



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DA CEILÂNDIA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOEMULSÕES A BASE DE
ÓLEO DE AÇAÍ NA VIABILIDADE CELULAR, CICLO CELULAR E NA
FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PELE
MELANOMA, *in vitro*.**

PATRÍCIA LEITE COSTA

CEILÂNDIA-DF
JUN/2017

PATRÍCIA LEITE COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOEMULSÕES A BASE DE
ÓLEO DE AÇAÍ NA VIABILIDADE CELULAR, CICLO CELULAR E
NA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE
PELE MELANOMA, *in vitro*.**

Parte manuscrita do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação da aluna Patrícia Leite Costa, apresentada a Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti
Co-orientadora: Me. Alicia Simalie Ombredane

CELÂNDIA-DF
JUN/2017

PATRICIA LEITE COSTA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEO DE AÇAÍ NA VIABILIDADE CELULAR, CICLO CELULAR E NA FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DE CÂNCER DE PELE MELANOMA, *in vitro*.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti

Orientadora



Me. Alicia Simalie Ombredane

Coorientador

Prof. Dr. Diêgo Madureira

Examinador

Prof. Dr. Luís A. Muehlmann

Examinador

Gostaria de dedicar este trabalho a Deus, à minha família e a todos aqueles que não possuem oportunidade de estudar e que depositam sua confiança naqueles que se encontram nas universidades. Que nós possamos, por meio do nosso serviço, honrar esta confiança e tornar o mundo um lugar melhor.

AGRADECIMENTOS

Sou grata primeiramente a Deus, o Senhor da vida e da história, que tem me conduzido por caminhos incríveis afim de chegar a este momento. Obrigada Senhor por ter me carregado nos braços nos momentos que pensei que não conseguiria.

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

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

Agradeço aos meus amigos de Faculdade: Ana Flávia, Evelin, Lucas e Lorena, pelos muitos momentos compartilhados de alegrias, risos, brigas, trabalhos, comidas e tudo que partilhamos. Vocês tornaram a faculdade muito mais que especial, tornaram um lar. Quero levar a amizade de vocês para toda a vida, sou orgulhosa dos profissionais que vocês se tornaram.

Agradeço aos meus colegas de grupo de pesquisa, muito obrigada pela ajuda nos experimentos e discussões científicas, vocês tornam o laboratório muito divertido e acolhedor.

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

À minha co orientadora, muito obrigada Alicia por todos os ensinamentos e ajuda, eu sou muito orgulhosa de ser sua primeira aluna.

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

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Santa Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O câncer de pele melanoma se trata de um dos cânceres mais agressivos e metastáticos. O tratamento convencional para tal doença enfrenta obstáculos tais como a resistência a multi-drogas e a possibilidade de metástase por meio de células remanescentes no local do tumor. O açaí (*Euterpe oleracea Martius*) constitui uma fonte de compostos antioxidantes, como os fenóis e as antocianinas, com atividade antitumoral em linhagens de câncer de mama e leucemia. Nanoemulsões são ideais carreadores de compostos hidrofóbicos, incluindo compostos bioativos como o óleo de açaí. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de nanoemulsões a base de óleo de açaí na viabilidade celular, no ciclo celular e na fragmentação de DNA em células de câncer de pele melanoma (B16F10), *in vitro*. Com o ensaio de viabilidade celular foi possível observar ação citotóxica das nanoemulsões de açaí na linhagem de melanoma, cuja viabilidade foi reduzida em aproximadamente 40% ($p < 0,0001$) após 24 horas de exposição na concentração de 360 $\mu\text{g/mL}$. Nessa mesma concentração, o óleo de açaí nanoestruturado ocasionou parada do ciclo celular na fase G1 e fragmentação do DNA. Não houve diferença significativa no número total de células nem integridade de membrana plasmática das células tratadas com nanoemulsões de óleo de açaí comparado ao controle. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o óleo de açaí nanoestruturado tenha como mecanismo de ação a morte por apoptose e bloqueio do ciclo celular, sendo necessário mais ensaios para comprovar esta hipótese. Diante do exposto as nanoemulsões de óleo de açaí tornam-se potenciais estratégias de tratamento para o câncer de pele melanoma.

Palavras-chave: melanoma, nanoemulsões, açaí, *Euterpe oleracea Martius*, óleo.

ABSTRACT

Melanoma skin cancer is one of the most aggressive and metastatic cancer. The conventional treatment for this disease presents some issues such as the resistance to multiple drugs and the possibility of metastasis through remaining cancer cells. The açai (*Euterpe oleracea* Martius) constitutes a antioxidants compounds source, like phenolic molecules and anthocyanins, and it has a antitumoral activity previously proved in breast cancer and leukemia cell lines. Nanoemulsions are ideal hydrophobic compounds carriers, including bioactive compounds as açai oil. In this way, the objective of this study was to evaluate the effects of the exposure to açai oil nanoemulsion on cell viability, cell cycle and on DNA fragmentation in melanoma skin cancer cells, in vitro. The cell viability assay showed an açai oil nanoemulsions toxic activity on B16F10 cells, with a cell viability reduced of 40%. The nanostructured açai oil caused a cell cycle arrest in G1 and also DNA fragmentation. There was no significant difference on cell growth, neither on membrane integrity of treated cells. The results showed that nanostructured açai oil may lead to cell death through apoptosis. More studies are needed to verify this hypothesis. In conclusion , it was demonstrated that açai oil nanoemulsions could become a potential model to treat melanoma skin cancer.

Key words: melanoma, nanoemulsions, açai, *Euterpe oleracea* Martius, oil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

AÇNE – Nanoemulsão com base de óleo de açaí

AÇPEG – Nanoemulsões com base de óleo de açaí e recoberta com polietilenoglicol

ANOVA – Análise de variância

ATCC – American Type Culture Collection

DLS – Dynamic Light Scattering (Espalhamento de luz dinâmico)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FACS – Citometria de fluxo H

INCA – Instituto Nacional de Câncer

L- - Nanoemulsão “vazia” contendo água e surfactante

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

Pdl – Índice de polidispersão

PEG – Polietilenoglicol

PI – Iodeto de propídeo

UnB – Universidade de Brasília

UV – Radiação ultravioleta

WHO – World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema de lesões e histologia de câncer de pele melanoma, demonstrando a aparência das lesões. Na primeira linha (da esquerda para a direita): pele normal, nevo, nevo displástico, melanoma in situ e melanoma invasivo. Na segunda linha esquema do comportamento de invasão dos melanócitos conforme tipo de melanoma. A terceira linha apresenta imagens de histologia celular, demonstrando diferença entre os tipos de lesões. Na figura B, comparação entre lesão de nevo e de melanoma in situ. Adaptada de SHAIN,2016. 14
- Figura 2 A) Fruto da espécie *Euterpe oleracea* Martius (açai); B) Estrutura química da cianidina 3-glicosídeo, principal antioxidante presente no óleo de açai. 16
- Figura 3 : Efeito EPR (retenção e permeação aumentadas) de macro- e nanopartículas através de vasos sanguíneos fenestrados do tecido tumoral (OMBREDANE,2016) 19
- Figura 4 Representação gráfica de formas diferentes de nanocarreadores. Adaptado de Li et al, 2014. 20
- Figura 5 A) Esquema de nanoemulsão óleo em água. (ARAÚJO,2017) B) Representação de nanoemulsão recoberta com polietilenoglicol (PEG). Adaptado de GANTA et al, 2014..... 21
- Figura 6 Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de pele melanoma de murino (B16F10) submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de nanoemulsões de L- (surfactante e água); PEG (polietileno glicol, surfactante e água) e ETOH..... 31
- Figura 7 Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de pele melanoma de murino (B16F10) submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de nanoemulsões de AÇNE (nanoemulsão de óleo de açai); AÇPEG (nanoemulsão de polietileno glicol e óleo de açai); e óleo livre (O.L) comparados com controle (CTL) por 24 horas. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,0001$) juntamente com o desvio padrão. 33
- Figura 8 . Porcentagem de células de câncer de pele melanoma B16F10 com lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às nanoemulsões de óleo de açai e seus respectivos brancos a 360 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao controle água

| | |
|---|----|
| ultrapura (CTL). Teste ANOVA e post-teste Tukey. Não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento e o controle. | 35 |
| Figura 9 Histogramas da verificação das fases do ciclo celular de células de câncer de pele melanoma de murino (B16F10) marcadas com iodeto de propídio, sendo os grupos controle (CTL) e as células tratadas com nanoemulsões de óleo de açaí na concentração de 360 µg/mL com (AÇPEG) e sem PEG (NE-). | 36 |
| Figura 10 Avaliação do ciclo celular por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AÇNE (nanoemulsão de açaí), AÇPEG (nanoemulsão de óleo de açaí associada a polietileno glicol), O.L (óleo de açaí), L- (surfactante), e PEG (polietileno glicol e surfactante) a 360 µg/mL de células de câncer de pele melanoma (B1610). Teste ANOVA e pós-teste Tukey, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: P<0,0001). | 37 |
| Figura 11 Avaliação da fragmentação de DNA por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AÇNE (nanoemulsão de açaí), AÇPEG (nanoemulsão de óleo de açaí associada a polietileno glicol), O.L (óleo de açaí), L- (surfactante), e PEG (polietileno glicol e surfactante) a 360 µg/mL de células de câncer de pele melanoma (B1610). Teste ANOVA e pós-teste Tukey, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***:P<0,0001). | 38 |
| Figura 12 Avaliação por Azul de tripan do número total de células de câncer de pele melanoma B16F10 após exposição por 24 horas às AÇNE (nanoemulsão de açaí), AÇPEG (nanoemulsão de óleo de açaí associada a polietileno glicol), O.L (óleo de açaí), L- (surfactante) e PEG (polietileno glicol e surfactante) a 360 µg/mL. Contagem das células em câmara de Neubauer. Não se observou diferença significativa quando comparado com o controle (CTL) em teste ANOVA e post-teste Tukey. | 39 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 Câncer de pele..... | 12 |
| 1.2 Óleo de açaí e antocianinas..... | 16 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 23 |
| 3.1 Objetivos específicos | 24 |
| 4. METODOLOGIA..... | 25 |
| 4.1 Óleo de açaí nanoestruturado..... | 25 |
| 4.2 Caracterização de nanoemulsões..... | 25 |
| 4.3 Cultura de Células..... | 25 |
| 4.4 Tripsinização das células..... | 26 |
| 4.5 Avaliação da Viabilidade Celular..... | 26 |
| 4.6 Verificação da fase do ciclo celular e fragmentação de DNA..... | 27 |
| 4.7 Avaliação de integridade de membrana e proliferação celular..... | 28 |
| 4.8 Análise Estatística..... | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1 Caracterização das nanoemulsões | 29 |
| 5.2 Avaliação da Viabilidade Celular..... | 30 |
| 5.3 Avaliação da integridade de membrana..... | 34 |
| 5.4 Verificação da fase do ciclo celular, fragmentação de DNA e proliferação celular | 36 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pele

O câncer é um conjunto de doenças que são caracterizadas pela mutação genética em diferentes mecanismos celulares que levam as células a apresentarem os chamados “*hallmarks of cancer*”; características propostas por Hanahan e Weinberg em 2000, nos quais foram adicionados mais duas em 2011. Estas características, ou simplesmente marcas-registradas do câncer, são produtos de mutações celulares que diferenciam as células normais das células tumorais. A resistência a morte celular, a sinalização de proliferação celular intermitente, a evasão de supressores de crescimento, a indução de angiogênese, a permissão de imortalidade replicativa e a ativação de invasão e metástase, são exemplos de características adquiridas pelas células tumorais (HANAHAN, 2011).

O câncer de pele é o tipo de câncer mais prevalente no Brasil, correspondendo a 30% das neoplasias no país. O subtipo melanoma, no país, representa apenas 3% dos casos de câncer de pele, sendo responsável por 1.547 mortes em 2013 e com estimativa de 5.670 novos casos em 2016. Entretanto, o melanoma é o subtipo mais agressivo dos cânceres de pele, pois apresenta grande capacidade de metástase e perfil de resistência a multi-drogas. Ele é responsável por 80% dos casos de morte por câncer de pele e o prognóstico varia conforme a evolução da doença. Em casos mais avançados de metástase, o paciente apresenta poucos meses de vida, entre 6 a 9 meses. (INCA, 2016; ALADOWICZ, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 132.000 casos de câncer de pele melanoma são registrados mundialmente a cada ano. Este número tende a aumentar devido a maior exposição das pessoas à raios ultravioletas que corresponde a um dos principais fatores de risco para desencadear o melanoma. Além disso, acredita-se que a diminuição da camada de ozônio poderá proporcionar uma maior exposição à raios ultravioletas e, conseqüentemente, aumentar o número de casos de câncer de pele melanoma (WHO, 2017)

O melanoma atinge células produtoras de melanina (pigmento da pele), os melanócitos, que são células originárias da crista neural e estão presentes em outros locais além da pele tais como olhos, cabelo, meninges e trato ano genital. A melanina é uma molécula que absorve e dispersa os raios ultravioleta que chegam até a pele, protegendo os queratinócitos de dano ao DNA. A produção de melanina é estimulada pela incidência de raios ultravioleta e pelo dano que eles causam nos queratinócitos. Estas células secretam o alfa-melanócito que estimula a produção de alfa-MSH, um hormônio que induz a ativação de receptores nos melanócitos e, conseqüentemente, a produção de melanina (SHAIN,2016).

Como citado anteriormente, uma das principais características do câncer de pele melanoma que confere a este um perfil letal é a sua capacidade de metástase. A metástase é a capacidade de invasão e colonização em outros tecidos por células cancerosas. Para tal fim, estas células alteram sua morfologia e moléculas de adesão, alcançam corrente sanguínea e vasos linfáticos e escapam de mecanismos do sistema imunitário. Quando chegam aos chamados órgãos-alvo se extravasam dos vasos e se proliferam no local, dando origem a um tumor, que é chamado de metástase, clinicamente. (HANAHAN, 2011; ALADOWICZ, 2013).

O melanoma pode surgir tanto na pele (chamado de melanoma cutâneo) como em outras regiões onde houver este tipo celular, fazendo com que surja características diferentes entre estes tipos. O melanoma cutâneo tende a ser mais letal e perigoso por estar associado a numerosos casos de metástases, e a resistência a múltiplos fármacos. A agressividade do melanoma depende do local de metástase, e o diagnóstico precoce permite uma chance maior de cura total. (LI et al, 2014; DWIVEDI et al, 2015).

O *naevus* ou nevo é um tipo de proliferação benigna que surge como manchas na pele e não muda de tamanho durante anos, permanecendo em um tipo de senescência celular (*senescense-like*). Os nevos possuem uma histologia bem variada e sua existência na pele consiste em um fator de risco para aparecimento de futuro melanoma, mas não necessariamente por sua evolução à malignidade. Uma

mutação nos melanócitos intermediários entre o naevus e o melanoma propriamente dito, são os nevos displásicos, caracterizados clinicamente como manchas castanhas com bordas indefinidas, pigmentação diferenciada ou assimetria. Este tipo de lesão pode evoluir para o melanoma. Na figura 1 podemos visualizar os tipos de lesões e sua evolução para o melanoma. (SHAIN,2016)

O melanoma *in situ*, se inicia com a proliferação de melanócitos com núcleos alargados e formação de bordas irregulares, cujas células se detém apenas à epiderme, não possuindo característica invasora. Quando os melanomas citados acima, por mutações genéticas, adquirem padrão invasor, temos o melanoma invasivo, caracterizado pela presença e proliferação de melanócitos em tecidos subjacentes a epiderme como a derme, mucosas, etc. A letalidade e agressividade do melanoma invasivo é “medido” pelo seu alcance de invasão. (SHAIN, 2016)

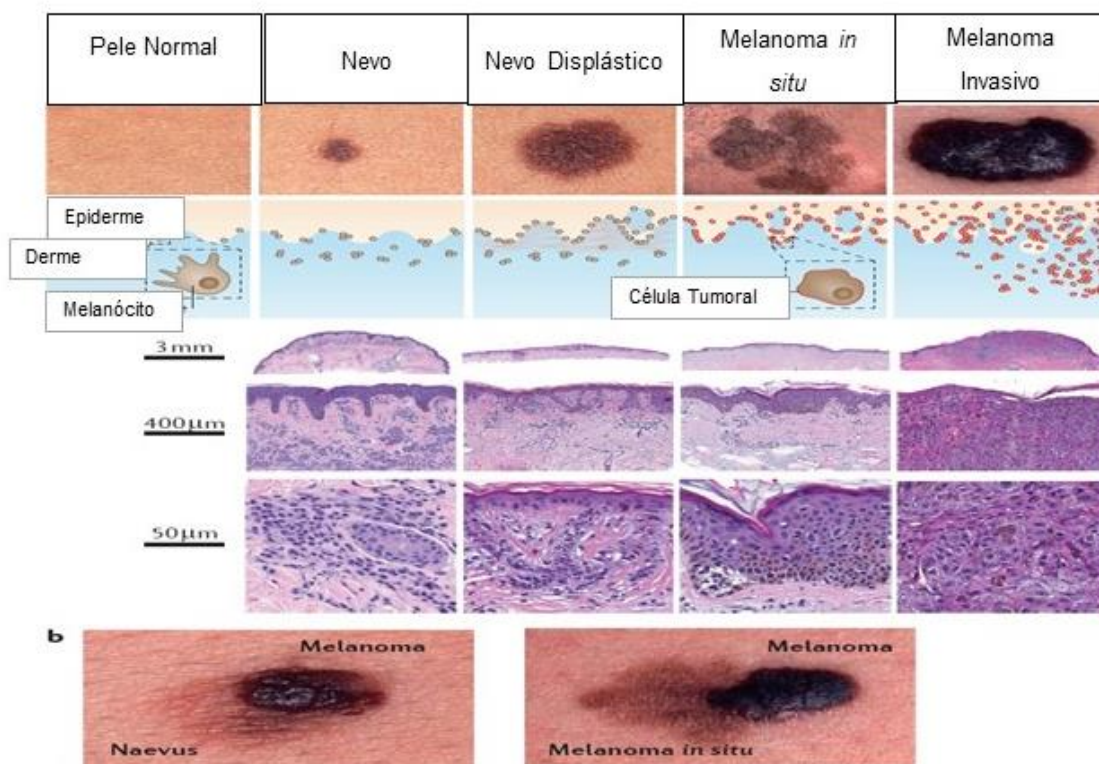


Figura 1 Esquema de lesões e histologia de câncer de pele melanoma, demonstrando a aparência das lesões. Na primeira linha (da esquerda para a direita): pele normal, nevo, nevo displástico, melanoma *in situ* e melanoma invasivo. Na segunda linha esquema do comportamento de invasão dos melanócitos conforme tipo de melanoma. A terceira linha apresenta imagens de histologia celular, demonstrando

diferença entre os tipos de lesões. Na figura B, comparação entre lesão de nevo e de melanoma in situ. Adaptada de SHAIN,2016.

Além da exposição a raios ultravioleta, outros fatores de risco estão relacionados ao melanoma, tais como: histórico familiar, câncer prévio, imunodeficiências crônicas como AIDS e outras, queimaduras na infância, entre outros. (RIGON,2015)

A remoção do tumor por cirurgia e a quimioterapia são os principais tratamentos aplicados no melanoma em fase precoce. No entanto, ambas terapias apresentam diversos efeitos adversos. A cirurgia como terapia possui algumas limitações, por exemplo, a chance de desfigurar o paciente (caso o tumor encontre-se no rosto), risco de perda da função; dores e infecções em casos de amputações; e risco de permanência de células remanescentes que podem iniciar processo de metástase. Em paralelo, a quimioterapia apresenta efeitos indesejados tais como alopecia (perda de cabelo), distúrbios gastrointestinais, infertilidade entre outros que limitam a sua aplicação e contribuem para que tal terapêutica possua baixa adesão por parte dos pacientes. Os principais quimioterápicos no tratamento do melanoma são a dacarbazina, IL-2 e agentes imunogênicos que apresentam eficácia no tratamento de 10-16% dos casos. (CHEN, 2016; ALADOWICZ, 2013)

Além das limitações da quimioterapia devido aos seus possíveis efeitos adversos, a resistência das células tumorais aos quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma é cada vez mais relatada. Essa resistência é resultante de alteração de mecanismos celulares que alteram a via de morte celular por apoptose e algumas moléculas pró-apoptóticas; e aumento no número de bombas de efluxo de fármacos com consequente redução da concentração do quimioterápico no interior da célula. Outros fatores também estão envolvidos no processo de resistência a quimioterápicos que são intrínsecos ao medicamento antineoplásico tais como metabolismo, distribuição e biodisponibilidade. (KANWAR, 2011 e CHEN, 2016)

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

1.2 Óleo de açaí e antocianinas

A biodiversidade brasileira dispõe de várias espécies de sua flora com propriedades medicinais que podem ser utilizadas como alternativa para desenvolver novas terapias antitumorais. Dentre essas espécies destaca-se o açaí, *Euterpe oleracea* Martius, uma palmeácea presente no norte do país. Na figura 2 A, pode-se ver o fruto desta espécie.

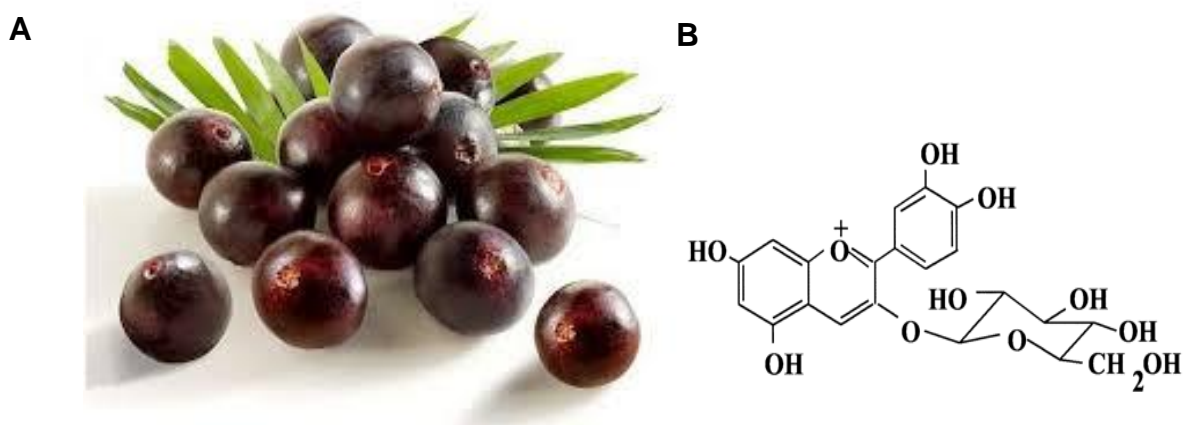


Figura 2 A) Fruto da espécie *Euterpe oleracea* Martius (açaí); B) Estrutura química da cianidina 3-glicosídeo, principal antioxidante presente no óleo de açaí.

O seu fruto faz parte da dieta básica da população da região norte do Brasil. Ultimamente está sendo consumido em larga escala no Brasil e é exportado para consumo em outros países como Japão e EUA (PALA, 2015). A popularização do seu consumo pode ser associada a suas propriedades energéticas e nutricionais, pois representa uma grande fonte de compostos antioxidantes e pode ser considerada uma das novas “superfrutas”. (DE LIMA YAMAGUCHI, 2015)

Um dos motivos do seu vasto consumo é que tal fruto constitui uma fonte de compostos poli fenólicos, íons metálicos e pigmentos como as antocianinas que são conhecidas por apresentarem potente atividade antioxidante. (DE LIMA YAMAGUCHI, 2015)

Segundo Pacheco-Palencia e colaboradores (2010), o óleo de açaí extraído da polpa da fruta é rico em fenóis de nonantocianina tais como ácidos fenólicos e procianidinas. A polpa do açaí possui cerca de 90 substâncias bioativas.

De acordo com Del Pozo-Insfran (2006), a capacidade antioxidante da polpa do açaí é superior a outras frutas antioxidantes como morango e outras frutas vermelhas. Segundo este estudo, as antocianinas e compostos polifenólicos presentes no açaí são estáveis e podem ser eficientes como agente antitumoral em células de leucemia HL-60. A antocianina presente em maior quantidade no açaí é a Cianidina-3-glicosídeo, (cuja estrutura química podemos observar na figura 2 B), a qual induziu apoptose e apresentou efeito antiproliferativo em células de câncer melanoma, conforme estudo de RUGINĂ e colaboradores (2017).

Adicionalmente, a atividade anticarcinogênica dos antioxidantes já é bastante estudada. Tais moléculas podem induzir resposta imunológica com ativação de células T-citotóxicas e realizar ação sobre a expressão de oncogenes, impedindo o desenvolvimento de rede vascular do tumor ou estimular a diferenciação celular (MAZHAR et al, 2015). Em paralelo, outros compostos presentes na composição do açaí também são conhecidos como sendo importantes agentes antitumorais. Pode-se citar os compostos poli fenólicos que apresentaram atividade antiproliferativa em câncer de cólon e atividade pró-apoptótica em células de leucemia (DIAS et al, 2014). Apesar da presença de várias moléculas bioativas, poucos estudos investigam o efeito antitumoral do próprio óleo de açaí. Entretanto, a sua aplicação pode apresentar algumas limitações devido as suas propriedades físico-químicas, tais como sua hidrofobicidade e a capacidade de se oxidar na presença de luz e temperatura. Novas formas de carregamento e formulações, como o uso da nanotecnologia, são uma alternativa para contornar as limitações do tratamento a base de biocompostos como o óleo de açaí.

1.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência, engenharia e tecnologia definida pela manipulação de materiais em escala nanométrica, de 1 a 1000 nm, onde os materiais assumem características físico-químicas diferentes do que em seu estado inicial. A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar que possui, no campo da medicina, o papel de desenvolver novas formas de diagnósticos, tratamentos, prevenção e detecção de patologias tais como o câncer. Esta área, conhecida como nanomedicina, apresenta como um dos principais objetivos o desenvolvimento de um tratamento com base na entrega específica dos fármacos ao local de interesse (*"targeted drug delivery system"*). (GAO, 2013; HULL, 2013)

O uso da nanotecnologia para o encapsulamento e transporte de moléculas bioativas em nanocarreadores é uma alternativa bastante promissora. Uma característica específica da farmacocinética de compostos em escala nanométrica utilizados no tratamento do câncer, é o fenômeno chamado EPR (*enhanced permeability and retention*), ou seja a capacidade de permeação e retenção de moléculas no tumor. (MAEDA,2013) Quando há a proliferação do tumor, as células constituintes começam a entrar em hipóxia pela falta de circulação de sangue. Para suprir tal necessidade, fatores de crescimento capazes de induzir formação de vasos sanguíneos a partir de capilares adjacentes ao tumor são ativados. No entanto, esse processo de angiogênese é irregular e forma fenestras nos vasos sanguíneos tumorais, o que confere o perfil de permeação aumentada a macromoléculas e nanocarreadores (Figura 3) . O princípio da retenção aumentada no tecido tumoral está associada à redução da drenagem linfática no líquido intersticial deste tecido. (BERTRAND, 2014)

Portanto, tendo como base esse princípio do EPR, os nanocarreadores se acumulam e conseguem permear mais facilmente os tecidos tumorais, obtendo assim maior especificidade de tratamento, permitindo reduzir as doses aplicadas e minimizar os possíveis efeitos adversos em células normais (Li et al, 2014).

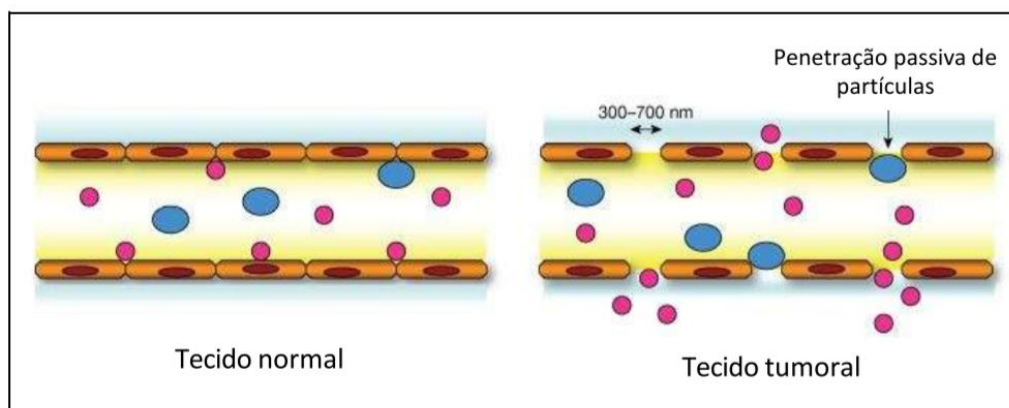


Figura 3 : Efeito EPR (retenção e permeação aumentadas) de macro- e nanopartículas através de vasos sanguíneos fenestrados do tecido tumoral (OMBREDANE,2016)

Dentre as várias formas de nanocarreadores, existem as nanoemulsões juntamente com os lipossomos, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, micelas, dendrímeros, entre outros, conforme podemos ver na figura 4. As nanoemulsões são sistemas compostos por uma fase aquosa, uma fase oleosa e um tensoativo que permite a formação de gotículas de óleo de tamanho nanométrico cujo diâmetro hidrodinâmico se encontra no intervalo de 50 a 200 nm. Estes sistemas podem ser construídos na forma de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), onde no primeiro, a água é a fase dispersante e o óleo está contido dentro da nanoemulsão; já no segundo, o óleo é o componente dispersante e a água compõe a nanoemulsão. (ARAÚJO, 2017)

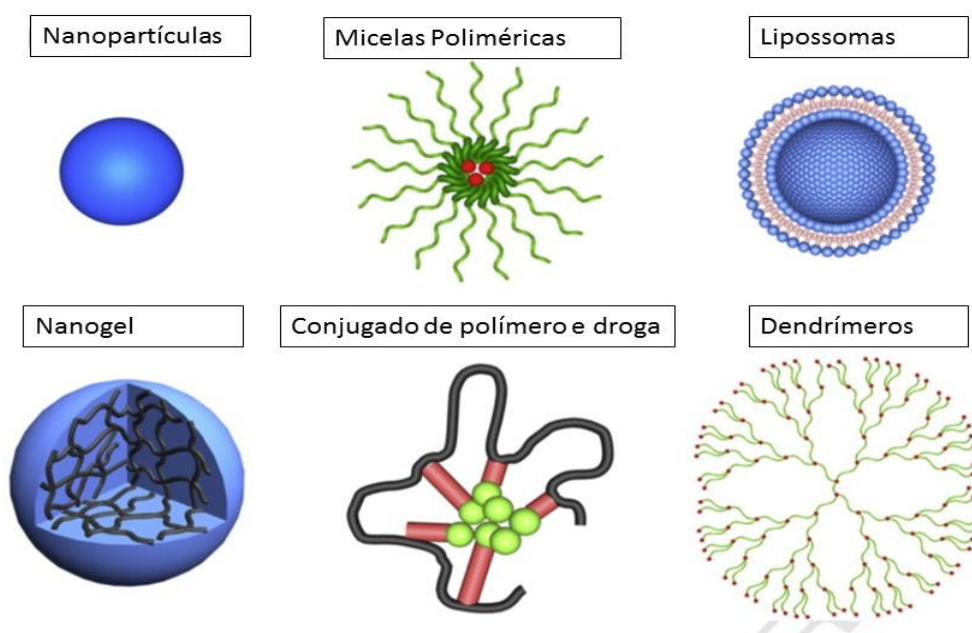


Figura 4 Representação gráfica de formas diferentes de nanocarreadores. Adaptado de Li et al, 2014.

Os nanocarreadores podem ter suas superfícies moduladas e estruturadas com ligantes, anticorpos, polímeros, entre outros, a fim de aumentar a eficiência do tratamento. Dentre os polímeros utilizados para o recobrimento da superfície de nanoestruturas, podemos salientar o polietileno glicol (PEG), formado por várias cadeias de óxido de etileno. Constitui um polímero com caráter hidrofílico não-iônico. Quando o PEG é adicionado a nanocarreadores, confere à nanoestrutura maior tempo de circulação no organismo por não se conjugar a proteínas plasmáticas, protege as nanoemulsões da opsonização pelo sistema imune, além de interagir mais facilmente com microambiente tumoral e se acumular no local de interesse. (CHEN et al, 2016; PAUTU et al, 2017)

Um componente importante das nanoemulsões é o agente emulsificante, também conhecido como tensoativo, que corresponde a uma molécula anfifílica capaz de interagir com moléculas polares como a água e com moléculas apolares como lipídeos presentes em óleos naturais. (GANTA, 2014)

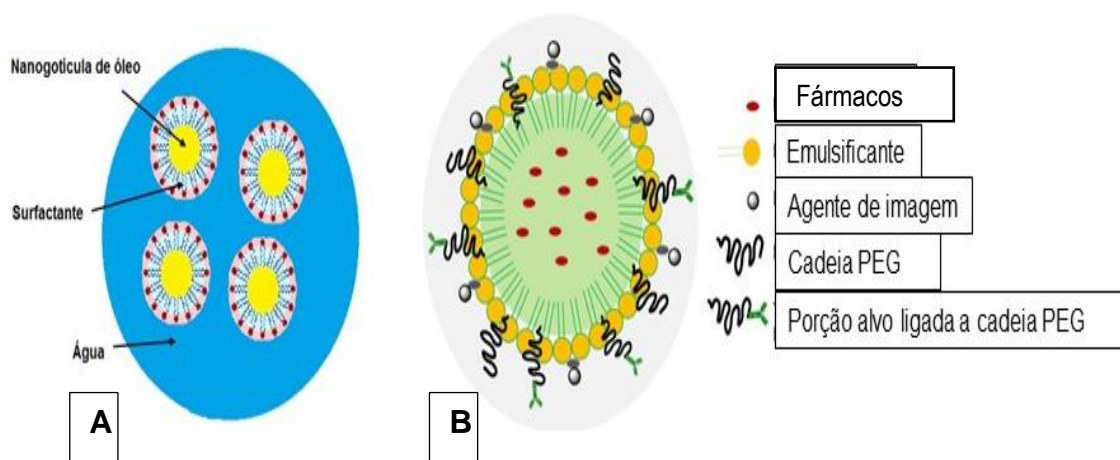


Figura 5 A) Esquema de nanoemulsão óleo em água. (ARAÚJO,2017) B) Representação de nanoemulsão recoberta com polietilenoglicol (PEG). Adaptado de GANTA et al, 2014.

As nanoemulsões possibilitam a administração de moléculas hidrofóbicas por diferentes vias de administração como a parenteral ou a transdérmica, (por exemplo, que exigem uma hidrosolubilidade dos fármacos administrados), aumentando a biodisponibilidade e protegendo o fármaco de efeitos de degradação pelo sistema imune, por exemplo. Dessa forma, essas nanoestruturas possibilitam uma maior entrega do fármaco no tecido alvo, facilitando o seu acúmulo e reduzindo a interação com células não alvo (PARK et al., 2008; MARCATO et al., 2009; FIGUEIRAS et al., 2014; ABDI, 2015). Além do aumento da biodisponibilidade e proteção das drogas aos efeitos do metabolismo, as nanoemulsões apresentam outras vantagens em relação aos tratamentos convencionais tais como maior estabilidade, liberação sustentada de medicamentos, maior tempo de circulação no sangue, redução de doses e minimização dos efeitos tóxicos. (RIGON, 2015)

Devido as suas características e vantagens, as nanoemulsões tem sido estudadas para serem aplicadas na via de administração transdérmica, cuja ação tópica é ideal para doenças como o câncer de pele. As nanoemulsões conferem a formulação alta permeação, capacidade de carreamento e baixa irritabilidade no local. (DIANZANI, 2014). A via de administração transdérmica Apresenta vantagens em tratamentos em que a pele é o principal alvo, na administração de fármacos que não

possuem biodisponibilidade adequada por via oral ou intravenosa, ou quando há a necessidade de se evitar o metabolismo de primeira passagem (RÖMGENS, et al.,2015). Entretanto tais vias apresentam algumas limitações. Segundo Silva (2010), a permeação de substâncias na pele depende, principalmente, de suas propriedades físico-químicas, do seu comportamento quando colocado em um sistema farmacêutico apropriado e, finalmente, da pele. No entanto, estas limitações podem ser contornadas com o uso de nanoemulsões.

Apesar de promissores efeitos antitumorais do açaí e do uso da nanotecnologia como adjuvante no tratamento do câncer, há poucos estudos que investigam os efeitos do óleo de açaí nanoestruturado em câncer de pele melanoma até o presente momento. Pesquisas enfatizam o potencial do açaí como alternativa para o tratamento do câncer. O estudo de Monge-Fuentes (2016) utilizando nanoemulsões de óleo de açaí combinadas com terapia fotodinâmica diminuíram a viabilidade celular de linhagem de melanoma B16F10 (*in vitro*); e o tamanho do tumor *in vivo*. Em seu estudo ARAÚJO (2017), observou efeito citotóxico de nanoemulsões a base de óleo de açaí em linhagem de câncer de pele não-melanoma e também em terapia combinatória com ácido anacárdico.

Este trabalho tem como objetivo combinar os avanços da nanotecnologia e a biodiversidade brasileira, através de nanoemulsões de óleo de açaí a fim de demonstrar novas perspectivas de tratamento do câncer de pele melanoma e alternativa para contornar a resistência a quimioterapia do melanoma.

2. JUSTIFICATIVA

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) no Brasil estimou 5.670 novos casos de câncer de pele melanoma a serem diagnosticados em 2016, sendo 3.000 em homens e 2.670 em mulheres. Os tratamentos convencionais (cirurgia e quimioterapia entre outros) apresentam vários efeitos adversos a nível biológico e psicológico no paciente, o que limitam sua aplicação. Portanto, o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de câncer de pele melanoma se tornou uma necessidade. Para este fim, a biodiversidade brasileira apresenta-se como uma fonte de compostos bioativos e moléculas com atividade antitumoral promissora. Destaca-se o açaí, *Euterpe oleracea Martius* que possui compostos polifenólicos e moléculas antioxidantes como as antocianinas em seu óleo, que já demonstraram atividade antitumoral em diversos tipos de cânceres. Entretanto, a administração de tais moléculas é limitada devido ao seu caráter hidrofóbico. Dessa forma, o uso da nanotecnologia com a formulação de nanoemulsão, permite aumentar a biodisponibilidade do fármaco e reduzir os possíveis efeitos adversos associados. Além disso, a eficiência de nanoemulsões em carrear ativos por via transdérmica representa uma inovação para aplicação futuras. Por fim, não existem muitos estudos relatando a atividade antitumoral de nanoemulsões de óleo de açaí em câncer de pele melanoma e sua influência sobre ciclo celular e fragmentação do DNA.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de nanoemulsões de óleo de açaí para o tratamento de câncer de pele melanoma e investigar seu possível mecanismo de ação.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de nanoemulsões de óleo de açaí na viabilidade de células de câncer de pele melanoma (B16F10), *in vitro*.
- Analisar o efeito de nanoemulsões de óleo de açaí na proliferação celular por meio da contagem do número total de células e avaliação do ciclo celular de células de câncer de pele melanoma (B16F10), *in vitro*.
- Investigar o efeito de nanoemulsões de óleo de açaí sobre aspectos de morte celular por meio da avaliação da integridade da membrana plasmática e fragmentação do DNA de células de câncer de pele melanoma (B16F10), *in vitro*.

4. METODOLOGIA

Toda a infraestrutura e apoio técnico necessários para os experimentos foram disponibilizados pelo Laboratório de Nanobiotecnologia (IB/UnB). O presente projeto conta com o financiamento de recursos do Edital Universal 2014 (CNPq – Processo: nº447483/2014-5).

4.1 Óleo de açaí nanoestruturado

Foram utilizados óleos extraídos de frutos de açaí disponíveis comercialmente (Mundo dos óleos, Brasil). Todos os experimentos foram realizados com o mesmo lote de óleo. As nanoformulações à base de óleo de açaí foram elaboradas e fornecidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia (IB/UnB). Foram utilizadas nanoemulsões a base de óleo de açaí com superfície negativa (AÇNE-) e com superfície recoberta com polietileno glicol “*Polyoxyl 40 stearate*” (AÇPEG). A técnica utilizada para produção das nanoemulsões de óleo de açaí, assim como seus componentes estão veladas por existência de processo de patente.

4.2 Caracterização de nanoemulsões

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão das nanoestruturas foram determinados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasizer (Malvern, EUA). A carga superficial foi mensurada pelo método de mobilidade eletroforética, utilizando o mesmo aparelho.

4.3 Cultura de Células

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

4.4 Tripsinização das células

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

4.5 Avaliação da Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular, as células de câncer de pele melanoma foram incubadas na densidade de 2000 células por poço, em placa de cultura de 96 poços. Esperou-se o tempo de 24 horas incubando a placa em estufa a 37°C e 5% de CO₂, para que as células fossem aderidas na placa de cultura de 96 poços. Em seguida, as células foram expostas às nanoemulsões de açaí por um período de 24 horas. As concentrações de nanoemulsões e seus respectivos brancos foram as seguintes: 22,5 µg/mL; 45 µg/mL; 90 µg/mL; 180 µg/mL e 360 µg/mL. Para o tratamento de óleo de açaí livre (não- nanoestruturado) foi preparada solução de óleo de açaí diluído em etanol absoluto na mesma concentração que a presente nas nanoemulsões, sendo a concentração de etanol por poço menor que 1 %.

Os tratamentos utilizados nos ensaios *in vitro* constam na tabela 1:

Tabela 1 Composição dos tratamentos utilizados nos ensaios *in vitro*.

| SIGLAS | COMPOSIÇÃO |
|---------------|---|
| CTL | DMEM e água |
| AÇNE | Nanoemulsão de óleo de açaí (surfactante, óleo e água) |
| L- | Branco da AÇNE (surfactante e água) |

| | |
|-------|--|
| AÇPEG | Nanoemulsão de óleo de açaí com PEG (surfactante, óleo, água e polietilenoglicol) |
| PEG | Branco da AÇNE (surfactante, água e polietilenoglicol) |
| O.L | Óleo de açaí livre diluído em etanol absoluto |
| ETOH | Controle de etanol absoluto |

Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazol). Para tanto, o meio de cultura contendo as formulações foi descartado e as células tratadas foram expostas ao MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM), por período de 1h e 30 minutos- 2h na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma - EUA) foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em equipamento espectrofotômetro a 595 nm.

4.6 Verificação da fase do ciclo celular e fragmentação de DNA

As células foram transferidas para uma placa de cultura de 12 poços numa densidade de $2,5 \times 10^4$ células/poço e incubadas com óleo de açaí nanoestruturado e seus respectivos brancos por 24 horas na concentração de 360 µg/mL. Para a determinação do ciclo celular e da fragmentação de DNA, as células tratadas foram lavadas com PBS 1X e armazenadas em solução de etanol 70% a -20° C. Após 24 horas, as células foram incubadas com uma solução de RNase (50 µg/mL) e de iodeto de propídeo (20 µg/mL diluído em PBS, pH 7,4) por 30 minutos cada e posteriormente analisadas por citometria de fluxo (BD, EUA). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos.

4.7 Avaliação de integridade de membrana e proliferação celular

O plaqueamento para o teste de avaliação da integridade de membrana e proliferação celular foi realizado da mesma maneira que a citometria, em placa de 12 poços contendo $2,5 \times 10^4$ células/poço. Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o pellet obtido foi ressuspenso em 100 μ L de meio de cultura. As células foram coradas com uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS – Sigma, EUA). O número de células totais foi determinado em câmara de Neubauer, contando-se células coradas ou não coradas. Foi considerado como células com membrana intacta, aquelas não coradas; e as coradas de azul, como células com membrana plasmática lesionada.

4.8 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e submetidos a análises estatísticas em programa Prism 5. 01 (EUA). A normalidade dos dados foi verificada por testes KS, Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson. Para se verificar diferenças estatísticas entre as médias dos grupos considerou-se valor de $P < 0,001$, e o desvio padrão, e para tal, utilizou-se o teste de variância ANOVA e o pós-teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das nanoemulsões

Através da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) foi possível observar a presença de nanogotículas nas formulações após 24 horas de sua obtenção. Na tabela 2 pode-se observar que o diâmetro hidrodinâmico das nanogotículas contendo o óleo de açaí ficaram em 198 nm para a AÇNE- e 78,8 nm para a AÇPEG. Todos os índices de polidispersão apresentaram valor menor que 0,4 e a carga superficial das nanogotículas mostrou-se negativa. A carga superficial da nanogotícula apresentou-se dentro dos parâmetros estabelecidos por Maeda e colaboradores (2013), que sugere que as nanoemulsões possuam cargas superficiais ligeiramente negativas a fim de que não interajam com a superfície dos vasos sanguíneos que possui carga negativa.

O pH das formulações foi determinado com valor de 7 (Tabela 2) e está dentro do esperado para formulações que são administradas por via parenteral, uma vez que o pH sanguíneo é 7.

O diâmetro hidrodinâmico das nanogotículas formadas está dentro do intervalo aceito para que ocorra um transporte passivo para dentro do microambiente tumoral. Além disso, o efeito EPR (enhanced permeation and retention) pode facilitar uma melhor permeação, retenção e acumulação das nanogotículas no tumor. Esse efeito EPR está associado com a formação de novos vasos sanguíneos pelo tecido tumoral. Este fenômeno é chamado de angiogênese e é considerado imperfeito e incompleto pois forma vasos com fenestras de 100 a 780 nm. (CHEN et al, 2016).

As nanoemulsões recobertas com PEG (AÇPEG) apresentaram diâmetro hidrodinâmico menor que o das nanoemulsões não recobertas, o que está de acordo com estudos anteriores. Esse perfil acontece devido a capacidade do PEG de agir como porção hidrofílica do surfactante. (ARAÚJO,2017)

Tabela 2 Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmica das nanoemulsões de óleo de açaí (AÇNE) e seus respectivos brancos desenvolvidas com e sem cobertura da superfície com PEG armazenadas em condição de temperatura 4° C após 1 dia de sua formulação.

| GRUPOS | DIÂMETRO HIDRODINÂMICO(nm) | ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO | CARGA SUPERFICIAL(mV) | pH |
|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| AÇNE- | 198,0 | 0,235 | -15,8 | 7 |
| L- | 106,6 | 0,313 | -14,2 | 7 |
| AÇPEG | 78,83 | 0,211 | -13,6 | 7 |
| PEG | 87,26 | 0,259 | -10,7 | 7 |

5.2 Avaliação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi verificada por meio de ensaio de MTT, onde as células foram expostas por durante 24 horas às nanoemulsões AÇNE-, AÇPEG, óleo livre e seus respectivos brancos nas concentrações de 22,5 µg/mL; 45 µg/mL; 90 µg/mL; 180 µg/mL e 360 µg/mL. Estes grupos de tratamentos foram comparados com o controle cuja viabilidade foi tomada como 100%. Os grupos de concentração de 22,5 µg/mL e 45 µg/mL foram testados e não houve redução na viabilidade celular.

Os dados obtidos estão descritos nos gráficos abaixo (Figuras 6 e 7). O controle foi considerado o valor absoluto de 100% de viabilidade celular e todos os grupos foram comparados a este.

O conjunto de grupos experimentais denominados “Branco ” (L-, PEG e ETOH) são os componentes das formulações sem o óleo de açaí, ou seja, somente os excipientes. Estes grupos foram testados para que fosse verificado se a atividade citotóxica observada é realmente do óleo nanoestruturado (Figura 6).

Como podemos observar na figura 6, os grupos de tratamento dos brancos, ou seja, os excipientes da formulação, não diminuíram significativamente a viabilidade

das células de câncer de pele melanoma. A amostra de PEG na concentração de 360 µg/ mL reduziu ligeiramente a viabilidade celular, mas podemos considerar biologicamente significativo (**: $p < 0,001$). Isso indica que a formulação sem o óleo não é tóxica às células, fazendo com que nanoemulsão “vazia” seja promissora para carrear óleos e outros tipos de princípios ativos.

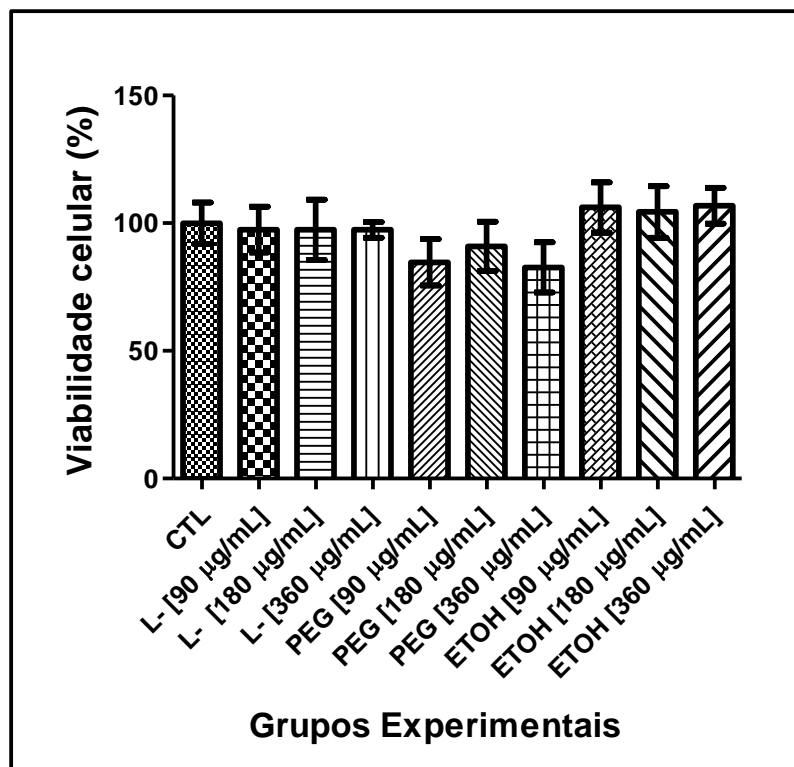


Figura 6 Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de pele melanoma de murino (B16F10) submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de nanoemulsões de L- (surfactante e água); PEG (polietileno glicol, surfactante e água) e ETOH

Na figura 7, pode-se observar a viabilidade celular após exposição com as nanoemulsões de açaí e o óleo livre. Pode-se notar que o óleo livre (não nanoencapsulado) não apresentou atividade na viabilidade celular, quando comparado ao controle, o que indica que possivelmente seu perfil hidrofóbico não é capaz de permear barreiras celulares e atuar nas células tumorais.

Já nos tratamentos com nanoemulsões do óleo de açaí, pode-se perceber uma redução significativa na viabilidade celular, superior a 35%. A AÇNE manteve a viabilidade celular de $61,9 \pm 3,6$ % para a concentração de 90 µg/mL; $59,7 \pm 5,9$ %

para a concentração de 180 µg/mL; e $52,7 \pm 8,8\%$ na concentração de 360 µg/mL. A AÇNE apresentou diferença significativa em todas as concentrações testadas quando comparado com o controle ($p < 0,0001$). No entanto, não houve diferença significativa na taxa de viabilidade celular entre as concentrações, o que indica que o tratamento é independente de dose.

As nanoemulsões de óleo de açaí associadas a PEG (polietileno glicol) também reduziram a viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle. A porcentagem de viabilidade celular da linhagem celular B16F10 exposta ao tratamento de 24 horas de AÇPEG foi de $61,5 \pm 7,3\%$ para concentração de 90 µg/mL; $52,3 \pm 4,5\%$ para concentração de 180 µg/mL; e $48,6 \pm 6,1\%$ na concentração de 360 µg/mL. As diferentes concentrações não apresentaram diferença significativa entre si.. Pode-se concluir que os tratamentos à base de nanoemulsões de óleo de açaí e PEG possuem ação citotóxica nas condições avaliadas, porém a mesma não é dose-dependente.

A ação independente de dose observada na atividade antitumoral das nanoemulsões de óleo de açaí pode ser devido a ação em via específica de inibição da viabilidade celular. Tal modo de ação confere ao ativo maior especificidade de ação no local desejado e menor interação com células saudáveis o que diminui a ocorrência de efeitos adversos.

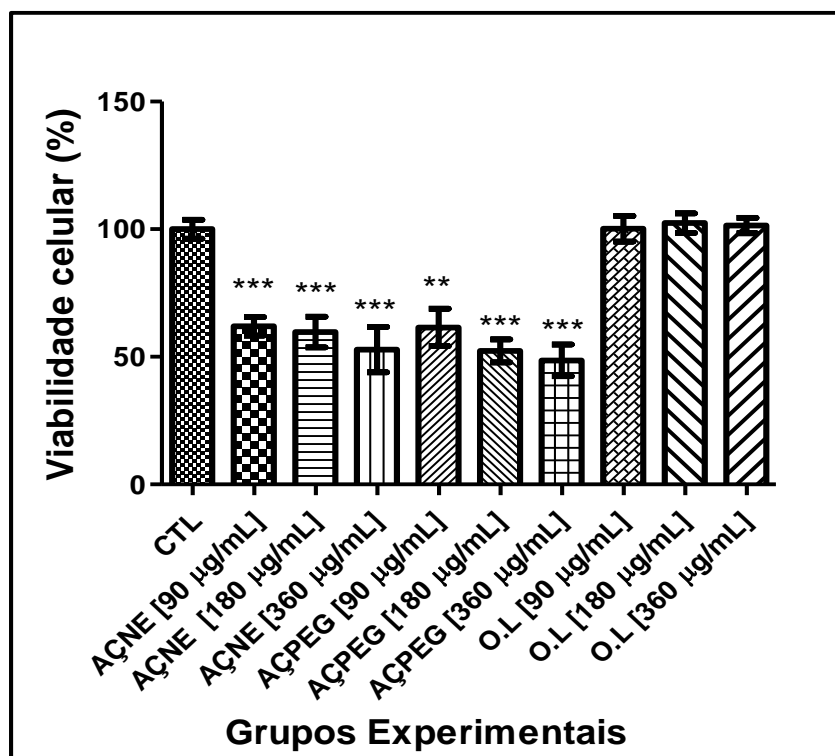


Figura 7 Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células de câncer de pele melanoma de murino (B16F10) submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de nanoemulsões de AÇNE (nanoemulsão de óleo de açaí); AÇPEG (nanoemulsão de polietileno glicol e óleo de açaí); e óleo livre (O.L) comparados com controle (CTL) por 24 horas. Representação de média \pm desvio padrão. Teste ANOVA e pós-teste Tukey (***: $p < 0,0001$) juntamente com o desvio padrão.

Com este ensaio pode-se mostrar que as nanoemulsões de óleo de açaí diminuíram a viabilidade celular de células tumorais como já encontrado em estudos anteriores (ARAÚJO, 2017; MONGE-FUENTES, 2016 e DEL POZO-INSFRAN, 2006). A inovação deste presente estudo foi a utilização de surfactante diferente dos empregados em trabalhos anteriores. Além disso, nanoemulsão foi associada com PEG.

Em estudos anteriores com nanoemulsões de óleo de açaí em câncer de pele não-melanoma, a viabilidade celular de células A431 foi reduzida em média 30% após 24 horas de exposição (ARAÚJO, 2017). Em outro estudo, a nanoemulsão de açaí foi combinada com terapia fotodinâmica reduzindo a viabilidade celular em 85%, sugerindo que nanoemulsões de açaí pode ser utilizada como fotossensibilizante. (MONGE-FUENTES, 2016)

No trabalho de Freitas e colaboradores (2017), as frações hidro alcólicas do extrato de açaí diminuíram a viabilidade celular de células de cancer de mama MCF-7 em aproximadamente 25% após tratamento de 24 horas, um pouco abaixo do que encontramos neste estudo. As frações hidro alcoólicas seriam uma alternativa de contornar a hidrofobicidade do óleo de açaí e seus compostos. No entanto, o achado nesse estudo com o tratamento utilizando a nanotecnologia, alcança uma maior redução na viabilidade celular.

As frações extraídas de açaí também foram testadas como tratamento em células de leucemia HL-60, onde diminui a viabilidade celular em 24 horas, obtendo taxa de mortalidade maiores que 50%. (DEL POZO-INSFRAN,2006)

No presente estudo, as nanoemulsões de óleo de açaí apresentaram redução na viabilidade das células de câncer de pele melanoma quando comparadas ao controle no tempo de exposição de 24 horas. O tipo de superfície da nanoemulsão não influencia em sua atividade citotóxica, que também é devido ao óleo nanoestruturado e não aos excipientes da formulação. O uso de nanoemulsões para veicular o óleo de açaí é eficiente para o tratamento de células tumorais B16F10, já que o mesmo óleo de açaí livre não foi capaz de reduzir a viabilidade celular desta linhagem.

Diante dos resultados do ensaio de viabilidade celular, escolhemos as formulações de AÇNE e AÇPEG 360 µg/mL para continuarmos os experimentos e investigarmos os efeitos das mesmas no número total de células, integridade de membrana plasmática, no ciclo celular e na fragmentação do DNA.

5.3 Avaliação da integridade de membrana

O ensaio com azul de tripan foi utilizado para avaliar a integridade de membrana das células de câncer de pele melanoma (B16F10) e a proliferação celular, quando

submetidas aos tratamentos com nanoemulsões de óleo de açaí durante 24 horas e na concentração de 360 µg/mL.

Neste ensaio, o controle apresentou $95,3 \pm 5,0\%$ de células com membrana intacta e $4,6 \pm 5,0\%$ de células com membrana lesionadas (Figura 8). Quanto aos tratamentos, o tratamento que mais apresentou células com membrana lesionada foi o grupo AÇPEG, no entanto sua porcentagem não foi diferente significativamente quando comparada ao controle, assim como os outros grupos de tratamentos. Portanto, este ensaio sugere que as nanoemulsões de açaí e seus respectivos brancos não causam lesões na membrana celular.

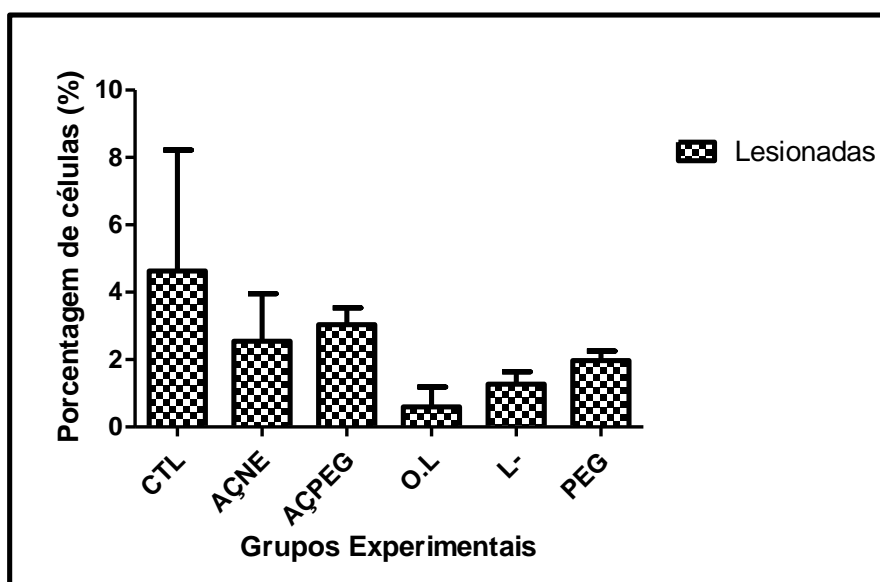


Figura 8 . Porcentagem de células de câncer de pele melanoma B16F10 com lesão de membrana plasmática após exposição por 24 horas às nanoemulsões de óleo de açaí e seus respectivos brancos a 360 µg/mL em comparação ao controle água ultrapura (CTL). Teste ANOVA e post-teste Tukey. Não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento e o controle.

De acordo com este ensaio sugere-se que o mecanismo que induz redução na viabilidade celular de linhagem de câncer de pele melanoma por nanoemulsões de óleo de açaí, não aconteça por necrose, já que a presença de células com membrana lesionada é um indício deste tipo de morte celular. Outros ensaios podem ser realizado para a confirmação da exclusão dessa hipótese por meio da citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídio, por exemplo.

5.4 Verificação da fase do ciclo celular, fragmentação de DNA e proliferação celular

No ensaio de verificação do ciclo celular obtivemos a quantidade de células em cada fase do ciclo (G1, S, G2/M) que estão representados nos histogramas abaixo (Figura 9).

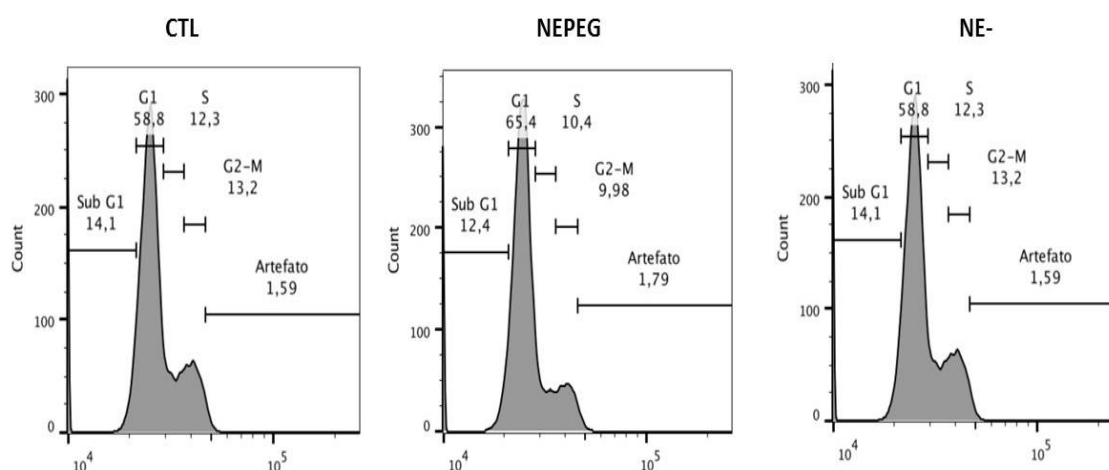


Figura 9 Histogramas da verificação das fases do ciclo celular de células de câncer de pele melanoma de murino (B16F10) marcadas com iodeto de propídio, sendo os grupos controle (CTL) e as células tratadas com nanoemulsões de óleo de açaí na concentração de 360 µg/mL com (AÇPEG) e sem PEG (NE-).

Na figura 10 podemos observar o padrão de ciclo celular das células B16F10 quando submetidas a citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada etapa do ciclo celular (G1, S, G2/M) foi comparada com o controle que obteve 60,4% das células em fase G1, 17,7% em fase S e 21,8% em fase G2/M. Os grupos de amostras de nanoemulsão de óleo de açaí, AÇNE e AÇPEG, obtiveram diferença significativa da quantidade de células nas fases do ciclo celular. Podemos observar um aumento da porcentagem de células em fase G1 nos dois grupos (AÇNE e AÇPEG), o que ocasiona uma diminuição da proporção de células nas outras fases do ciclo. A amostra AÇNE aumentou 10% a proporção de células na fase G1, enquanto a AÇPEG induziu um aumento de 17%.

O grupo L-, contendo apenas lecitina, apresentou diferença significativa na fase G2/M com 3% a menos de células, quando comparada ao controle. No entanto, o

grupo AÇNE diminuiu 7% do número de células nesta fase, fazendo com que houvesse diferença significativa entre estes grupos, sendo a AÇNE mais eficaz em parar o ciclo celular na fase G1 e diminuir na fase G2/M, do que o branco L- fazendo-nos concluir que o óleo de açaí possui ação no ciclo celular.

Quando comparadas entre si, a AÇPEG obteve melhor resposta na mudança do perfil do ciclo celular do que a AÇNE.

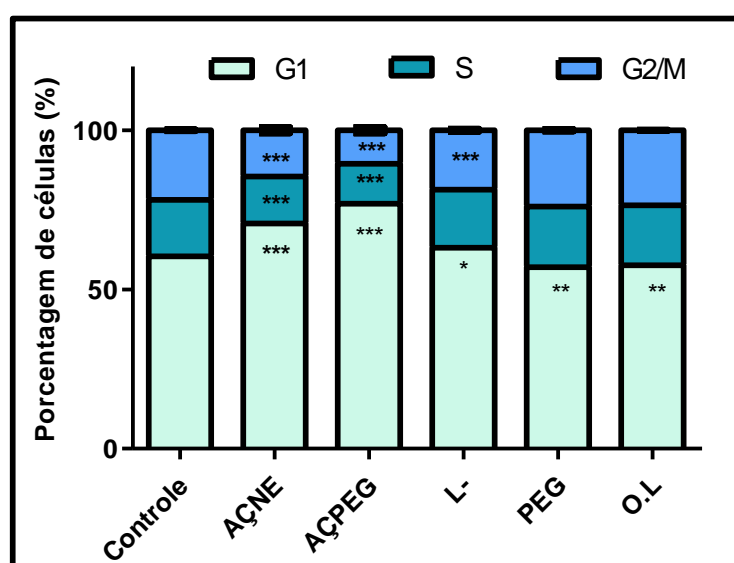


Figura 10 Avaliação do ciclo celular por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AÇNE (nanoemulsão de açaí), AÇPEG (nanoemulsão de óleo de açaí associada a polietileno glicol), O.L (óleo de açaí), L- (surfactante), e PEG (polietileno glicol e surfactante) a 360 µg/mL de células de câncer de pele melanoma (B1610). Teste ANOVA e pós-teste Tukey, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***: $P < 0,0001$).

A avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo está disposta na figura 11, onde pode-se observar que os grupos de nanoemulsão AÇNE e AÇPEG e o óleo livre (O.L) aumentaram a porcentagem de células com DNA fragmentado, e no caso das nanoemulsões, também diminuíram o número de células com DNA íntegro (Figura 10). Os achados nesse estudo de fragmentação do DNA corroboram com os encontrados no ensaio de ciclo celular. Segundo Fofaria e colaboradores (2014), o dano ao DNA representado neste estudo pelo DNA fragmentado faz com que as células fiquem aprisionadas na fase G1 a fim de que não continuem o ciclo celular devido a defeitos no material genético. Caso o dano seja reparado as células seguem

o ciclo celular, caso contrário, entram em processo de apoptose. Em um estudo, o extrato de piperina foi testado e foi capaz de manter as células em fase G1 e causar apoptose nas células de câncer de pele melanoma B16F10 e SK MEL 28 (FOFARIA et al, 2014).

No estudo de Araújo (2017), foi observado parada do ciclo celular na fase G1 de células de câncer de pele não-melanoma A431 causada por tratamento com nanoemulsões de óleo de açaí e também em combinação com ácido anacárdico. Em outro estudo células de câncer de pele melanoma B16F10 expostas a nanoemulsão de óleo de açaí e terapia fotodinâmica apresentaram perfil de morte celular por apoptose tardia/necrose.(MONGE-FUENTES, 2016)

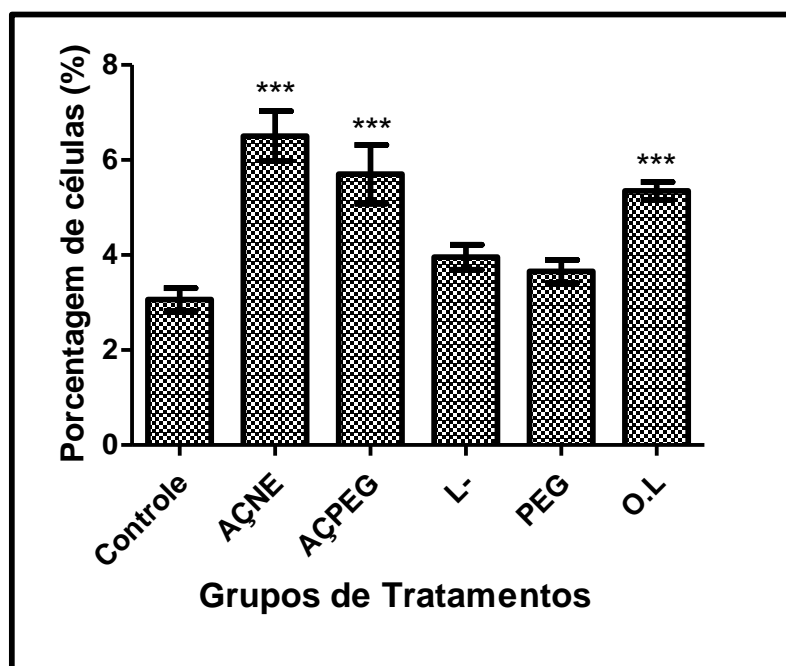


Figura 11 Avaliação da fragmentação de DNA por Citometria de fluxo após 24 horas de exposição às AÇNE (nanoemulsão de açaí), AÇPEG (nanoemulsão de óleo de açaí associada a polietileno glicol), O.L (óleo de açaí), L- (surfactante), e PEG (polietileno glicol e surfactante) a 360 µg/mL de células de câncer de pele melanoma (B1610). Teste ANOVA e pós-teste Tukey, diferença significativa quando comparado com o grupo controle (***:P<0,0001).

No ensaio de azul de tripan para avaliação do número total de células, os grupos analisados não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle (Figura 12). Pode-se notar apenas uma tendência à diminuição do número

total de células que pode indicar início de morte celular ou parada no ciclo celular. Este dado não exclui a diminuição da viabilidade celular já que o ensaio de MTT avalia a capacidade da mitocôndria reduzir o MTT em cristais de formazan. Portanto, pode acontecer das mitocôndrias estarem anormais, mas as células não entraram ainda em processo de morte.

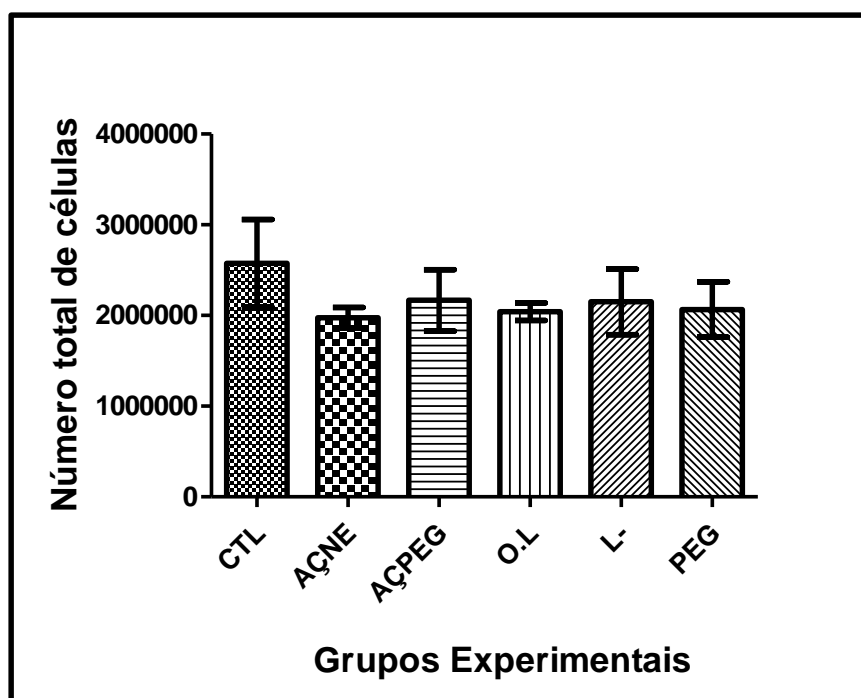


Figura 12 Avaliação por Azul de tripan do número total de células de câncer de pele melanoma B16F10 após exposição por 24 horas às AÇNE (nanoemulsão de açaí), AÇPEG (nanoemulsão de óleo de açaí associada a polietileno glicol), O.L (óleo de açaí), L- (surfactante) e PEG (polietileno glicol e surfactante) a 360 µg/mL. Contagem das células em câmara de Neubauer. Não se observou diferença significativa quando comparado com o controle (CTL) em teste ANOVA e post-teste Tukey.

6. Conclusão e perspectivas

O óleo de açaí constitui uma fonte rica em compostos bioativos com propriedades antioxidantes e atividade antitumoral já descritas. A fim de melhorar a eficácia do tratamento com biocompostos como óleos, que possuem características físico-químicas limitantes (hidrofobicidade e oxidação por luz), o uso de nanoestruturas como as nanoemulsões mostra-se uma alternativa inovadora. Com a possibilidade de associar-se tais estruturas a polímeros como o polietileno glicol, aumenta-se as vantagens destes tratamentos em células tumorais como é o caso do câncer de pele melanoma.

Neste estudo, o uso de nanoemulsões de óleo de açaí associadas ou não a polímero PEG no tratamento de câncer de pele melanoma, *in vitro*, reduziu a viabilidade da linhagem celular B16F10, causaram parada no ciclo celular na fase G1 e aumentaram a proporção de células com fragmentação de DNA. Além disso, após 24 horas de exposição, não foi possível observar lesão de membrana plasmática.

Em conjunto, esses dados sugerem um mecanismo de morte celular por apoptose e bloqueio do ciclo celular. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar a suposição de mecanismo de ação por apoptose, tais como ensaios de caspase, Anexina V, além da investigação da atividade das nanoemulsões de óleo de açaí sobre o perfil de invasão e metástase das células de câncer de pele melanoma.

7. Referências

- ALADOWICZ, E. et al. Molecular networks in melanoma invasion and metastasis. *Future oncology*, v. 9, n. 5, p. 713-726, 2013.
- ARAÚJO, H. L.L. , Efeitos de combinações entre o ácido anacárdico derivado da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e o óleo de açaí (*Euterpe oleracea mart.*), livres ou nanoestruturados, no tratamento de células de câncer de pele não melanoma, *in vitro*, 2016.
- BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*, v. 66, p. 2-25, 2014.
- CHEN, S. et al. Targeting tumor microenvironment with PEG-based amphiphilic nanoparticles to overcome chemoresistance. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 2, p. 269-286, 2016.
- DE LIMA YAMAGUCHI, K. K. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. *Food chemistry*, v. 179, p. 137-151, 2015.
- DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. Açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 4, p. 1222–1229, 2006.
- DIANZANI, C., et al. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.
- DIAS, M.M.S, et al, Pro-Apoptotic Activities of Polyphenolics From Açaí (*Euterpe oleracea Martius*) in Human SW-480 Colon Cancer Cells, *Nutrition and Cancer*, vol. 66, p. 1394-1405, 2014.
- DWIVEDI, A. et al., In vitro anti-cancer effects of artemisone nano-vesicular formulations on melanoma cells, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 11, p. 2041–2050, 2015.
- FIGUEIRAS, A.R.R., et. al., Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas, *Boletim Informativo Geum*, vol. 5, p. 14-26., 2014.
- FOFARIA, N. M.; KIM, S.; SRIVASTAVA, S. K. Piperine causes G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. *PloS one*, v. 9, n. 5, p. e94298, 2014.

- FREITAS, D. DA S. et al. Cytotoxic analysis and chemical characterization of fractions of the hydroalcoholic extract of the *Euterpe oleracea* Mart. seed in the MCF-7 cell line. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, p. 1–8, 2017.
- GANTA, S. et al. Nanoemulsions in translational research—opportunities and challenges in targeted cancer therapy. *Aaps Pharmscitech*, v. 15, n. 3, p. 694-708, 2014.
- GAO, Y. et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 4, p. 761-777, 2014.
- GODAR, D. E.; LANDRY, R. J.; LUCAS, A. D. Increased UVA exposures and decreased cutaneous Vitamin D 3 levels may be responsible for the increasing incidence of melanoma. *Medical hypotheses*, v. 72, n. 4, p. 434-443, 2009.
- HANAHAN, D. ; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HULL, L. C.; FARRELL, D.; GRODZINSKI, P. Highlights of recent developments and trends in cancer nanotechnology research—View from NCI Alliance for nanotechnology in cancer. *Biotechnology advances*, v. 32, n. 4, p. 666-678, 2014.
- INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> Acesso em: 15 de maio de 2017.
- KANWAR, J. R.; SINGH, N.; KANWAR, R. K. Role of nanomedicine in reversing drug resistance mediated by ATP binding cassette transporters and P-glycoprotein in melanoma. *Nanomedicine*, v. 6, n. 4, p. 701–714, 2011.
- LI, J. et al., Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 11, p. 769-794, 2014.
- MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced drug delivery reviews*, v. 91, p. 3-6, 2015.
- MARCATO, P. et. al. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas, *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2, p. 1 - 37, 2009.

- MAZHAR, K. et al. Role of vitamin E in prevention of human esophageal squamous cell carcinoma : a review Esophageal squamous cell cancer. *Science Letters*, v. 3, n. 2, p. 89–93, 2015.
- MONGE-FUENTES, V. et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 166, p. 301-310, 2017.
- OMBREDANE, A. S.. Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* associadas à quitosana e avaliação da atividade antitumoral in vitro em câncer de pele não melanoma (linhagem A431). 2016.
- PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 4631–4636, 2008.
- PALA, D. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. *Clinical Nutrition*, 2015.
- PARK, J.H. et al. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science*, v. 33, p. 113-137, 2008.
- PAUTU, V. et al. Nanomedicine as a potent strategy in melanoma tumor microenvironment. *Pharmacological Research*, 2017.
- RIGON, R. B. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: A review. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 16–20, 2015.
- RÖMGENS, A. M. et al, Diffusion profile of macromolecules within and between human skin layers for (trans)dermal drug delivery, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 50, p. 215-222, 2015.
- RUGINĂ, D. et al. Antiproliferative and Apoptotic Potential of Cyanidin-Based Anthocyanins on Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 5, p. 949, 2017.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas, Revista de Ciências Farmacêuticas Basica e Aplicada., v.31, p. 125-131, 2010.

WHO, Ultraviolet radiation and the INTERSUN Programme, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>
Acesso em: 16 de maio de 2017.