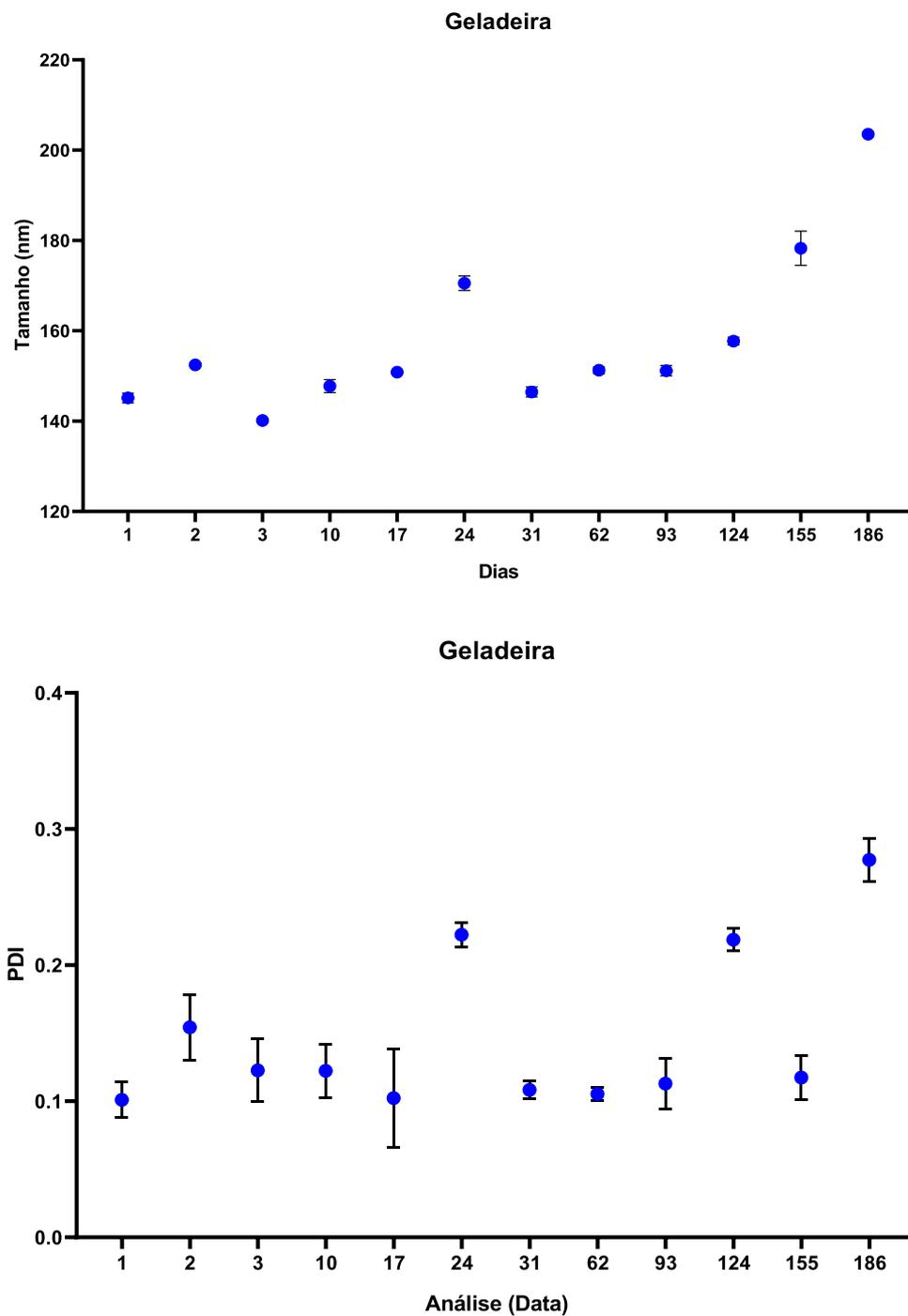
T.A – Temperatura ambiente; G: Geladeira. (FONTE: Elaborado pelo autor, 2021).

Figura 15. Estabilidade coloidal das MP-OM armazenadas em temperatura ambiente (TA) para (A) Diâmetro e (B) Potencial Zeta.



Todos os valores representam média \pm Média do erro padrão (SEM) (n=3) (FONTE: Elaborado pelo autor, 2021).

Figura 16. Estabilidade coloidal das MP-OM armazenadas em Geladeira (4°C) para (A) Diâmetro e (B) Potencial Zeta.



Todos os valores representam média \pm média do erro padrão (SEM) (n=3) (FONTE: Elaborado pelo autor, 2021).

Como comparação, De Oliveira (2016) avaliou as características morfológicas das NLS formadas com o óleo, sem avaliar aspectos ultramicroscópios como tamanho, Pdl e Potencial Zeta. Ainda assim, seus resultados indicaram um bom resultado desses dados no período de tempo de 90 dias, em temperatura ambiente, geladeira (4° C) e estufa (37° C).

Ribeiro (2016), avaliou micelas de Pluronic F127 por um período de 90 dias, em três temperaturas: 40°C, 25°C e 4°C. Seu trabalho indicou um aumento no diâmetro hidrodinâmico médio no 45° dia. Quanto ao potencial Zeta, houve uma variação a partir do 90° dia. Em outro trabalho, Saatkamp (2019) demonstrou que nanoemulsões formadas por lecitina, Pluronic® F123 e óleo de semente de uva e revestidas por quitosana mantiveram sua estabilidade por um período de tempo de 30 dias, com DHM entre 208 nm e 160 nm e Pdl maior que 0,2. O potencial Zeta, nesse caso, se manteve positivo ao longo do tempo, característica comum entre as nanopartículas de quitosana.

Comparando os resultados encontrados pelo nosso trabalho com os de literatura, é possível avaliar que, mesmo com o pequeno aumento do diâmetro hidrodinâmico médio e do Pdl, o sistema ainda pode ser considerado com uma boa capacidade de entrega e proteção, dando assim indícios de boa estabilidade a longo prazo, fator considerado de extrema importância para a introdução de um composto ao mercado.

5.2.3 Eficiência de encapsulação do óleo da polpa de macaúba

A eficiência de encapsulação (EE%) da MP-OM foi calculada a partir da quantificação indireta do óleo livre por espectrofotometria (DARIO *et al.*, 2018; VALLE, 2019). A porcentagem de óleo de macaúba encapsulado nas micelas poliméricas com solução de Pluronic® F127 a 7 mg/mL foi em média de 80,51 ± 13,45 %.

Dario & colaboradores (2018) também verificaram a eficiência de encapsulação de nanopartículas contendo óleo de macaúba em sua formulação. Nesse trabalho, o óleo foi constituinte para a encapsulação de Avobenzona e

Octocrileno, e a taxa de eficiência de encapsulação desses dois compostos variou de 33,3%, até 82,5%, sendo maior para o aprisionamento do segundo ativo.

É também possível encontrar em literatura outros trabalhos que avaliaram a eficiência de encapsulação de outros óleos como ativo encapsulado. Em um desses, Elgegren e colaboradores (2019), utilizando óleo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo.) conseguiram encontrar uma porcentagem de eficiência próxima a 40% em avaliação por espectroscopia UV-Vis. Em outro trabalho, Yang e colaboradores (2017) obtiveram resultados de 88 a 100% no aprisionamento de óleo de alga e óleo de café em nanoemulsões com tween 80 e span 80 como surfactantes. Em compostos com a presença do Pluronic® F127 em micelas, Wang e colaboradores (2018) demonstraram que a encapsulação de Gossipol foi de 91%, indicando um bom controle na retenção do fármaco nas nanopartículas formadas do método de ultrafilme.

Nosso estudo indicou uma alta taxa de eficiência de encapsulação do óleo de macaúba em micelas. Esse resultado pode ser definido pela boa associação do óleo e perfil já definido em literatura do Pluronic® F127 como um bom polímero para garantir um sistema estável. Correlacionado a essa alta taxa de aprisionamento, os resultados de tamanho e estabilidade, tanto em temperatura ambiente quanto em 4°C, indicam uma micela estável, de diâmetro hidrodinâmico médio adequado e com um bom potencial de aplicação na terapêutica para modular a encapsulação e entrega de ativos.

5.3 VIABILIDADE CELULAR

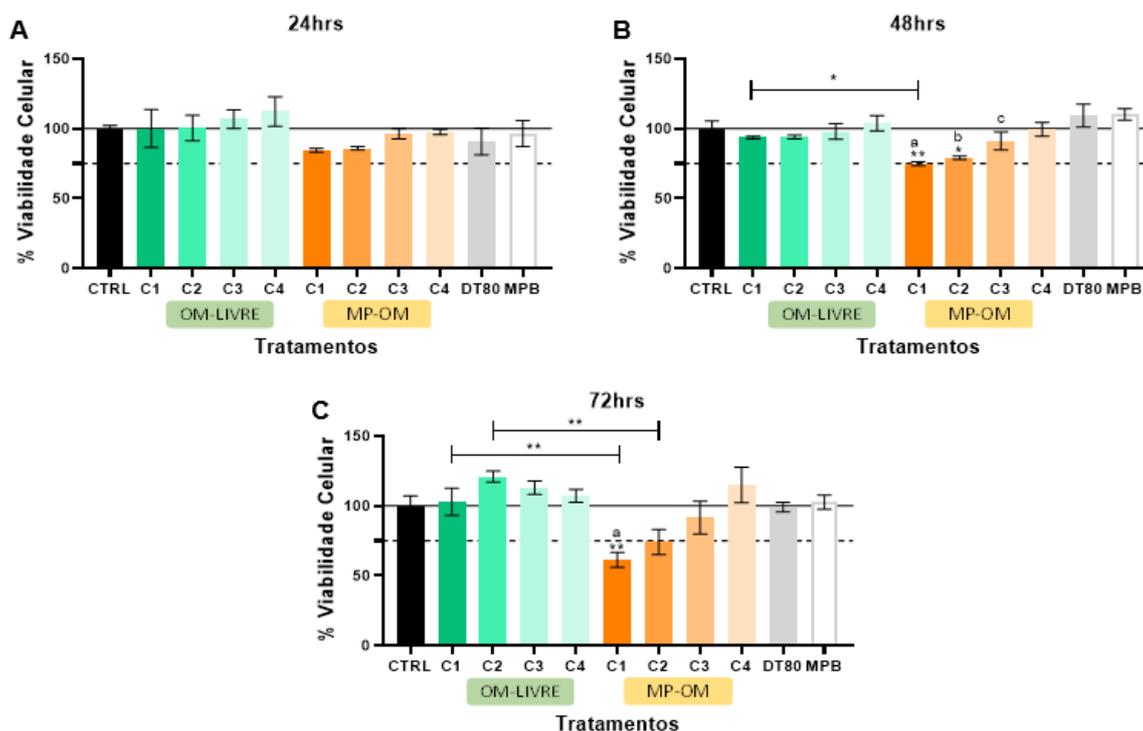
5.3.1 Ensaio de citotoxicidade por MTT

Para avaliar a viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231, 4T1 e L929 após a encubação com micelas poliméricas contendo óleo de polpa de macaúba, foi escolhida a técnica de redução de MTT. Neste método colorimétrico, o sal de MTT solúvel em água é reduzido em formazan, derivado caracterizado por ser insolúvel em meio aquoso e de coloração roxa. Essa reação dá-se através da

atividade das desidrogenases, que clivam o anel de tetrazólio, levando a redução do composto (MOSMANN, 1983; VALLE, 2019). Assim, as células com metabolismo mitocondrial ativo irão metabolizar o MTT em formazan, sendo possível assim avaliar a viabilidade celular.

A Figura 16 mostra uma ação citotóxica da MP-OM em células de câncer de mama triplo-negativo humana MDA-MB-231 após a incubação. Comparado ao grupo controle, não foram observadas nenhuma redução significativa na viabilidade de nenhum tratamento em 24 horas (Figura 16a), apesar das concentrações 1 e 2 da MP-OM apresentarem uma ligeira diminuição de 15,52% e 14,04% na viabilidade celular, respectivamente. Uma diminuição real dessa viabilidade foi observada a partir do tempo de 48 horas (Figura 16b), onde foi possível verificar uma queda da viabilidade celular de 25,04% em C1 e 20,74% em C2, mantendo-se em 72 horas (Figura 16c), que apresentou uma queda de 38,52% em C1. Apesar de não apresentar diferença significativa, a C2 continuou apresentando queda da viabilidade das células tumorais, com valor de 25,87%. As concentrações 3 (C3) e 4 (C4) da MP-OM não apresentaram variação significativa em nenhum dos tempos apresentados, mesmo resultado visto para o óleo da polpa de macaúba livre, quando comparado ao controle.

Figura 17. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama MDA-MB-231 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba em diferentes concentrações por (a) 24 hrs, (b) 48 hrs e (c) 72 hrs.



CTRL: grupo tratado com o veículo; C_{1,2,3,4}: grupo tratado com as concentrações previamente categorizadas; MP-OM: grupo tratado com micelas poliméricas constituídas de Pluronic® F127 e óleo da polpa macaúba; MPB: grupo tratado com micelas poliméricas sem ativo; OM-Livre: grupo tratado com óleo de macaúba em forma livre; DT80: Grupo solução de DMSO (90%) e solução Tween 80 (10%). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (SEM); *redução significativa de p<0.05 (ANOVA seguido de Bonferroni); ** redução significativa de p<0.001; ap <0,05 diferença significativa entre grupo controle e grupo MP-OM C1; bp<0.05 diferença significativa entre grupo controle e grupo MP-OM C2; cp<0.05 diferença significativa entre grupo controle e grupo MP-OM C3 (ANOVA ± SEM seguido de Bonferroni).

Além de comparação ao grupo controle, a comparação entre o grupo livre e o micela também torna-se necessário, a fim de se avaliar se a encapsulação do óleo da polpa de macaúba permite a mudança da atividade nas células, tornando-se citotóxica para a MDA-MB-231. Em geral, os resultados se assemelharam ao encontrado quando comparado ao grupo controle. Em 24 horas não foi possível observar diferença significativa entre as concentrações livre e encapsulada, mudança que alterou-se em 48 horas, quando C1 de MP-

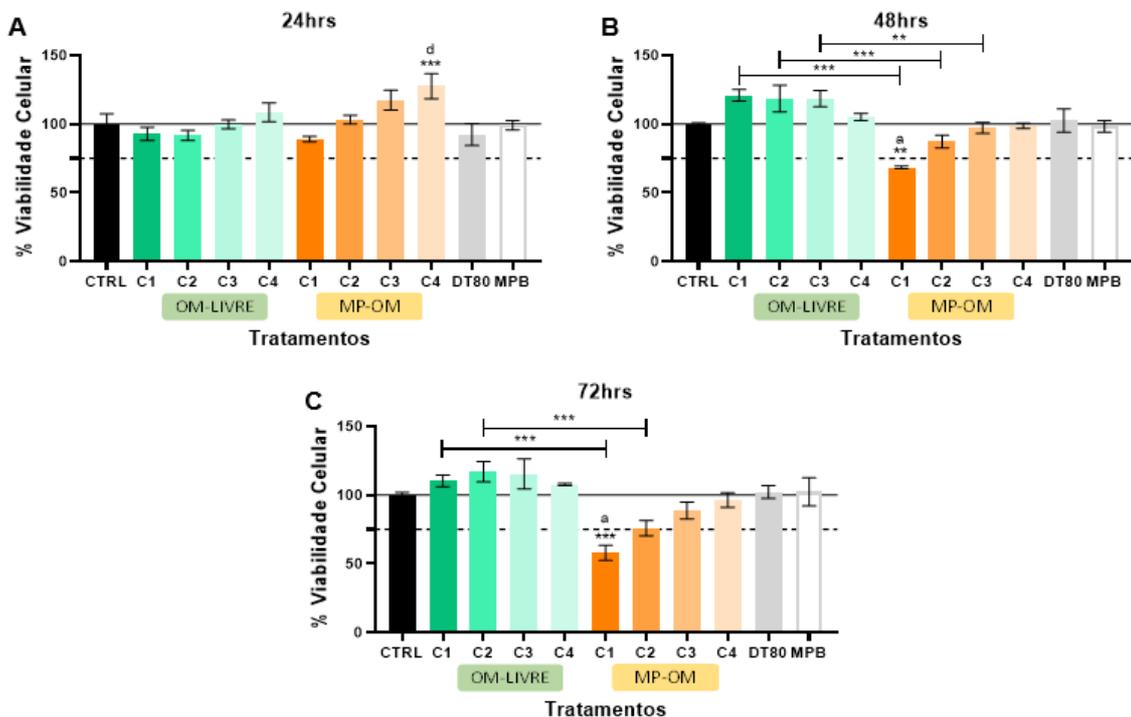
OM demonstrou redução da viabilidade, o que não foi observado no óleo livre. Ainda nesse tempo, C2, C3 e C4 repetiram o resultado de 24 horas, mesmo que C2 tenha apresentado uma diferença de 14,83% entre os dois grupos. Em 72 horas, os resultados continuaram indicando uma variação significativa em C1, cujo a viabilidade apresentou uma diferença de 41,44%. C2, que até então não tinha apresentado dados significativamente diferentes, nesse período de tempo foi possível observar uma diferença de 46,78%. Concentrações inferiores se mantiveram estatisticamente iguais ao controle.

É importante destacar ainda que o controle DMSO + Tween 80 e a Micela polimérica branca (MPB), se referem a valores da maior concentração utilizada no experimento e não apresentaram redução significativa em nenhum dos tempos testados para controle. Quando comparado os valores da MP-OM com os de MPB, foi possível avaliar diferença significativa em 48 horas para C1, C2 e C3 e em 72 horas no grupo C1. Isso nos permite aferir que qualquer redução ou aumento na viabilidade celular foi causada pela ação do óleo de macaúba livre ou da MP-OM, exclusivamente.

Visando avaliar se os resultados apresentados em MDA-MB-231 seriam semelhantes em células de carcinoma mamário triplo-negativa em murinos, o mesmo experimento foi conduzido a partir de células 4T1. Os resultados, que se encontram na Figura 17, se mostraram similares aos encontrados no modelo humano, com algumas pequenas diferenças. Em 24h (Figura 17a), a C4 da MP-OM demonstrou um aumento significativo em 24 horas de 27,53% comparado ao controle. A redução da viabilidade no tratamento com células MP-OM passou a ser observada novamente a partir de 48 horas (Figura 17b) em C1, que apresentou uma queda de 31,52%, um pouco superior ao valor apresentado nas células MDA-MB-231. O C2, que anteriormente também apresentou uma queda, nesse tipo de carcinoma demonstrou um resultado de queda de 12,75%. Nesse tempo, também foi possível observar um aumento significativo nas C1, C2 e C3 nos grupos de Óleo de macaúba livre, onde foi possível verificar um valor maior de 20,83% em C1, 18,51% em C2 e 18,47% em C3. Os resultados mais similares aos encontrados em MDA-MB-231 foram vistos em 72 horas (Figura 17c), onde a C1 apresentou uma redução significativa de 41,95%. A C2 novamente não foi significativa por ANOVA, mas demonstrou uma queda de 23,98%.

Quando comparado os grupos que contém macaúba, o resultado se manteve, com modificações. Como dito anteriormente, em 24 horas C4 demonstrou um aumento da viabilidade quando ao grupo controle, se repetindo também nessa condição. Em 48 horas, C1, C2 e C3 demonstraram diferença significativa entre os grupos MP-OM e OM-Livre, enquanto em 72 horas, apenas C1 e C2 demonstraram variabilidade. Em geral, os resultados foram parecidos aos observados nas células de MDA-MB-231. Foi possível observar que C1 continuou demonstrando a maior citotoxicidade em ambos os grupos, enquanto as outras concentrações variaram conforme o tempo. O mesmo raciocínio pode ser observado para os valores de MPB e DMSO, com a concentração 1 demonstrando diferença significativa em tempos de 48 e 72 horas da micela sem óleo.

Figura 18. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama 4T1 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba em diferentes concentrações por (a) 24 hrs, (b) 48 hrs e (c) 72 hrs.



CTRL: grupo tratado com o veículo; C_{1,2,3,4}: grupo tratado com as concentrações previamente categorizadas; MP-OM: grupo tratado com micelas poliméricas constituídas de Pluronic® F127 e óleo da polpa macaúba; MPB: grupo tratado com micelas poliméricas sem ativo; OM-Livre: grupo tratado com óleo de macaúba em forma livre; DT80: Grupo solução de DMSO (90%) e solução Tween 80 (10%). Resultados expressos como média ± erro padrão da

média (SEM); ** redução significativa de $p < 0.001$; *** aumento significativo de $p < 0.0001$; $p < 0,05$ diferença significativa entre grupo controle e grupo MP-OM C1; $p < 0.05$ diferença significativa entre grupo controle e grupo MP-OM C4 (ANOVA seguido de Bonferroni).

Os valores de IC_{50} calculados condizem com os dados encontrados. Os resultados estão presentes na Tabela 6. A concentração inibitória de 50% (IC_{50}) da MP-OM foi calculado de 1,163 mg/mL (24h) para células MDA-MB-231 e 0,745 mg/mL para células 4T1. Em 48h, o IC_{50} na célula tumoral humana foi de 0,713 mg/mL, enquanto a murina teve valor de 0,603 mg/mL, e em 72h, os valores foram de 0,431 mg/mL e 0,461 mg/mL, respectivamente. Quanto ao óleo livre, todas as concentrações demonstraram IC_{50} bem acima das concentrações testadas.

Tabela 6. Valores de IC_{50} calculados para a MP-OM e OM-Livre em células tumorais MDA-MB-231 e 4T1.

Compostos

Substância\Linhagem celular	MDA-MB-231			4T1		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
MP-OM (mg/mL)	1,163	0,713	0,431	0,745	0,603	0,461
OM-LIVRE (mg/mL)	1,882	1,166	3,553	1,114	1,775	4,299

Dados calculados pelo autor a partir da equação formada da linha tendência e valor de R.

Não há relatos da utilização do óleo de macaúba no tratamento de células tumorais em literatura. Ainda assim, essa diminuição na queda da viabilidade celular pode ser explicada a partir da presença de bioativos importantes e com ação de regulação das espécies reativas de oxigênio, como os carotenoides, tocoferóis e ácidos graxos livres presentes no óleo da polpa de macaúba. Esse tipo de atividade tem como aumentar ou eliminar a formação das EROs, que levam ao favorecimento no estresse oxidativo, importante em alguns processos fisiológicos, formados a partir do processo respiratório e outras diversas reações oxidativas que ocorrem no processo aeróbico das células, e são de extrema importância para os seres vivos (YANG *et al.*, 2018; KASHYAP *et al.*, 2019).

Dentre esse grupo, os β -carotenos, molécula mais abundante desse grupo presente no óleo da polpa de macaúba, apresentam resultados já datados em literatura de sua atividade antitumoral. Alguns estudos já se propuseram a analisar a via de atuação dos β -caroteno. Niranjana e colaboradores (2015) indicaram que essa molécula diminuiu significativamente a porcentagem de células BCL-2 e BCL-xL positivas, além de levar a indução da interrupção do ciclo celular na fase G2/M, levando a redução da expressão do regulador-chave dessa etapa, a Ciclina A. Somado a esse, outros estudos demonstraram que a suplementação com β -caroteno levou ao aumento do nível de p53 apoptótico e diminuição do BCL-2 anti-apoptótico em uma linhagens de células de câncer gástrico humano (células AGS) após 24 horas de tratamento. Apesar dessas hipóteses levantadas, não há um consenso em literatura a respeito (JANG *et al.*, 2009; MILANI *et al.*, 2016).

Em trabalho realizado por Glória & colaboradores, a utilização do β -caroteno inibiu a proliferação celular de células de câncer mamárias MDA-MB-231 em mais de 50% a todos os grupos testados, em concentrações que vão de 10 μ M a 0,5 μ M, além de aumentar a apoptose celular das mesmas. Quanto a nanoestruturas com atividade antioxidante, Fazelifar e colaboradores (2020) indicaram a atividade antitumoral de nanoemulsões de *Arachis hypogaea* em células A549, citando a atividade antioxidante dos β -caroteno e compostos fenólicos presentes no óleo. Apesar dos resultados anteriores demonstrarem maior efetividade comparado ao presente trabalho, algumas diferenças podem ser notadas. A primeira delas, é que a porcentagem de carotenoides e tocoferóis presentes na macaúba são menores que os anteriores. Ainda assim, o óleo da polpa da macaúba demonstrou uma redução significativa para as células tumorais.

Os tocoferóis, também presentes no óleo da polpa da macaúba, também possuem estudos significativos para validação de sua atividade. Em um destes Tam e colaboradores (2018) visualizaram uma IC50 de 31 μ M do α -tocoferol em células MDA-MB-231. Outro trabalho, agora realizado por Wei & colaboradores (2019), demonstrou que a alta dose de Metotrexato aumentou a atividade anticâncer em TNBC tratado com α -tocoferol, enquanto a baixa dose desse

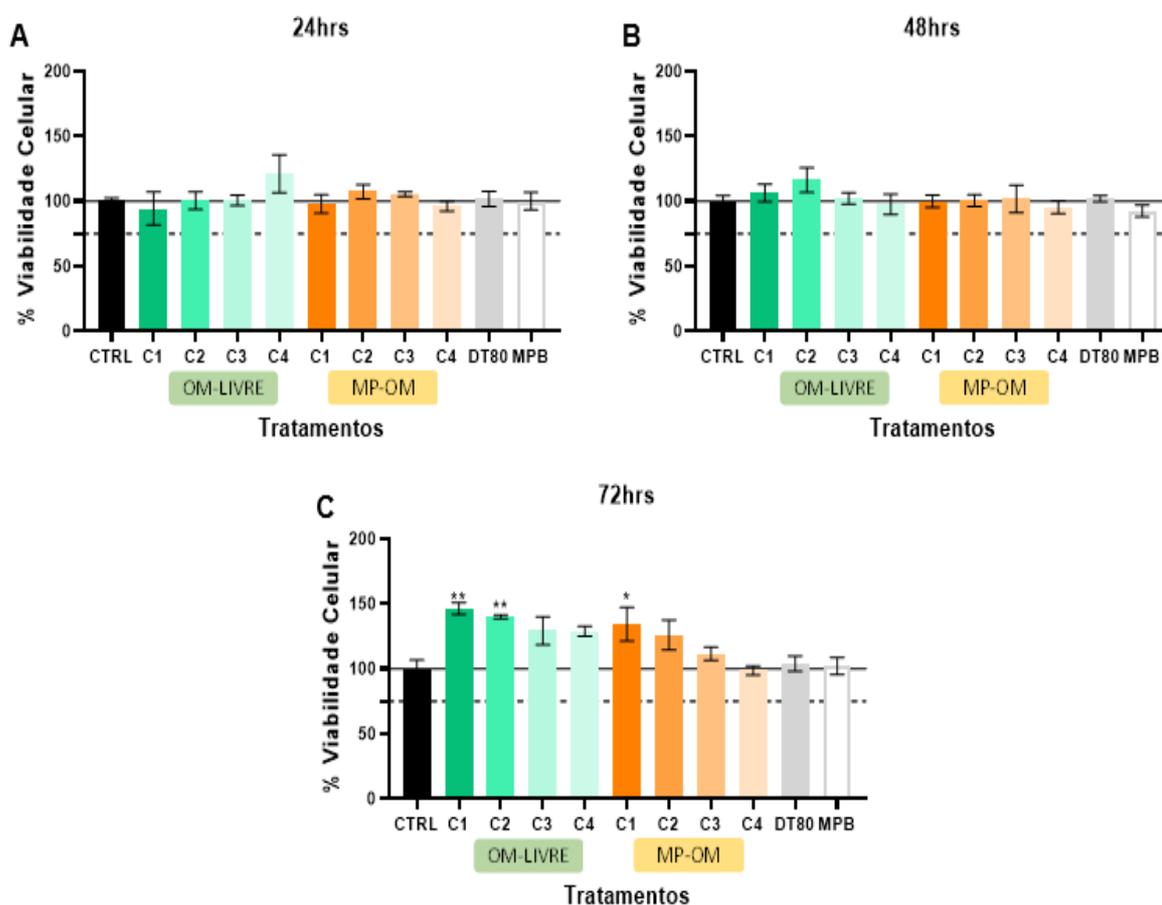
fármaco reduziu a atividade anticâncer em células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 tratados com α -TOS.

Outro fato que chama atenção é a diferença dos resultados entre o óleo de macaúba livre e o encapsulado. Isso pode ser explicado quando ocorre a encapsulação do óleo de macaúba, alterando completamente a via de ação. Acredita-se que o óleo livre pela composição parecida com a membrana celular acabe se tornando um constituinte da mesma. Assim, a função seria exclusivamente de reparação e proteção da membrana celular. Trabalhos anteriores já documentaram o perfil benéfico de regeneração do óleo. Já citado anteriormente, De Oliveira (2016) demonstrou que a associação de óleo de macaúba a nanopartículas lipídicas permitiu o aumento da viabilidade de filtros UV em até 2x mais. Isso se altera quando se utiliza as MP-OM, o que permite a liberação dos ativos, garantindo a atividade citotóxica da micela. Em outro trabalho, Da Silva e colaboradores (2019) também corroboraram com a boa atividade antioxidante *in vitro* dos frutos da *Acrocomia aculeata*, não sendo observado nenhum sinal de citotoxicidade em células LLC-PK1, em concentrações que variaram de 5–500 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo, é possível sugerir que esse aumento significativo da viabilidade da macaúba observado nas concentrações C1, C2 e C3 em 48 horas das células 4T1 é reflexo desse perfil cicatrizante citado anteriormente.

Seguindo essa linha de raciocínio, visando avaliar se a citotoxicidade da MP-OM apresentada em células tumorais seria exclusiva a esse grupo celular, um outro ensaio de citotoxicidade foi realizando em células normais de fibroblasto murino L929. Os resultados, vistos na Figura 18, demonstram que, não só a MP-OM se manteve não tóxica em nenhum dos tempos analisados, como obteve um aumento significativo de $34,38\% \pm 22,4$ na viabilidade celular das células em 72 horas na sua maior concentração. O óleo livre, que anteriormente não apresentou toxicidade, manteve esse perfil comportamental nas células viáveis, como esperávamos. Somado a isso, em 72 horas, nas C1 e C2 houve um aumento significativa da viabilidade celular, de $46,41\% \pm 7,9$ e $39,98\% \pm 2,8$, respectivamente. Outros grupos também apresentaram essa sinalização para o crescimento da viabilidade, mas sem apresentar diferença

significativa, caso das concentrações C3, C4 do óleo livre e C2 e C3 da micela polimérica.

Figura 19. Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de fibroblastos L929 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba em diferentes concentrações por (a) 24 hrs, (b) 48 hrs e (c) 72 hrs.



CTRL: grupo tratado com o veículo; C_{1,2,3,4}: grupo tratado com as concentrações previamente categorizadas; MP-OM: grupo tratado com micelas poliméricas constituídas de Pluronic® F127 e óleo da polpa macaúba; MPB: grupo tratado com micelas poliméricas sem ativo; OM-Livre: grupo tratado com óleo de macaúba em forma livre; DT80: Grupo solução de DMSO (90%) e solução Tween 80 (10%). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (SEM); *aumento significativo de $p < 0.0005$ (ANOVA seguido de Bonferroni); ** aumento significativo de $p < 0.0001$ (ANOVA seguido de Bonferroni).

Esse resultado somado aos encontrados na viabilidade das células MDA-MB-231 e 4T1 indicam um possível potencial de uso da MP-OM em outros ensaios pré-clínicos *in vitro* em busca de complementar o estudo.

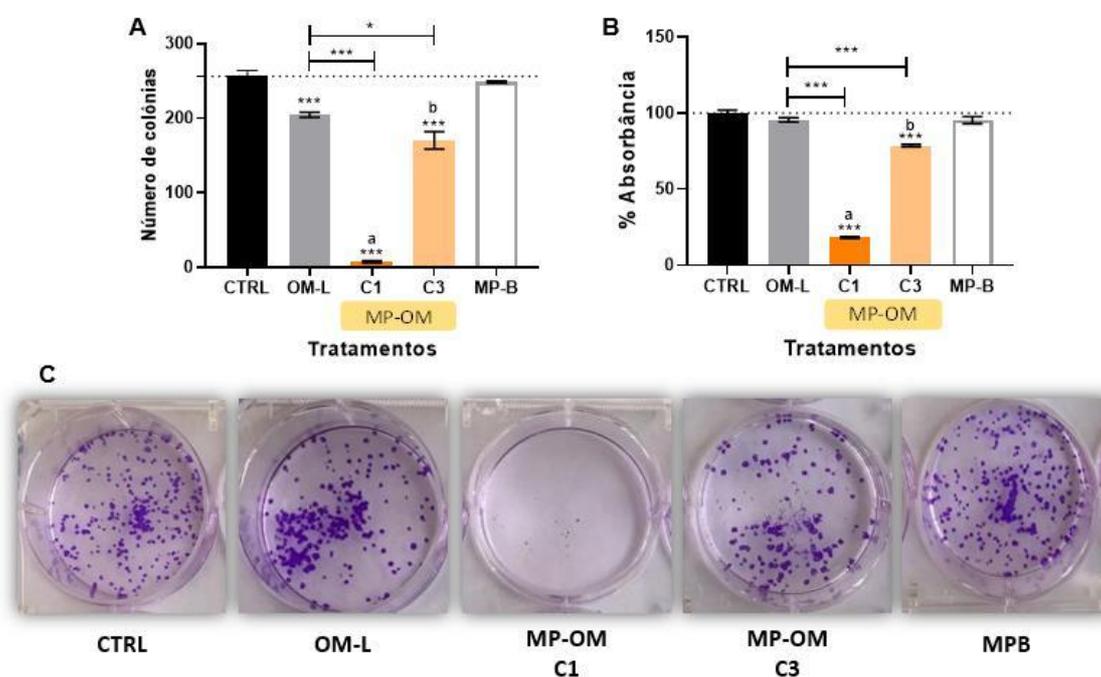
5.3.2 Ensaio de clonogenicidade (proliferação) celular *in vitro*

Uma das possíveis estratégias visadas na busca do tratamento de células tumorais é a prevenção ou retardamento do crescimento dos tumores. Visando esse tipo de abordagem, o ensaio de clonogenicidade foi utilizado para determinar se a MP-OM seria capaz de alterar a formação de colônias da linhagem celular MDA-MB-231.

O grupo controle, que apresentou uma contagem de $256,3 \pm 12,1$ colônias, foi utilizado como comparativo para os tratamentos, sendo assim o valor de absorvância considerado 100%. Como é possível notar na Figura 19, as MP-OM reduziram significativamente a proliferação das células tumorais. Em C1, a contagem de células indicou um valor 97% menor que o grupo controle, de $7,3 \pm 2,5$, enquanto a absorvância, usada como forma de se validar os resultados de contagem, apresentou $18,8\% \pm 1,5$, com uma redução ao controle de 81,9% ($p < 0,001$). Já C3, concentração de valor menor, a redução foi menor, porém manteve uma diferença significativa quando comparado ao controle. A contagem de colônias indicou um valor de $170,3 \pm 20,0$, com redução de proliferação de 30,01%. Já os valores de absorvância desse grupo foram de $78,6\% \pm 2,3$ e 24,4% de inibição.

Somado ao resultado anterior, as micelas poliméricas sem a presença do óleo da polpa de macaúba (MPB) não diferiram significativamente do grupo controle, com valores de $248,7 \pm 2,1$ e 1% de inibição para a contagem de células e $95,4\% \pm 6,9$ para absorvância, com redução de viabilidade de 4,6%. É importante ressaltar que a concentração utilizada de MP-B foi a mesma da maior concentração (C1) de MP-OM, portanto, um claro indicativo que a diferença dos valores apresentados se deve a ação do óleo de macaúba nanoencapsulado em forma de micela polimérica. Quanto ao óleo livre (OM-L), os resultados foram conflitantes. Enquanto a contagem apresentou diferença significativa, com valor de $204,7 \pm 5,5$ e redução de 16,04%, a absorvância ficou bem próxima do encontrado ao grupo controle, com $95,6\% \pm 4,1$ e inibição de apenas 4,4%. Ainda assim, esse resultado foi significativamente maior do que ambos os grupos de MP-OM, tanto para C1, quanto para C3 quando analisada a contagem e absorvância. Esses resultados indicam uma promissor potencial de inibição da proliferação celular causado pelas MP-OM.

Figura 20. Número de colônias (A), % de absorvância (B) e (C) Fotografia representativa dos poços corados com cristal violeta pelo ensaio de clonogenicidade (proliferação) em células de fibroblastos MDA-MB-231 após incubação com MP + óleo de polpa macaúba.



CTRL: grupo tratado com o veículo; C_x: grupo tratado com concentração específica; MP-OM: grupo tratado com micelas poliméricas constituídas de Pluronic® F127 e óleo da polpa macaúba; MPB: grupo tratado com micelas poliméricas sem ativo; OM-Livre: grupo tratado com óleo de macaúba em forma livre solubilizado em DMSO (90%) e solução Tween 80 (10%). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (SEM); *redução significativa de $p < 0.05$; *** redução significativa de $p < 0.0001$; ap <0.0001 diferença entre grupo MP-B e MP-OM C1; bp <0.0001 diferença entre grupo MP-B e MP-OM C3 (ANOVA seguido de Bonferroni).

A explicação da atividade antiproliferativa das micelas poliméricas segue uma linha de raciocínio próxima ao apresentado na citotoxicidade, ou seja, definidos pela presença dos compostos biotípicos presentes na macaúba. No caso dos carotenóides, a ação inibitória desses compostos no crescimento do tumor pode estar relacionada à sua capacidade de interferir em diferentes vias de sinalização celular que regulam a proliferação, crescimento, diferenciação e morte celular. Visando esse tipo de atividade, Moccia e colaboradores (2020) demonstraram que concentrações de extrato de abóbora enriquecido com

carotenóides foi capaz de retardar em 40% a proliferação celular em uma linhagem de leucemia linfocítica crônica humana através da modulação do fluxo autofágico. Essa atividade, segundo os autores, pode estar associada com a superexpressão de p27Kip1, ativação de AMPK e modulação de autofagia, levando a inibição do crescimento desse tipo de linhagem *in vitro*.

Em outro trabalho, pesquisadores visaram avaliar o mecanismo antiproliferativo de duas variedades de bagas de goji (*Lycium spp.*), que foram investigados em um período de tempo de 72h. Para uma inibição de 50% da proliferação, os compostos precisaram de uma dose de $4,08 \pm 0,09$ mg/mL de *Lycium ruthenicum* Murr. (LRM), e de $17,86 \pm 1,77$ mg/mL para a *Lycium barbarum* L. (LB), bem mais alto o que a dose que utilizamos da MP-OM no presente trabalho. Essa diferença entre as espécies de goji pode ser explicada pelo maior perfil antioxidante da LRM, que, segundo os resultados apresentados pelos autores, chega a ser 2,4 vezes maior que o da LB, resultado da diferença dos perfis de carotenóides presentes em cada espécie (XIONG *et al.*, 2021).

Jayaprakasha e colaboradores (2019) demonstraram atividade antiproliferativa de 65% em concentração de 25 µg/mL, e 80% em concentração 100 µg/mL em amostras de cenoura BetaSweet contra células mamárias de cancer de mama MCF-7 no tempo de 96 horas. Esse alimento apresentou cerca de pelo menos 15 compostos fenolicos, além de carotenoides e outros tocofenóis, o que explica a atividade.

Já bem definido como um bom inibidor da atividade proliferativa de células tumorais TNBC, o Resveratrol (RES) aparece com resultados bem parecidos com o que demonstramos com a nossa MP-OM. Em estudo realizado por Horgan e colaboradores (2019) após 7 dias, células MDA-MB-231 e MCF-7 apresentaram ligeira queda da proliferação de analogos, exibindo uma relação dependente da dose versus os efeitos inibidores do crescimento que o resveratrol e compostos relacionados podem exibir, com doses >20 µM mais comumente associadas aos efeitos de proliferação. Outros trabalhos também apresentaram bons resultados na inibição da proliferação. Em um deles, pelo período de tempo de 17 dias, a concentração de 100 µM de RES inibiu significativamente a capacidade de proliferação em células MDA-MB-231 em 100%. Em outro trabalho, a concentração de 64 µM demonstrou inibição

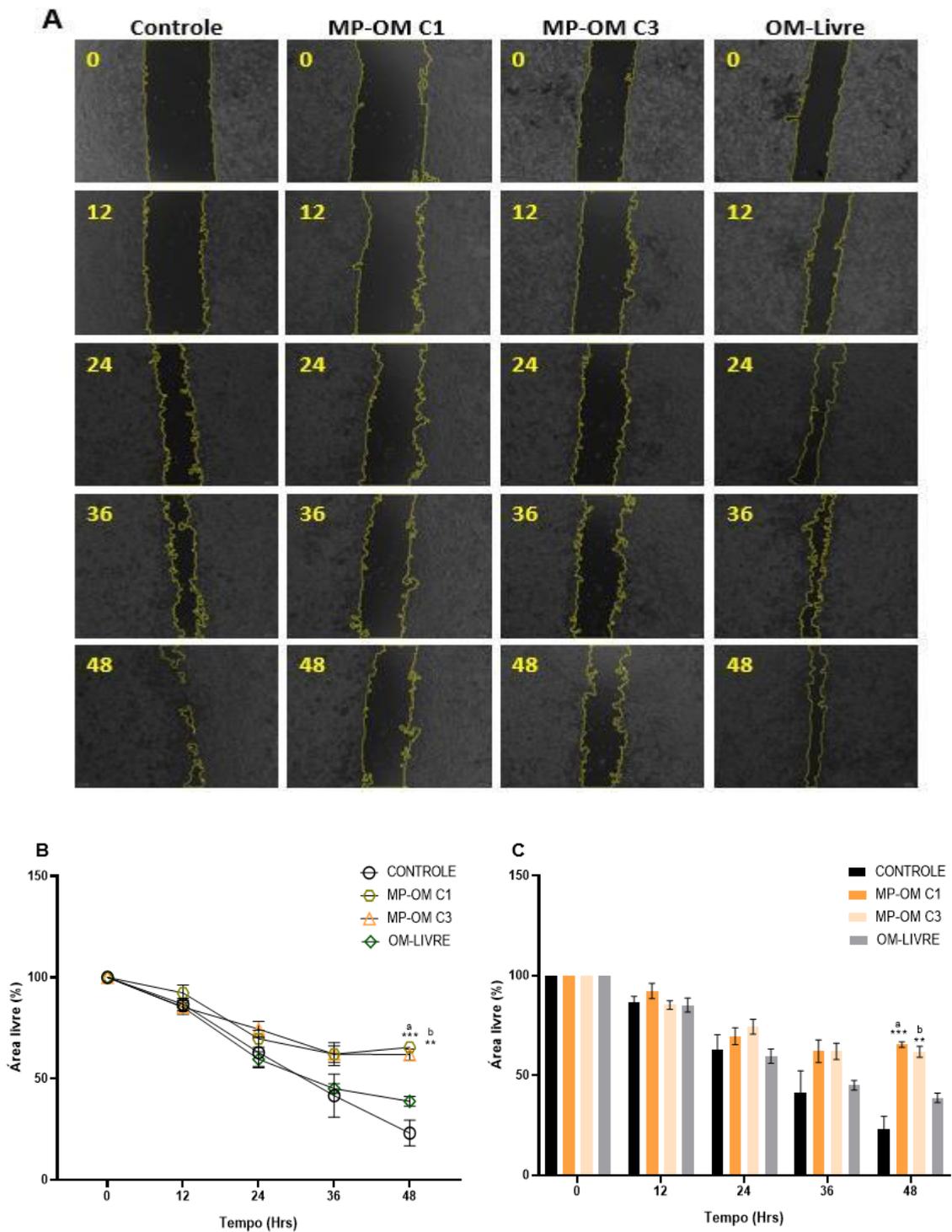
moderada, de aproximadamente 20% comparado ao grupo controle. Porém, quando associada a ceramida, a inibição do composto aumentou para 90%, indicando uma boa associação com tal composto (DOLFINI *et al.*, 2006; SPROUSE e HERBERT, 2014).

Os resultados do ensaio clonogenico, associado ao apresentado na citotoxicidade de MTT indicam um bom perfil antiproliferativo da MP-OM. Comparado ainda com os resultados em literatura de compostos conhecidos pela sua atividade e efeitos adversos, como o Resveratrol, a baixa citotoxicidade em células saudáveis da associação de micelas com o óleo da polpa do óleo de macaúba é um bom indicativo para o seu uso potencial no tratamento do cancer.

5.3.3 Ensaio de avaliação da migração celular *in vitro* por *Wound Healing*

Além dos potenciais antiproliferativo e citotóxico, o presente trabalho também visou avaliar se a MP-OM e o OM-Livre possuíam algum tipo de atividade antimigratória. Os nossos estudos demonstraram que, em células tratadas com concentrações de 0,386 µg/mL (C1) e 0,0965 µg/ml (C3) a cicatrização da área livre foi significativamente diminuída após 48h de tratamento em comparação ao grupo controle. Nesses grupos, a % de área livre para C1 e C3 foram de 65,46% ± 2,4 e 61,86% ± 4,7, respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou 23,14% ± 12,7 da área não preenchida por células, como demonstrado na Figura 20b e Figura 20c.

Figura 21. Resultados do ensaio de migração (*wound healing*) de células MDA-MB-231 após tratamento simulado de MP-OM e OM-Livre.



(A) Fotografia dos poços com células tratadas pelo microscópio invertido Olympus, (B) porcentagem da área livre dos tratamentos em gráfico de linha, e (C) porcentagem da área livre dos tratamentos em gráfico de coluna. Tempos de incubação: 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, n = 3. Controle: grupo tratado com o veículo; C_x: grupo tratado com concentração específica; MP-OM:

grupo tratado com micelas poliméricas constituídas de Pluronic® F127 e óleo da polpa macaúba; OM-Livre: grupo tratado com óleo de macaúba em forma livre solubilizado em DMSO (90%) e solução Tween 80 (10%). O cálculo das imagens foi realizado a partir do programa Image J. *** p <0,0001 diferença de MP-OM C1 para grupo controle; ** p <0,0001 diferença de MP-OM C3 para grupo controle; ap <0,001 diferença de grupo MP-OM C1 para grupo OM-Livre; bp >0,001 diferença de MP-OM C3 para grupo OM-Livre (One-way ANOVA média + SEM seguido por teste de Bonferroni).

Uma diferença significativa também foi observada quando comparado os grupos de tratamento de MP-OM com o óleo livre (OM-Livre), que apresentou um valor de área não migrada de 38,82% ± 4,1. Quando comparado com o grupo controle, o OM-Livre não apresentou diferença significativa, indicando assim, que o possível efeito antimigratório do óleo foi adquirido a partir do seu aprisionamento em micela, possibilitando o mesmo de exercer sua atividade.

Como dito anteriormente, o grupo micelar sem o óleo (MPB) possui apenas o Pluronic® F127 como constituinte. Trabalhos em literatura já demonstraram que esse composto não alterou significativamente o perfil migratório de células tumorais, sendo assim possível aferir que essa provável atividade antimigratória encontrada pelo nosso trabalho vem do óleo de polpa da macaúba encapsulada (SUN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2020).

Os tempos de 12h, 24h e 36h não apresentarem diferença significativa entre os grupos. Os valores de média e desvio de cada tempo e tratamento podem ser visualizados na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Porcentagem de área livre do ensaio de migração *wound healing* em células MDA-MB-231.

Tempo/Grupo	CONTROLE	MP-OM C1	MP-OM C3	OM-LIVRE
12h	86,7±5,9	92,3±6,7	85,3±3,6	85,2±6,1
24h	62,9±15,0	69,6±7,3	74,5±6,4	59,6±6,3
36h	41,6±21,3	62,1±9,8	62,1±7,1	45,1±4,2
48h	23,1±12,7	65,5±2,4	61,9±4,7	38,8±4,1

Todos os valores estão em porcentagem (%) e representam média ± DP (n=3) (FONTE: Elaborado pelo autor, 2020).

O perfil anti-migratório observado para o tratamento das células com micela polimérica contendo óleo de polpa da macaúba, pode ter relação com a presença de compostos fenólicos e carotenoides em sua constituição. Estudos clínicos com pacientes com câncer de mama demonstraram uma correlação inversamente proporcional entre o câncer metastático em estágio III com as alterações metabólicas e diminuição das concentrações séricas de beta-caroteno e de vitamina A. Apesar dessa correlação já datada, o mecanismo de ação desses constituintes ainda não é conclusivo para a comunidade acadêmica. Niranjana e colaboradores (2015) propuseram que os β -carotenos levaram a redução da expressão do fator 1α indutível por hipóxia, um regulador de metástase bem conhecido, atenuando a capacidade migratória e invasiva de células de neuroblastoma maligno (ou seja, efeito de antimetástase). Em outro trabalho, esse carotenoide foi associado a regulação do NF- κ B, que age como fator transcrição pró-inflamatório que promove o desenvolvimento de câncer de mama invasivo, se ligando à região do promotor de BCL-xL e BCL-2 (CATZ, JOHNSON, 2001; ROSA *et al.*, 2019; PARK, BROWN, KIM, 2020).

A dúvida quanto a ação metastática dos compostos fenólicos também é inconclusiva. Seu mecanismo de ação possui como alvo múltiplas vias de sinalização que regulam processos celulares importantes, como proliferação, apoptose e diferenciação. No caso da metástase, uma regulação negativa foi observada em fatores de transcrição como NF- κ B, NRF2 e STATs e fatores angiogênicos VEGF, FGFR1 e MIC-1 (ANANTHARAJU *et al.*, 2016; AVTANSKI, PORETSKY, 2018).

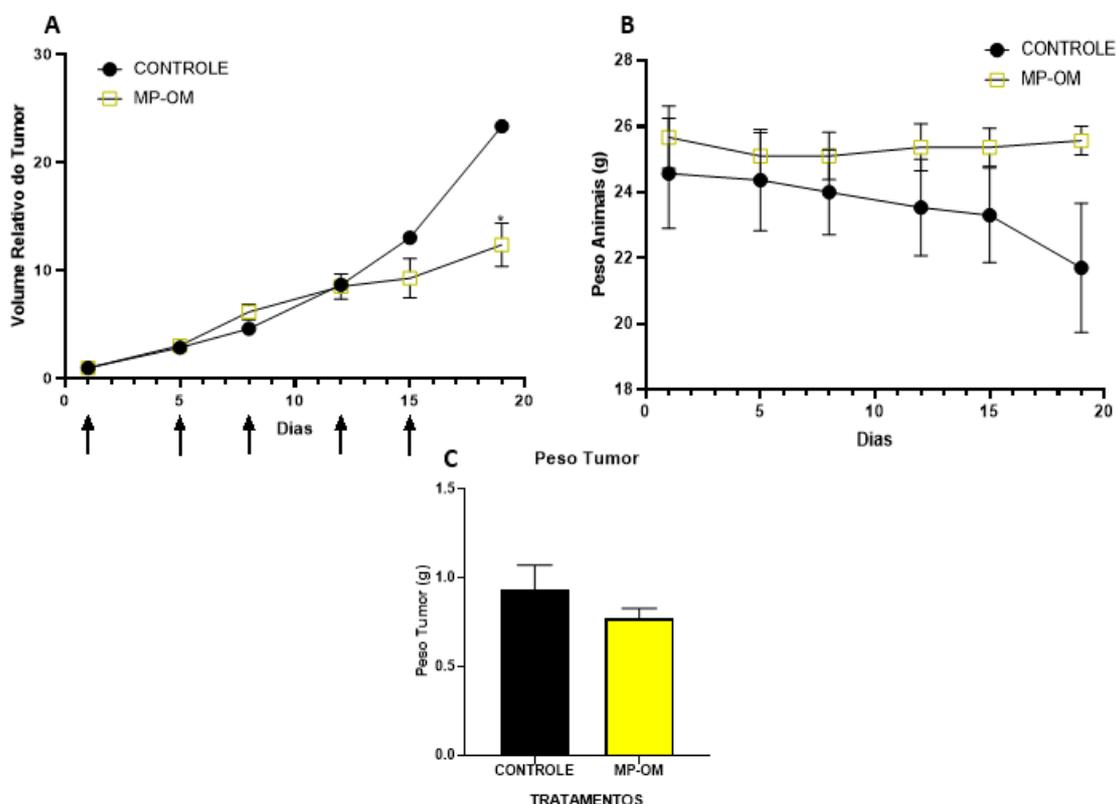
5.4 EFICÁCIA DE INIBIÇÃO DE TUMOR *IN VIVO*

No intuito de avaliar o tratamento de camundongos Balb/c carregando tumor de mama com a MP-OM, a atividade *in vivo* antitumoral foi avaliada. De forma notável, houve redução significativa no volume do tumor no 19° dia de tratamento (Figura 21a) quando comparados ao grupo controle tratado com salina. Apesar disso, é possível ver uma diferença significativa a partir do 15° dia. Ademais, nenhuma perda de peso corporal significativa foi observada durante o tratamento, apesar de uma queda no 19° dia para o grupo controle

(Figura 21b). Somado a isso foi possível verificar diferença significativa entre os grupos quanto ao peso dos animais.

No 19° dia os animais foram eutanasiados e o tumor foi pesado em uma balança analítica. Como possível observar na Figura 21c, não foi observado diferença significativa entre os grupos, apesar do grupo MP-OM aparecer menor que o grupo controle.

Figura 22. Volume tumoral relativo, peso do tumor e variação de peso de camundongos Balb/c portadores de tumor de mama.



Camundongos com tumor de mama foram tratados com HNPs-siVEGF nos dias 1, 5, 8, 10, 12 e 15. (A) O volume relativo ao tumor, (B) a variação do peso corporal durante o tratamento foi monitorada por 19 dias e (C) peso do tumor retirado após a eutanásia dos animais no 19° dia. As setas no eixo x da imagem A indicam os dias da injeção. Círculos fechados são os grupos tratados com solução salina estéril e os quadrados abertos representam os tratados com MP-OM (n = 4). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Teste t de Student por dia de tratamento. * p < 0,05, quando comparado ao grupo controle.

É sempre importante ressaltar que os efeitos observados *in vitro* nem sempre podem ser extrapolados para modelos *in vivo*, sendo sempre necessário estudar a atividade de qualquer composto avaliado em sistemas biológicos completos (CHAGAS; AGOSTINI, 2012). Os resultados *in vivo* confirmam o potencial antitumoral da MP-OM encontrado nos resultados anteriores dos ensaios de citotoxicidade (MTT) e clonogênico.

A utilização da macaúba como elemento principal no tratamento de câncer de mama triplo negativo não é encontrada em literatura. Em outros tipos de tratamento, essa espécie é comumente relatada por sua ação antiinflamatória, antidiabética e diurética, porém, mesmo assim, os trabalhos em literatura ainda são poucos para o grande potencial que a *Acrocomia aculeata*, em geral, possui (NUNES *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2020).

Em outro direcionamento, Magosso e colaboradores (2016) buscaram avaliar os potenciais antígeno-tóxico, antimutagênico, imunomodulador e apoptótico dos óleos da polpa e da amêndoa da macaúba isoladamente e em combinação com o agente antitumoral ciclofosfamida em camundongos machos Swiss, com concentrações de 3,15 e 30 mg/kg por gavagem em pré, pós, e tratamento simultâneo. Ao final do experimento, os autores sugeriram que ambos os óleos foram quimiopreventivos em todas as doses, além de não apresentarem nenhum tipo de comportamento genotóxico e mutagênico, sendo promissor na composição de alimentação funcional e nutracêutica. Porém, quando associada a ciclofosfamida, os resultados apresentaram uma diminuição da eficiência mutagênica e apoptótica do fármaco, não sendo recomendada como tratamento adjuvante nesse caso.

Diferente do experimento realizado por Magosso, que optou na utilização do tratamento por gavagem, nosso trabalho optou pela administração da formulação testada via intravenosa, escolha comum quando há a utilização de tratamentos oncológicos com micelas poliméricas. Esse tipo de escolha se deve ao seu tamanho adequado, que garante que as micelas (estruturas supramoleculares) sejam muito grandes para extravasamento das paredes normais dos vasos e excreção renal, mas pequenas o suficiente para extravasamento dos vasos sanguíneos tumorais. Assim, a combinação das características fisiopatológicas dos tecidos tumorais sólidos com as

características físico-químicas das micelas, garantem o direcionamento do ativo pela via endovenosa ao tecido alvo. Além disso, a utilização do óleo livre pela via endovenosa deve ser evitada, já que há risco de morte súbita devido ao entupimento dos vasos ocasionados pelo óleo livre (GONG *et al.*, 2012; AMJAD *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2021).

A redução do volume tumoral observado em nosso estudo é provavelmente oriunda da presença dos compostos fenólicos e carotenoides encontrados no óleo da polpa da macaúba e sua ação na regulação das espécies reativas de oxigênio (YANG *et al.*, 2018; KASHYAP *et al.*, 2019). Tais compostos em conjunto podem determinar uma taxa de crescimento tumoral reduzida, comparada ao controle.

Fernandes e colaboradores (2018) observaram que a associação entre um análogo do α -tocoferol e a doxorubicina encapsulados em nanocarreadores lipídicos levou a um aumento da eficácia antitumoral em camundongos com câncer de mama. Esse aumento, segundo os estudos de biodistribuição realizado, é resultado do aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo, associado com maior permeabilidade e efeito de retenção (efeito EPR), contribuindo para o maior acúmulo dessas nanopartículas no tumor. Dessa forma, segundo os autores, a o longo período de circulação permitiu que mais da nanopartícula se direcionassem para a área do tumor, o que permitiu maior acumulação da nanopartícula.

A maior taxa de acumulação tumoral observada por Fernandes e colaboradores pode ser uma das razões que levou, em nosso trabalho, a observar diferença significativa entre os dois grupos apenas no 19° dia de tratamento, já que a estrutura micelar teoricamente permitiria ao óleo ficar mais tempo em circulação, acumulando aos poucos na região tumoral. Este fato necessita ser comprovado em futuros ensaios de farmacocinética para MP-OM.

Outra razão que pode explicar esse longo tempo é a imunosenescência dos camundongos utilizados no nosso experimento. As alterações nas funções das células dendríticas, células linfócitos T, e células NK já foram documentadas em literatura e podem alterar a resposta imune dos indivíduos (PAULA *et al.*, 2008).

Ainda assim, nosso trabalho demonstrou uma diminuição no volume relativo do tumor nos camundongos. Esse resultado entra em acordo com os anteriormente vistos *in vitro*. Dessa forma, mais testes a respeito dessa atividade aparecem como sendo um potencial promissor na avaliação e confirmação da atividade antitumoral do óleo de polpa de macaúba encapsulado na forma de micela polimérica.

5.5 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Os parâmetros hematológicos foram determinados quantitativamente para avaliar a toxicidade resultante da aplicação endovenosa da MP-OM. Na Tabela 8 é possível observar apenas um pequeno aumento significativo de 3,53% no valor de Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHMC) grupo tratado. Nos outros parâmetros, nenhuma diferença foi observada entre os grupos de tratamento.

Tabela 8. Parâmetros hematológicos de camundongos tratados por via intravenosa com MP-OM.

	Controle	MP-OM
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	6,83 \pm 0,6	5,56 \pm 0,3
Hematócritos (%)	30,1 \pm 2,6	24,23 \pm 1,2
Hemoglobina g/dL	10,47 \pm 0,8	8,73 \pm 0,4
HCT (fL)	44,03 \pm 0,2	43,61 \pm 0,3
CHMC (%)	34,83 \pm 0,4	36,06 \pm 0,2*
Mielócitos (%)	0 \pm 0	0 \pm 0
Metamielócitos (%)	0 \pm 0	0 \pm 0
Bastonetes (%)	5,0 \pm 1,5	6 \pm 1,1
Neutrófilos Segmentados (%)	82,66 \pm 3,4	80 \pm 3,0
Linfócitos (%)	10,33 \pm 5,4	13,33 \pm 3,5
Monócitos (%)	1,33 \pm 0,7	0,66 \pm 0,7
Eosinófilos (%)	0,67 \pm 0,3	0 \pm 0
Basófilos (%)	0 \pm 0	0 \pm 0
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	407.666 \pm 130.118	404.333 \pm 80.385
Proteínas plasmáticas (g/dL)	5,53 \pm 0,4	5 \pm 0,3

VMC: volume corpuscular médio; CHMC: concentração média de hemoglobina corpuscular.

Valores expressos como média \pm SEM (n = 3).

Os resultados anteriores mostraram que não há um efeito hematológico tóxico causado pela administração da MP-OM. A pequena alteração vista no

MCHC não reflete as alterações clínicas causadas pelo tratamento. Em geral, os valores apresentados no leucograma e no eritograma demonstraram ser comuns a animais que tiveram a inoculação de células tumorais de mama, diferindo significativamente apenas no valor dos linfócitos. Essa variação pode ser explicada pela idade dos camundongos utilizados no presente experimento, que estavam em idade mais avançada aos valores de referência utilizados (SOUZA *et al.*, 2021).

Traesel e colaboradores (2014) já haviam avaliado a toxicidade da polpa do óleo de macaúba livre por meio de testes de toxicidade aguda e subaguda em ratos Wistar machos e fêmeas. Através de um tratamento por gavagem, em concentrações que variavam entre 125 e 2000 mg/kg, os resultados indicaram que o óleo não produziu nenhum tipo de alteração significativa nos parâmetros hematológicos, bioquímicos ou histopatológicos dos animais expostos, demonstrando que a macaúba possui segurança suficiente para seu uso em humanos.

Desse modo, o presente trabalho demonstra que, mesmo após a encapsulação do óleo da polpa na forma de micela polimérica a macaúba mantém o perfil não tóxico. No entanto, outros experimentos são necessários para confirmar de maneira mais robusta essa característica das MP-OM, principalmente dentro de um estudo de longo prazo após administrações sucessivas, e com uma amostragem maior que a utilizada em nosso experimento (n = 3).

5.6 ENSAIO ANTIPROLIFERATIVO (CLONOGENICIDADE) *EX VIVO*

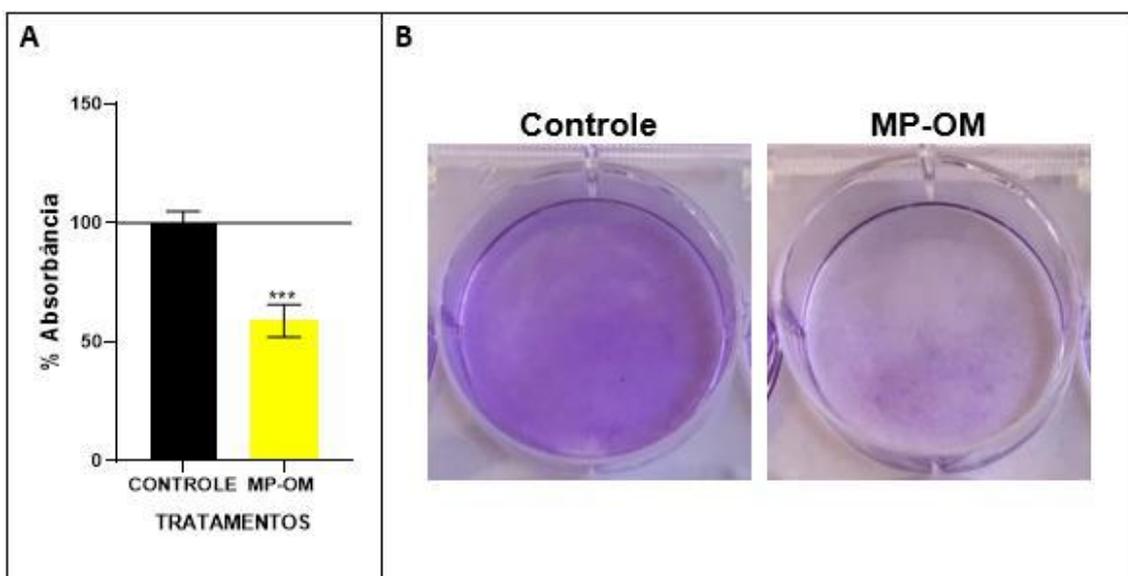
O ensaio de clonogenicidade *ex vivo* permite avaliar a proliferação de células tumorais que migraram dos sítios primários para a região da medula do animal, comum quando há algum tipo de metástase. A medula é um dos principais locais de metástase nos modelos de tumor triplo negativo do câncer de mama.

Células tumorais naturalmente formam colônias, a fim de se criar um ambiente adequado para sua proliferação. Esse método *ex vivo* permite o

desenvolvimento dessas colônias. Apesar da região ser comum de se encontrar macrófagos e outros tipos celulares, a falta de sinalização faz com que esses grupos não sobrevivam sem estar no microambiente tumoral (FIEBIG, MAIER, BURGER, 2004; MARTINS et al., 2016). Essas características, somadas a facilidade da sua extração, foram os motivos que motivaram a realização desse experimento.

Os resultados indicaram uma diferença significativa entre o grupo controle e a MP-OM de 41,07% (Figura 22a), com visível diferença de coloração entre os poços dos dois grupos, como demonstrado na Figura 22b.

Figura 23. Porcentagem de absorbância (A) pelo ensaio de clonogenicidade (proliferação) feito a partir do *flushing* da medula óssea de camundongos Balb/c o tratamento com MP-OM. Foto representativa dos grupos tratados (B).



Controle: grupo tratado com solução salina; MP-OM: grupo tratado com micelas poliméricas constituídas de Pluronic® F127 e óleo da polpa macaúba; Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. *** redução significativa de $p < 0.0001$ (ANOVA seguido de Bonferroni).

De maneira geral, esse resultado corrobora com o perfil antiproliferativo e anti-migratório observados *in vitro* nesse mesmo trabalho e, coletivamente, sugerem que o óleo de macaúba tem um grande potencial de inibição dessas atividades comumente presentes no BCNT. Em conjunto, percebe-se que o

tratamento de animais com tumor de mama triplo negativo, com MP-OM resulta em perfil anti-metastático pronunciado, e que pode ser explorado em futuros ensaios.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conforme foram observados nos resultados, o processo de preparo utilizado em nosso trabalho foi capaz de produzir micelas poliméricas com óleo da polpa de macaúba encapsulado estáveis em associação ao Pluronic® F127. Essa nanopartícula demonstrou bons resultados para o tamanho (menor que 200 nm), potencial Zeta (negativo), Pdl (≤ 0.2) e eficiência de encapsulação para aplicação terapêutica. Também foi possível caracterizar os ácidos graxos presentes na amostra, além de quantificar a presença dos carotenoides totais, compostos fenólicos e, conseqüentemente, a atividade antioxidante da amostra de óleo de polpa da macaúba.

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o tratamento com MP-OM foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade de células de câncer de mama triplo-negativo humana e animal. Corroborando o resultado, houve a inibição da proliferação e migração das células de câncer. Desta forma, as micelas foram capazes de modular a atividade do óleo para maior toxicidade às células de câncer, ao contrário de sua forma livre. Além disso, o ensaio de viabilidade permitiu visualizar uma boa tolerabilidade em linhagens de fibroblasto às micelas, indicando a sua provável não citotoxicidade em células saudáveis. O teste *in vivo* em camundongos BALB/c comprovou a eficiência da MP-OM e demonstrou que as mesmas são possivelmente capazes de inibir o crescimento de tumores de câncer de mama triplo-negativo.

Diante dos fatores apresentados, consideramos que o carreador desenvolvido é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos para esse tipo tumoral. Ademais, outros ensaios deverão ser realizados a fim de avaliar parâmetros relativos à formulação testada para se garantir a eficácia e segurança.

A utilização de amostras frescas da macaúba para incorporação em micelas aliada a caracterização química de moléculas presentes no óleo, é uma alternativa a ser estudada. Além disto, sugere-se a avaliação da forma de internalização em células tumorais e de estudos de via de ação, como PCR de genes envolvidos. Ensaio *in vivo* com maior amostragem de camundongos e a avaliação farmacocinética da MP-OM devem ser exploradas mais a fundo.

De forma geral, o trabalho apresenta novas atividades do óleo de polpa de macaúba, obtidas através do uso de nanotecnologia. A formulação desenvolvida se apresenta como promissora para redução do crescimento tumoral e com possível ação anti-metastática, observada pela significativa redução de migração das células de câncer. Os resultados agregam valor terapêutico ao óleo de macaúba, e ampliam as perspectivas de sua utilização.

REFERÊNCIAS

- ABREUS, I. S.; CARVALHO, C.R.; CARVALHO, G.M.A.; MOTOIKE, S.Y. First karyotype, DNA C value and AT/GC base composition of macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) a promising plant for biodiesel production. **Aust J Bot.** v. 59, n. 2, p. 149 – 155, 2011.
- ACS. American Cancer Society. Treatment types. **Disponível em:** <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. 2018. Acesso em: 10 jul. 2020.
- AHMAD, K. A.; YUAN, D. Y.; NAWAZ, W.; ZE, H.; ZHUO, C. X.; TALAL, B.; TALEB, A.; MAIS, E.; QILONG, D. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. **Free Radical Research**, p.1 – 12, 2017.
- AKASH, M. S. H.; REHMAN, K. Recent progress in biomedical applications of pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. **Journal of Controlled Release**, n. 209, p. 120–138, 2015.
- ALEXANDER A.; AJAZUDDIN; KHAN, J.; SARAF, S.; SARAF S. Poly(ethylene glycol)-poly(lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 715 – 729, 2013.
- ALMEIDA, M., MAGALHÃES, M., VEIGA, F., FIGUEIRAS, A. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. **Journal of Polymer Research**. v. 25, n. 31, p. 1 – 14, 2017.
- AMJAD, M. W.; KESHARWANI, P.; AMIN, M. C. I. M.; IYER, A. K. Recent advances in the design, development, and targeting mechanisms of polymeric micelles for delivery of siRNA in cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v.64, p.154 – 181, 2017.
- ANANTHARAJU, P. G.; GOWDA, P. C.; VIMALAMBIKE, M. G.; MADHUNAPANTULA, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v.15, n.99, p.1 – 16, 2016.
- ANDRADE, A. C.; MARINHO, J. F. U.; DE SOUZA, A. C.; TAVARES, T. D.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; NUNES, C. A.; BASTOS, S. C. Prebiotic potential of pulp and kernel cake from Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and Macaúba palm fruits (*Acrocomia aculeata*). **Food Research International**, v.136, p.1 – 9, 2020.
- ARENA, A. C.; JORGE, B. C.; SILVA, M. C.; BARROS, A. L.; FERNANDES, A. A. H.; NÓBREGA, R. H.; MARTINEZ, E. R. M.; CARDOSO, C. A. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; MUZZI, R. M. *Acrocomia aculeata* oil: Beneficial effects on cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. **Andrologia**. v.50, n.6, p.1 – 11, 2018.
- AVTANSKI, D.; PORETSKY, L. Phyto-polyphenols as potential inhibitors of breast cancer metastasis. **Molecular Medicine**, v.24, n.29, p.1 – 17, 2018.

BATRAKOVA, E.V., KABANOV, A.V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**. v.130, n.2, p.98 – 106, 2008.

BAZZO, B. R.; CARVALHO, L. M. D.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G.; COLOMBO, C. A. Development of novel EST-SSR markers in the macaúba palm (*Acrocomia aculeata*) using transcriptome sequencing and cross-species transferability in Areaceae species. **BMC Plant Biology**. v.18, n.276, p.1 – 10, 2018.

BHATTACHARYA, S.; GHOSH, A.; MAITI, S.; AHIR, M.; DEBNATH, G. H.; GUPTA, P.; BHATTACHARJEE, M.; GHOSH, S.; CHATTOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, P.; AHNIKARY, A. Delivery of thymoquinone through hyaluronic acid-decorated mixed Pluronic® nanoparticles to attenuate angiogenesis and metastasis of triple-negative breast cancer. **Journal Of Controlled Release**, v.322, p.357 – 374, 2020.

BLOWS, F. M.; DRIVER, K. E.; SCHMIDT, M. K.; BROEKS, A.; VAN LEEUWEN, F. E.; WESSELING, J. CHEANG, M. C.; GELMON, K.; NIELSEN, T. O.; BLOMQUIST, C.; HEIKKILÄ, P.; HEIKKINEN, T.; NEVANLINNA, H.; HUNTSMAN, D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short- and long-term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **Plos Medicine**, v.7, n.5, p.1 – 12, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

CALLEGARI, F. C.; CREN, E. C.; ANDRADE, M. H. C. Perspectivas da utilização dos óleos da macaúba (*Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Ex mart) no desenvolvimento de cosméticos. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 19-22 out. 2014, Florianópolis. **Disponível em:** <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0790-23843-177716.pdf>

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. A situação do câncer de mama no Brasil: Síntese de dados dos sistemas de informação. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf. Acesso em: 20 jan. de 2021.

BRAY F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: **A cancer Journal for Clinicians**. v.68, n.6, p.394 – 424, 2018.

BERTRAM, J. S. Dietary carotenoids, connexins and cancer: what is the connection? **Biochemical Society Transactions**. v.32, n.6, p.985 – 989, 2004.

- CAI, Y.; SUN, Z.; FANG, X.; FANG, X.; XIAO, F.; WANG, Y.; CHEN, M. Synthesis, characterization and anti-cancer activity of Pluronic F68–curcumin conjugate micelles. **Drug Delivery**. v.23, n.7, p.2587 – 2595, 2016.
- CATZ, S. D.; JOHNSON, J. L. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor κ B and its significance in prostate cancer. **Oncogene**, v.20, p.7342 – 7351, 2001.
- CAVALCANTE, I. G. **Copolímeros em Bloco para Administração de Fármacos Hidrofóbicos: Caracterização, Solubilização e Liberação**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2009.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; SILVA, P. R.; ROSA, T. S.; MOURA, N. M. L.; SANTOS, B. C. P.; CARVALHO, D. B.; SOUSA, J. S.; CARVALHINHO, M. T. J. E.; CASTRO, A. M.; FREIRE, D. M. G. Methods to prevent acidification of Macaúba (*Acrocomia aculeata*) fruit pulp oil: A promising oil for producing biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v.77, p.703 – 707, 2015.
- CHAFFER, C. L.; BRUECKMANN, I.; SCHEEL, C.; KAESTLI, A.J.; WIGGINS, P. A.; RODRIGUES, L. O.; BROOKS, M.; REINHARDT, F.; SU, Y.; POLYAK, K.; ARENDT, L. M.; KUPERWASSER, C.; BIERIE, B.; WEINBERG, R. A. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. **PNAS**, v.108, n.19, p.7950 – 7955, 2011.
- CHIAPPETTA, D. A.; SOSNIK, A. Poly (ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, n.3, p.303 – 317, 2007.
- CLEELAND, C. S.; ALLEN, J. D.; ROBERTS, S. A.; BRELL, J. M.; GIRALT, S. A.; KHAKOO, A. Y.; KIRCH, R. A.; KWITKOWSKI, V. E.; LIAO, Z.; SKILLINGS, J. Reducing the toxicity of cancer therapy: recognizing needs, taking action. **Clinical Oncology**. v.9, p.471 – 478, 2012.
- COELHO, M. R. G.; GOMES, A. de S. Síntese de copolímeros em bloco com propriedades líquido cristalinas. **Química Nova**, v.30, n.3, p.636 – 643, 2007.
- COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Fatty acids and bioactive compounds of the pulps and kernels of Brazilian palm species, guariroba (*Syagrus oleraces*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*). **Science of Food and Agriculture**, v.92, n.3, p.679 – 684, 2012.
- COLLIGNON, J.; LOUSBERG, L.; SCHROEDER, H.; JERUSALEM, G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v.8, p.93 – 107, 2016.
- COLOMBO, C. A.; BERTON, L. H. C.; DIAZ, B. G.; FERRARI, R. A. Macauba: a promising tropical palm for the production of vegetable oil. **OCL**, v.25, n.1, p.1 – 9, 2018.

- COSTA, G. L. A.; BUCCINI, D. F.; ARRUDA, A. L. A.; FAVARO, S. P.; MORENO, S. E. Phytochemical profile, anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. pulp oil. **Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.1 – 9, 2020.
- CRISCITIELLO, C.; AZIM JR, H. A.; SCHOUTEN, P. C.; LINN, S. C.; SOTIRIOU, C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. **Annals of Oncology**, v.23, n.6, p.13 – 18, 2012.
- DARIO, M. F.; OLIVEIRA, F. F.; MARINS, D. S. S.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; LOBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Synergistic photoprotective activity of nanocarrier containing oil of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex. Martius— Arecaceae. **Industrial Crops & Products**. v.112, p.305 – 312, 2018.
- DA SILVA, M. T. S. **Encapsulamento de aromas em micropartículas poliméricas naturais**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.
- DA SILVA, P. V.; RAMIRO, M. M.; IRIGUCHI, E. K. K.; CORRÊA, W. A.; LOWE, J.; CARDOSO, C. A. L.; ARENA, A. C.; KASSUYA, C. A. L.; MUZZI, R. M. Antidiabetic, cytotoxic and antioxidant activities of oil extracted from *Acrocomia aculeata* Pulp. **Natural Product Research**, v.33, n.16, p.1 – 5, 2018.
- DE FARIA, M. A. **Uso de copolímeros em bloco na modificação de superfície de nanopartículas de prata e de sílica para preparação de nanocompósitos poliméricos**. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2014.
- DELMONICO, L.; ALVES, G.; DO AMARAL, L. F. P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Revista HUPE**, v.14, n.1, p.59 – 65, 2015.
- DEL RÍO, J. C.; EVARISTO, A. B.; MARQUES, G.; MARTÍN-RAMOS, P.; MARTÍN-GIL, J.; GUTIÉRREZ, A. Chemical composition and thermal behavior of the pulp and kernel oils from macauba palm (*Acrocomia aculeata*) fruit. **Industrial Crops and Products**, v.84, p.294–304, 2016.
- DE OLIVEIRA, I. P.; CORREA, W. A.; NEVES, P. V.; SILVA, P. V. B.; LESCANO, C. H.; MICHELS, F. S.; PASSOS, W. E.; MUZZI, R. M.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Optical analysis of the oils obtained from *acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd: mapping absorption-emission profiles in an induced oxidation process. **Photonics**, v.4, n.3, p.1–12, 2017.
- DE OLIVEIRA, F. F. D. **Sistemas nanoestruturados contendo óleos de polpa e de da amêndoa de *Acrocomia Aculeata* (Jacq.). Lodd.: preparação e caracterização físico-química**. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.
- DERAKHSHAN, Z.; FERRANTE, M.; TADI, M.; ANSARI, F.; HEYDARI, A.; HOSSEINI, M. S.; CONTI, G. O.; SADARABAD, E. K. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. **Food and Chemical Toxicology**, v.114, p.108–121, 2018.

- DIAS, A. R. M. **Síntese e caracterização de copolímeros em bloco anfifílicos, por transesterificação, com redução de massa molar da poli(ϵ -caprolactona)**. Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo. 2015.
- DO AMARAL, F. P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C. B.; JORGE, S. M. A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. Ex Mart] coletada na região de botucatu, sp. **Revista Energia na Agricultura**, v.26, n.1, p.12–20, 2011.
- DOLFINI, E.; RONCORONI, L.; DOGLIOTTI, E.; SALA, G.; ERBA, E.; SACCHI, N.; GHIDONI, R. Resveratrol impairs the formation of MDA-MB-231 multicellular tumor spheroids concomitant with ceramide accumulation. **Cancer Letters**, v.249, p.143–147, 2007.
- DOMICINIANO, G. P.; ALVES, A. A.; LAVIOLA, B. G.; DA CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; Parâmetros genéticos e diversidade em progênies de Macaúba com base em características morfológicas e fisiológicas. **Ciência Rural**, v.45, n.9, p.1599–1605, 2015.
- DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.
- ELGEGREN, M.; KIM, S.; CORDOVA, D.; SILVA, C.; NORO, J.; CAVACO-PAULO, A.; NAKAMATSU, J. Ultrasound-Assisted Encapsulation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo.) Oil in Alginate-Chitosan Nanoparticles. **Polymers**. v.11, p.1 – 18, 2019.
- FABBRI A.; CARCANGIU M.L.; CARBONE A. Histological Classification of Breast Cancer. In: BOMBARDIERI E.; GIANNI L.; BONADONNA G. (eds) **Breast Cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg, v.1, n.3–14, 2008.
- FALCÃO, P. L.; MOTTA, B. M.; LIMA, F. C. D.; LIMA, C. V.; CAMPOS, T. P. R. Aumento de viabilidade de clones radiosensível (PBMC) e resistente (MDA-MB-231) na cobalto-terapia em taxa de dose reduzida. **Radiologia Brasileira**. v.48, n.3, p.158–165, 2015.
- FANG, X.; ZHANG, J.; XIE, X. LIU, D.; HE, C.; WAN, J.; CHEN, M. pH-sensitive micelles based on acid-labile pluronic F68-curcumin conjugates for improved tumor intracellular drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. p.1-27, 2016.
- FAZELIFAR, P.; TABRIZI, M. H.; RAFIEE, A. The *Arachis hypogaea* Essential Oil Nanoemulsion as an Efficient Safe Apoptosis Inducer in Human Lung Cancer Cells (A549). **Nutritional & Cancer**, p.1 – 10, 2020.
- FEITOSA V.A., DE ALMEIDA, V.C., MALHEIROS, B., DE CASTRO, R.D., BARBOSA, L.R.S., CERIZE, N.N.P., YAGUI, C.O.R. Polymeric micelles of Pluronic F127 reduce hemolytic potential of amphiphilic drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.1, p.177–185, 2019.

FERNANDES, R. S.; SILVA, J. O.; SEABRA, H. A.; OLIVEIRA, M. S.; CARREGAL, V. M.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; TOWNSEND, D. M.; COLLETTI, P. M.; LEITE, E. A.; CARDOSO, V. N.; FERREIRA, L. A. M.; RUBELLO, D.; BARROS, A. L. B. α -Tocopherol succinate loaded nano-structured lipid carriers improves antitumor activity of doxorubicin in breast cancer models *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.103, p.1348 – 1354, 2018.

FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; BURGER, A. M. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of *in vitro* to *in vivo* activity as a basis for anticancer drug Discovery. **European Journal of Cancer**, v.40, p.802 – 820, 2004.

FOLIN, O.; CIOOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627, 1927.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York, 1987.

FREUDENBERG, J. A.; WANG, Q.; KATSUMATA, M.; DREBIN, J.; NAGATOMO, I.; GREENE, M. I. The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. **Experimental and Molecular Pathology**, v.87, p.1 – 11, 2009.

GALVÃO, J.; DAVIS B.; TILLEY, M; NORMANDO, E.; DUNCHEN, M. R.; CORDEIRO, M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**. v.28, p.1317 – 1330, 2014.

GHOORA, M. D.; HALDIPUR, A. C.; SRIVIDYA, N. Comparative evaluation of phytochemical content, antioxidant capacities and overall antioxidant potential of select culinary microgreens. **Journal of Agriculture and Food Research**. v.2, p.1 – 7, 2020

GLORIA, N. F.; SOARES, N.; BRAND, C.; OLIVEIRA, F. L.; BOROJEVIC, R.; TEODORO, A. J. Lycopene and Beta-carotene Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. **Anticancer Research**. v.34, p.1377 – 1386, 2014.

GONG, J.; CHEN, M.; ZHENG, Y.; WANG, S.; WANG, Y. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. **Journal of Controlled Release**, v.159, p.312 – 323, 2012.

HARFOUCHE, G.; MARTIN, M. T. Response of normal stem cells to ionizing radiation: A balance between homeostasis and genomic stability. **Mutation Research**. v.704, p.167 – 174, 2010.

HARRIS, I. S.; DENICOLA, G. M. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. **Trends in Cell Biology**, v.6, n.30, p.1 – 12, 2020.

HENDERSON, A; GALEANO-GARCES, G; BERNAL, R. Field guide to the palms of the Americas. **Princeton New Jersey: Princeton University Press**. 1995.

JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, C.; PELLATI, F.; PATIL, B. S. BetaSweet carrot extracts have antioxidant activity and in vitro antiproliferative effects against breast cancer cells. **Journal of Functional Foods**, v.62, p.1 – 12, 2019.

JOHNSON M.C. Anatomy and Physiology of the Breast. In: JATOI I.; KAUFMANN M. (eds) **Management of Breast Diseases**. Springer, Berlin, Heidelberg, v.1, p.1 – 36, 2010.

JUIZ DE FORA. Plataforma de bioquerosene e renováveis da Zona da Mata. Minas Gerais, 2018. **Disponível em:** <https://www2.ufjf.br/critt/files/2019/09/PLATAFORMA-BIOQUEROSENE-ZONA-DA-MATA-VERSÃO-FINAL-07-05-2018-1-1.pdf>. Acesso em: 10 de jan. de 2020.

KABANOV, A.V. Polymer genomics: An insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.58, p.1597–162, 2006.

KAKIZAWA et al. Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organix-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly (ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid). **Advanced Materials**. v.16, n.8, p.699-702, 2004

KARAPINAR-KAZANDAG, M.; YALVAÇ, M. E.; ERSEV, H.; TANALP, J.; SAHIN, F.; BAYIRLI, G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. **International Endodontic Journal**, v.44, p.626 – 634, 2011.

KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SAK, K.; GARG, V. K.; GOEL, N.; PUNIA, S.; CHAUDHARY, A. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression. **Current Pharmacology Reports**, v.5, p.79 – 86, 2019.

KATAOKA, K., YOKOYAMA, M., MIYAUCHI, M., YAMADA, N., OKANO, T., SAKURAI, Y., INOUE, S. Polymer Micelles as novel drug carrier: Adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (aspartic acid) block copolymer. **Journal of Controlled Release**. v.11, p.269–278, 1990.

LALARUKH, I.; SHAHBAZ, M. Response of antioxidants and lipid peroxidation to exogenous application of alpha-tocopherol in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under salt stress. **Pakistan Journal of Botany**, v.52, n.1, p.75 – 83, 2020.

LIEB, V. M.; SCHEX, R.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M.; SCHMARR, H. -G.; CARLE, R.; STEINGLASS, C. B. Fatty acids and triacylglycerols in the mesocarp and kernel oils of maturing Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits. **NFS Journal**, v.14, n.15, p.6 – 13, 2019.

LIMA, E.S.; FELFILI, J.M.; MARIMON, B.S.; SCARIOT, A. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado sensu stricto no Brasil Central - DF. **Revista Brasil Botânica**. v.26, p.361 – 370, 2003.

LIMA, J. M.; THOMAZINI, M.; TRINDADE, C. S. F.; SANTOS, M. G. Extração de β -caroteno da macaúba. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.3, n.6, p.796 – 800, 2017.

- LOURENCO, C. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**.v.138, p.1, n.1–12, 1996.
- LORENZI, H. Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas. **Nova Odessa Plantarum**. p.1–20; 1996.
- LOURENCO, C. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**. v.138, n.1, p.1–12. 1996.
- LUCIA, A.; TOLOZA, A. C.; GUZMÁN, E.; ORTEGA, F.; RUBIO, R. G. Novel polymeric micelles for insectpest control: encapsulation of essential oil monoterpenes inside a triblock copolymer shell for head lice control. **PeerJ**. v.5, p.1-13, 2017.
- MAGOSSO, M. F.; CARVALHO, P. C.; SHNEIDER, B. U. C.; PESSATTO, L. R.; PESARINI, J. R.; SILVA, P. V. B.; CORREA, W. A.; KASSUYA, C. A. L.; MUZZI, R. M.; OLIVEIRA, R. J. *Acrocomia aculeata* prevents toxicogenetic damage caused by the antitumor agent cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Research**. v.15, n.2, p.1 – 14, 2016.
- MARTINS, L. H.; REZENDE, R. M. D.; CORDEIRO, J. A. B. L.; DE PAULA, H. D. S. C.; DE BASTOS, D. R.; SAM, C. A.; VILANOVA-COSTA, T.; SADDI, V. A.; SILVA, A. M. T. C. Padrão de metástase no câncer de mama triplo negativo. **Revista Brasileira de Mastologia**. v.27, n.1, p.8-14, 2017.
- MCGUIRE K.P. Breast Anatomy and Physiology. In: AYDINER A.; İĞCI A.; SORAN A. (eds) **Breast Disease**. Springer, Cham, v.1, p.1 – 14, 2016.
- MELO, C. A. A.; MORAIS, J. D. O.; MARTINS, G. D. O.; SOUZA, G. C. D. A.; SANTOS, P. D. C. Fatores de risco odontológicos, moleculares e genéticos para o AVC: umarevisão sistemática. **Revista Neurociências**, v.29, p.1 – 21, 2021.
- MILANI, A.; BASIRNEJAD, M.; SHAHBAZI, S.; BOLHASSANI, A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of Pharmacology**, v.174, p.1290 – 1324, 2017.
- MILLER, K. D.; NOGUEIRA, L.; MARIOTTO, A. B.; ROWLAND, J. H.; YABROFF, R.; ALFANO, C. M.; JERNAL, A.; KRAMER, J. L.; SIEGEL, R. L. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2019. **A Cancer Journal for Clinician**. v.68, n.5, p.363 – 385, 2019.
- MITTAL; BANERJEE. Current status and future prospects of nanobiomaterials in drug delivery. In: **Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials**, v.9, p.147 – 170, 2016.
- MOCCIA, S.; RUSSO, M.; DURANTE, M.; LENUCCI, M. S.; MITA, G.; RUSSI, G. L. A carotenoid-enriched extract from pumpkin delays cell proliferation in a human chronic lymphocytic leukemia cell line through the modulation of autophagic flux. **Current Research in Biotechnology**, v.2, p.74 – 82, 2020.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEITE, E. A.; BARROS, C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. **Microscopy & Microanalysis**, v. 11, n.3, p. 36-39, 2005.

- MUKHERJEE, P. K.; MAITY, N.; NEMA, N. K.; SARKAR, B. K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v.19, n.1, p.64 – 73, 2011.
- NAGARAJAN, R. Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic® (PEO-PPO-PEO) block copolymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.16, p.55 – 72, 1999.
- NAGARAJU, A.; LOKESH, B. R. Interesterified coconut oil blends with groundnut oil or olive oil exhibit greater hypocholesterolemic effects compared with their respective physical blends in rats. **Nutrition Research**. v.27, p.580 – 586, 2007.
- NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P.; Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.498 – 502, 2008.
- NIH. Chemotherapy to treat cancer. **Disponível em:** <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>. 2015. Acesso em: 12 de mar. de 2020.
- NIRANJANA, R.; GAYATHRI, R.; MOL, S. N.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T.; MIYASHITA, K.; GANESAN, P. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells. **Journal Of Functional Foods**. v.18, p.968 – 985, 2015.
- NIU, J.; YUAN, M.; CHEN, C.; WANG, L.; TANG, Z.; FAN, Y.; LIU, X.; MA, Y. J.; GAN, Y. Berberine-loaded thiolated pluronic f127 polymeric micelles for improving skin permeation and retention. **International Journal of Nanomedicine**, v.15, p.9987 – 10005, 2020.
- NUNES, A. A.; BUCCINI, D. F.; JAQUES, J. A. S.; PORTUGAL, L. C.; GUIMARÃES, R. C. A.; FAVARO, S. P.; CALDAS, R. A.; CARVALHO, C. M. E. Effect of *Acrocomia aculeata* Kernel Oil on Adiposity in Type 2 Diabetic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.73, p.61 – 67, 2018.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.36 – 44, 2015.
- OSSES, J. K. V. **Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas de poli (óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- OVIDI, E.; MASCI, V. L.; TADDEI, A. R.; PAOLICELLI, P.; PETRALITO, S.; TRILLI, J.; MASTROGIOVANNI, F.; TIEZZI, A.; CASADEI, M. A.; GIACOMELLO, P.; GARZOLI, S. Chemical investigation and screening of anti-proliferative activity on human cell lines of pure and nano-formulated Lavandin essential oil. **Pharmaceuticals**, v.13, n.352, p.1 – 17, 2020.
- PADMAVATHI, M. Drug delivery system in nano greens. **International Journal of Herbal Medicine**. v,1, n.3, p.56 – 60, 2013.

PAR, H.; BROWN, S. R.; KIM, Y. Cellular mechanisms of circulating tumor cells during breast cancer metastasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, v.21, n.5040, p.1 – 19, 2020.

PARK, C.; MARTINEZ, B. C. Enhanced release of Rosmarinic Acid from *Coleus blumei* permeabilized by dimethyl sulfoxide (DMSO) while preserving cell viability and growth. **Biotechnology and Bioengineering**. v.40, n.4, p.459 – 464, 1992.

PAULA, C.; MOTTA, A.; SCHMITZ, C.; NUNES, C. P.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C. Alterations in dendritic cell function in aged mice: potential implications for immunotherapy design. **Biogerontology**. v.10, n.13, p.1-13, 2009.

PERRET, G. Y.; CRÉPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.22, n.5, p.465 – 492, 2008.

PERES, M. T. L. P.; LOPES, J. R. R.; DA SILVA, C. B.; CÂNDIDO, A. C. S.; SIMIONATTO, E.; CABRAL, M. R. P.; OLIVEIRA, R. M.; FACCO, J. T.; CARDOSO, C. A. L.; SIMAS, P. H. Phytotoxic and antioxidant activity of seven native fruits of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.27, n.4, p.836 – 846, 2013.

PINHO, R. A. S.; FIGUEIRAS, A. R. Aplicações terapêuticas de sistemas micelares poliméricos. **Boletim Informativo Geum**, v.7, n.2, p.48 – 62, 2016.

POGODA, K.; NIWINSKA, A.; MURAWSKA, M.; PIENKOWSKI, T. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. **Medical Oncology**, v.30, n.388, p.1 – 8, 2013.

PREVEDELLO, M. T.; COMACHIO, G. Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p.55244 – 55285, 2021.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. **Cancer Research**, v.58, n.7, p.1486 – 1493, 1998.

RAKHLIN, A.; SHVETS, A.; IGLOVOVIK, V.; KALININ, A. A. Deep convolutional neural networks for breast cancer histology image analysis. **Internacional Conference Image Analysis and Recognition**, p.737 – 744, 2018.

RAMOS, I. M. F. C. **Nanopartículas poliméricas funcionalizadas para liberação de fármaco no sistema nervoso central**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

RAMOS, M.I.L., RAMOS-FILHO, M.M., HIANE, P.A., BRAGA-NETO, J.A., SIQUEIRA, E.M.A. Qualidade nutricional da polpa de bociúva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.90 – 94, 2008.

RAMOS, M. I. L.; FILHO, M. M. R.; HIANE, P. A.; NETO, J. A. B.; SIQUEIRA, E. M. D. A. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.90 – 94, 2008.

RAO, D.A., COTE, B., STAMMET, M., AL FATEASE A.M., ALANI, A.W.G. Evaluation of the Stability of Resveratrol Pluronic® Micelles Prepared by Solvent Casting and Simple Equilibrium Methods. **Pharmaceutical Nanotechnology**. v.4, p.120 – 125, 2016.

RAPOPORT, N. Y., HERRON, J. N., PITT, W. G., PITINA, L. Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake. **Journal of Controlled Release**. v.58, p.153 – 162, 1999.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biol. Pharm. Bull.** v.29, n.9, p.1790 – 1798, 2006.

RIBEIRO, E. B. **DESENVOLVIMENTO DE NANOCARREADORES FORMADOS POR MICELAS DE PLURONIC F127 OU NANOEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO DE INTERFERON GAMMA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR**. Dissertação (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília. 2016.

RIOS, A. D. O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. D. L. P. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Revista Alimento e Nutrição**, v.20, p.342 – 350, 2009.

ROCHA, F.; SUGAHARA, L. Y.; LEIMANN, F. V.; DE OLIVEIRA, S. M.; BRUM, E. D. S.; CALHELHA, R. C.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; INEU, R. P.; GONÇALVES, O. H. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. **Food & Function**, v.9, p.3698 – 3706, 2018.

ROCHA, M. S., FIGUEIREDO, R. W., ARAÚJO, M. A. M. A., & MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Physical and chemical characterization and anti oxidant activity (*in vitro*) of fruit of the *Piaui savanna*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.35, n.4, 2013.

ROSA, C.; FRANCA, C.; VIEIRA, S. L.; CARVALHO, A.; PENNA, A.; NOGUEIRA, C.; LESSA, S.; RAMALHO, A. Reduction of Serum Concentrations and Synergy between Retinol, β -Carotene, and Zinc According to Cancer Staging and Different Treatment Modalities Prior to Radiation Therapy in Women with Breast Cancer. **Nutrients**, v.11, n.2953, p.1 – 8, 2019.

SAAD, E. D., HOFF, P. M., CARNELÓS, R. P., KATZ, A., NOVIS, Y. A.S., PIETROCOLA, M., HAMERSCHLAK, N., TABACOF, J., GANSL, R. C., SIMON, S. D. Critérios comuns de toxicidade do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.48, n.1, p.63 – 96, 2002.

SAINI, R. K.; CHOUHAN, R.; BAGRI, L. P.; BAJPAI, A. K. Strategies of Targeting Tumors and Cancers. **Journal of Cancer Research Updates**. v.1, p.129 – 152, 2012.

SÁNCHEZ-MUNIZ F. J.; OUBIÑA, P.; RÓDENAS, S.; BENEDI, J.; CUESTA, C. Platelet aggregation, thromboxane production and thrombogenic ratio in postmenopausal women consuming high oleic acid-sunflower oil or palmolein. **European Journal of Nutrition**. v.42, p.299 – 306, 2003.

SANTOS, D. C. **Investigação de parâmetros de síntese e de potencialidades dos sistemas de nanopartículas de ouro empregando Pluronic F127 e Pluronic F127 tiolado como redutor/estabilizador**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade de Sergipe, Sergipe. 2015.

SCHEX, R.; LIEB, V. M.; JIMÉNEZ, V. M.; ESQUIVEL, P.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R.; STEINGASS, C. B. HPLC-DAD-APCI/ESI-MSn analysis of carotenoids and α -tocopherol in Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits of varying maturity stages. **Food Research International**, v.105, p.645 – 653, 2018.

SCHMOLKA, I. R. A Review of block polymer surfactants. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v.54, p.110 – 116, 1977.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. **Cancer cell**, v.10, n.3, p.175 – 176, 2006.

SCULLY, O. J.; BAY, B-H.; YIP, G.; YU, Y. Breast Cancer Metastasis. **Cancer Genomics & Proteomics**, v.9, n.5, p.311 – 320, 2012.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**. v.19, n.263, p.1 – 22, 2018.

SEZGIN, Z.; YUKSEL, N.; BAYKARA T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.64, p.261 – 268, 2006.

SIERRA et al. The new classification of breast cancers: finding the luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.36, n.12, p.575-580, 2014.

SHIN, J.; SONG, M.; OH, J.; KEUM, Y.; SAINI, R. K.; Pro-oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence. **Antioxidants**, v.9, n.532, p.1 – 16, 2020.

SHIRIKY, B.; KELLY, A.; ISREB, M.; BABENKO, M.; MAHMOUDI, N.; ROGERS, S.; SHEBANOVA, O.; SNOW, T.; GOUGH, T. Pluronic F127 thermosensitive injectable smart hydrogels for controlled drug delivery system development. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.565, p.119 – 130, 2020.

SHOORVARZI, S. N.; SHAHRAKI, F.; SHAFAEI, N.; KARIMI, E.; OSKOUEIAN, E. *Citrus aurantium* L. bloom essential oil nanoemulsion: Synthesis, characterization, cytotoxicity, and its potential health impactson mice. **Journal Of Food Biochemistry**, v.1 – 11, 2020.

- SILVA, J. C. D. M.; SANTANA, R. V.; DE ALMEIDA, A. B.; TAKEUCHI, K. P.; EGEA, M. B. Changes in the chemical, technological, and microbiological properties of kefir-fermented soymilk after supplementation with inulin and *Acrocomia aculeata* Pulp. **Applied Sciences**, v.11, n.5575, p.1 – 13, 2021.
- SILVA, P. V. D.; RAMIRO, M. M.; IRIGUCHI, E. K. K.; CORRÊA, W. A.; LOWE, J.; CARDOSO, C. A. L.; ARENA, A. C.; KASSUYA, C. A. L.; MUZZI, R. M. Antidiabetic, cytotoxic and antioxidant activities of oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp. **Natural Product Research**. p.2413 - 2416, 2018.
- SIRIVIBULKOVIT, K.; NOUANTHAVONG, S.; SAMEENOI, Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. **Analytical Sciences**. v.34, p.795 – 800, 2018.
- SHAZLY, G. A. Ciprofloxacin Controlled-Solid Lipid Nanoparticles: Characterization, *In Vitro* Release, and Antibacterial Activity Assessment. **BioMed research International**. p.1-9, 2017.
- SOLDATI, P. P.; POLONINI, H. C.; PAES, C. Q.; RESTREPO, J. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CHAVES, M. G. A. M.; BRANDÃO, M. A. F.; PITTELLA, F.; RAPOSO, N. R. B. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **IFAC-PapersOnLine**. v.51, n.27, p.16 – 21, 2018.
- SOUZA, G. R. R.; DALMINA, M.; RESTREPO, J. A. S.; JUNIOR, L. J. D. M.; SILVA, A. H.; GUALBERTO, A.; GAMEIRO, J.; DITZ, D.; PASA, A. A.; PITTELLA, F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Short interfering RNA delivered by a hybrid nanoparticle targeting VEGF: Biodistribution and anti-tumor effect. **BBA – General Subjects**. v.1865, n.129938, p.1 – 10, 2021.
- SUN, H.; MENG, Q.; TANG, S.; SU, J.; YIN, Q.; CHEN, L.; GU, W.; YU, H.; ZHANG, Z.; WANG, S.; LI, Y. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Pluronic Copolymers with Moderate Hydrophilic–Lipophilic Balance. **Molecular Pharmaceutics**. v.12, n.9, p.3323 – 3331, 2015.
- TAM, K.; HO, C.; TU, S.; LEE, W.; HUANG, C.; CHEN, C.; WU, C.; LEE, C.; HO, Y. α -Tocopherol succinate enhances pterostilbene anti-tumor activity in human breast cancer cells in vivo and in vitro. **Oncotarget**, v.9, n.4, p.4593 – 4606, 2018.
- TAPETI, C. F.; FAVARO, S. P.; MARQUES, R. R. SISTEMA COLETOR DE FRUTOS DE MACAÚBA. **Disponível em:** https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/973018/1/SISTEMACOLETO_RDEFRUTOSDEMACAUBACrissiaTapetifinal.pdf. 2013.
- TICKEL, J. From the fryer to the fuel tank: the complete guide to using vegetable oil as alternative fuel. **Florida: Ticket Energy Consulting**. 2000.
- THICKETT, S. C.; GILBERT, R. G.; “Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms.” **Polymer**. v.48, p.6965 – 6991, 2007.
- TURASHVII, G.; BROGI, E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. **Frontier in medicine**. v.4, n.227, p.1-11, 2017.

VALLE, A. B. C. S. **Silenciamento do gene hoxb7 em linhagem de câncer de mama utilizando nanopartículas híbridas contendo siRNA e co-tratamento com tamoxifeno.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2019.

WANG, H.; WILLIAMS, G. R.; WU, J.; WU, J.; NIU, S.; XIE, X.; LI, S.; ZHU, L. Pluronic F127-based micelles for tumor-targeted bufalin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. p.1 – 32, 2019.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v.7, n.12, p.1875 – 1884, 2008.

WANG, Y.; WANG, Y.; WANG, J.; LEI, W.; LI, K.; WU, D.; WANG, X. Pharmacokinetics, biodistribution, and bioavailability of gossypol-loaded Pluronic® F127 nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.45, p.388 – 396, 2018.

WEI, C.; YU, Y.; CHEN, Y.; HUNG, Y.; YIANG, G. Anticancer effects of methotrexate in combination with α -tocopherol and α -tocopherol succinate on triple-negative breast cancer. **Oncology Reports**, v.41, p.2060 – 2066, 2019.

WELSH, J; CONN, M. **Animal Models for the Study of Human Disease**. New York. p.997 – 1018, 2013.

World Health Organization. Cancer: key facts. **Disponível em:** <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 8 de julho de 2020.

WULFF-PÉREZ, M; TORCELLO-GOMEZ, A.; GÁLVEZ-RUÍZ, M. J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. **Food Hydrocolloids**. v.23, p.1096 – 1102, 2008.

XIAO, S.; YU, H.; XIE, Y.; GUO, Y.; FAN, J.; YAO, W. The anti-inflammatory potential of *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl essential oil in vitro and in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 267, p.1 – 46, 2020.

XIONG, L.; DENG, N.; ZHENG, B.; LI, T.; LIU, R. H. Goji berry (*Lycium* spp.) extracts exhibit antiproliferative activity via modulating cell cycle arrest, cell apoptosis, and the p53 signaling pathway. **Food & Function**. v.12, p.6513 – 6525, 2021.

YANG, C-C.; HUNG, C-F.; CHEN, B-H. Preparation of coffee oil-algae oil-based nanoemulsions and the study of their inhibition effect on UVA-induced skin damage in mice and melanoma cell growth. **International Journal of Nanomedicine**. v.12, p.6559 – 6580, 2017.

YANG, H., VILLANI, R. H.; WANG, H.; SIMPSON, M. J.; ROBERTS, M. S.; TANG, M.; LIANG, X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. v.37, n.266, p.1 – 10, 2018.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. L. Carotenoids—Antioxidant Properties. **Antioxidants**. v.7, n.28, p.1 – 4, 2018.

ZERDA A. de L.; GAMBHIR, S. S. Keeping tabs on nanocarriers. **Nature Nanotechnology**, v.2, n.12, 745 – 746, 2007.

ZHANG, Y.; XIN, C.; CHENG, C.; WANG, Z. Antitumor activity of nanoemulsion based on essential oil of *Pinus koraiensis* pinecones in MGC-803 tumor-bearing nude mice. **Arabian Journal of Chemistry**, v.13, p.8226 – 8238, 2020.

ZHANG, T.; ZHOU, S.; LIU, Y.; LUO, X.; DI, D.; SONG, Y.; LIU, X.; DENG, Y. Polysialic acid and pluronic F127 mixed polymeric micelles of docetaxel as new approach for enhanced antitumor efficacy. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v.43, n.11, p.1827 – 1835, 2017.