



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**VITÓRIA REGINA PEREIRA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOEMULSÕES À BASE DE  
ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*), OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS  
DE EXTRAÇÃO, EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***

**BRASÍLIA, 2023**



VITÓRIA REGINA PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOEMULSÕES À BASE DE  
ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*), OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS  
DE EXTRAÇÃO, EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***

Monografia de Conclusão de Curso  
apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Farmacêutico, na  
Universidade de Brasília, Faculdade de  
Ceilândia.

**Orientador: Prof(a). Dr<sup>a</sup> Graziella Anselmo Joanitti**

**Co-orientador: Prof. Dr Marcelo Henrique Sousa**

BRASÍLIA, 2023

VITÓRIA REGINA PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOEMULSÕES À BASE DE  
ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense*), OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS  
DE EXTRAÇÃO, EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***

**BANCA EXAMINADORA**

Orientador(a): Prof(a). Dr<sup>a</sup> Graziella Anselmo Joanitti  
(Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia)

Co-Orientador: Prof. Dr Marcelo Henrique Sousa  
(Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia)

Prof(a). Dr<sup>a</sup> Laise Rodrigues de Andrade  
(Universidade de Brasília – Instituto de Biologia)

Prof. Dr João Paulo Figueiró Longo  
(Universidade de Brasília – Instituto de Biologia)

**Aprovado no dia 06 de julho de 2023**

BRASÍLIA, 2023

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todas as Graças com as quais me apresentou e conduziu em toda a minha vida.

À São Josemaria Escrivá, por me ensinar que “uma hora de estudos é uma hora de oração”. Obrigada, querido Padre.

Agradeço infinitamente aos meus pais, Dilma e Cleverson, por terem me dado a vida e por a terem colorido com tanto amor e carinho. Eu amo muito vocês!

À toda minha família e em especial à minha Tia Maria, essa mulher extremamente forte que me ensinou desde cedo a lutar.

À minha madrinha e sua família, muito obrigada por todo acolhimento, carinho e momentos felizes.

Aos amigos da farmácia, muito obrigada por todo o companheirismo durante toda a graduação e pelos passeios malucos. Vocês são demais!

Às minhas queridas amigas Beatriz, Cecília e Gisela. Muito obrigada por todos os momentos de escuta e por sempre acreditarem em mim. Vocês são muito especiais!

À minha querida orientadora Grazi, obrigada por me gerar como pesquisadora. Tenho muito orgulho de ser sua aluna!

À todos do LCBNano, obrigada por acreditarem no meu trabalho e por tornarem esse laboratório um ambiente de trabalho acolhedor. Em especial, a Elysa e a Carol, por todo o companheirismo durante a realização dos experimentos e por todos os momentos alegres. À Dr<sup>a</sup> Alicia, por ser uma grande inspiração como pesquisadora.

Ao Samuel, agradeço pela companhia e auxílio durante a formulação das nanoemulsões. Muito obrigada!

Ao Lucas Campos, por ter me treinado tão bem nas técnicas de cultivo celular.

Aos companheiros da sala do microtomógrafo, Alan e Joabe. Muito obrigada pela amizade e por compartilharem comigo as suas bagagens científicas e por suportarem as minhas inúmeras videochamadas.

Ao Prof. Marcelo por ter aceito a co-orientação deste trabalho e por todo o suporte.

Agradeço aos membros da banca, Prof<sup>a</sup> Laise e Prof João por terem aceito o convite de comporem a banca.

À Jane Austen, Charlotte Brontë, Fiodor Dostoiévski, Charles Dickens, Lev Tolstoi, J. R. R. Tolkien, Victor Hugo e A. D. Sertillanges por compartilharem comigo as suas percepções e histórias que me deram base para vencer diversos obstáculos durante a graduação.

**“Não é preciso ser um grande gênio para ser cientista. Basta ter vontade e interesse”.**

(Graziella Joanitti)

## RESUMO

O câncer de mama é a principal causa de morte em mulheres diagnosticadas com câncer. O óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense*) apresenta composição rica em compostos bioativos com potencial atividade antitumoral, no entanto, as diferentes metodologias utilizadas na extração do óleo, impactam diretamente na sua caracterização química e atividade biológica. Somando-se a isto, a característica lipossolúvel do óleo prejudica a sua farmacocinética. A encapsulação do óleo em sistema de nanoemulsão é capaz de contornar essa limitação. Com isso, o objetivo do presente estudo foi produzir e avaliar a atividade antitumoral de nanoemulsões a base de óleo de Pequi (PENE) extraído por diferentes metodologias em células de câncer de mama triplo-negativo (4T1-Luciferase) *in vitro*. As nanoemulsões à base de óleo de Pequi extraído por prensagem a frio (PENEP), fervura (PENEF), *soxhlet* (PENES) e fervura artesanal (PENEK) apresentaram diâmetro hidrodinâmico na faixa de 79 e 95 nm, índice de polidispersão  $<0,3$ , potencial zeta entre 0,3 a -2 mV e pH 6. Após 24h de tratamento, as PENEs reduziram a viabilidade de células de câncer de mama em aproximadamente 45% (180 a 540  $\mu\text{g/mL}$ ), o que foi acentuado após 48h de tratamento, com a redução da viabilidade das células em aproximadamente 60% em todas as concentrações testadas (90, 180, 360 e 540  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre as PENEs a base de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração ( $p>0.05$ ). Adicionalmente, o tratamento com os óleos de Pequi livres não apresentou atividade antitumoral. Com isso, é possível concluir que a nanoestruturação do óleo de Pequi foi capaz de potencializar a sua atividade antitumoral. Além disso, as diferentes metodologias de extração do óleo não influenciaram em sua atividade antitumoral e, possivelmente, mantiveram os compostos bioativos responsáveis por esse efeito.

**Palavras-chave:** Pequi, óleo, *Caryocar brasiliense*, nanoemulsão, câncer de mama, extração.

## ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of death in women diagnosed with cancer. Pequi oil (*Caryocar brasiliense*) has a composition rich in bioactive compounds with potential antitumor activity, however, the different methodologies used in extracting the oil directly impact its chemical characterization and biological activity. In addition, the oil's liposoluble characteristic impairs its pharmacokinetics. The encapsulation of oil in a nanoemulsion system is able to circumvent this limitation. Thus, the objective of the present study was to produce and evaluate the antitumor activity of nanoemulsions based on Pequi oil (PENE) extracted by different methodologies in triple-negative breast cancer cells (4T1-Luciferase) in vitro. Nanoemulsions based on Pequi oil extracted by cold pressing (PENEP), boiling (PENEf), soxhlet (PENES) and artisanal boiling (PENEK) showed hydrodynamic diameters in the range of 79 and 95 nm, polydispersion index  $<0.3$ , zeta potential between 0.3 to -2 mV and pH 6. After 24h of treatment, PENEs reduced the viability of breast cancer cells by approximately 45% (180 to 540  $\mu\text{g/mL}$ ), which was accentuated after 48h of treatment, with a reduction in cell viability by approximately 60% in all tested concentrations (90, 180, 360 and 540  $\mu\text{g/mL}$ ). However, no statistical differences were observed between PENEs based on pequi oil obtained by different extraction methods ( $p>0.05$ ). Additionally, treatment with free Pequi oils did not show antitumor activity. Thus, it is possible to conclude that the nanostructuring of Pequi oil was able to enhance its antitumor activity and, the different oil extraction methodologies did not influence its antitumor activity and, possibly, kept the bioactive compounds responsible for this effect.

**Keywords:** Pequi, oil, *Caryocar brasiliense*, nanoemulsion, breast cancer, extraction.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- PENE** - Nanoemulsão de óleo de Pequi;
- PENES** – Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por *Soxhlet*;
- PENEP** – Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por prensagem a frio;
- PENEF** – Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura;
- PENEK** – Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura artesanal;
- 4T1-Luc** – Linhagem de células de câncer de mama triplo negativo que expressam luciferase derivada da glândula mamária de murino;
- PBS** – Tampão fosfato salino;
- PEG-40** – Polioxietileno (40) estearato;
- PdI** – Índice de polidispersão;
- DLS** – *Dynamic light scattering*;
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*;
- MTT** – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio;
- DMSO** – Dimetilsulfóxido;
- ANOVA** – Análise de variância;

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Esquema descritivo dos processos celulares envolvidos no desenvolvimento do câncer. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>13</b> |
| <b>Figura 2:</b> Representação da localização territorial dos seis biomas brasileiros: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>15</b> |
| <b>Figura 3:</b> Esquema representativo da organização estrutural das nanoemulsões. Criado pela autora no software Biorender®.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>18</b> |
| <b>Figura 4:</b> Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo. Criado pela autora nos softwares Biorender® e Canvas®.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>20</b> |
| <b>Quadro 1:</b> Resultado da caracterização por DLS das nanoemulsões. Branco: Formulação sem óleo (surfactantes + veículo); PENES: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por <i>Soxhlet</i> ; PENEf: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura; PENEp: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por prensagem a frio; PENEK: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura artesanal (Comunidade Kalunga).....                                                                          | <b>23</b> |
| <b>Figura 5:</b> Viabilidade de células de câncer de mama (4T1-Luc) no período de 24 horas após exposição a diferentes nanoemulsões a base de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ **** ; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ * . CRT EtOH: Controle etanol (0,5%); CRT PBS: Controle solução tampão fosfato salino; OL: Óleo de pequi livre; PENE: Nanoemulsão de óleo de pequi..... | <b>25</b> |
| <b>Figura 6:</b> Viabilidade de células de câncer de mama (4T1-Luc) no período de 48 horas após exposição a diferentes nanoemulsões a base de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas: $p < 0.0001$ **** ; $p < 0.001$ ***; $p < 0.01$ **; $p < 0.05$ * . CRT EtOH: Controle etanol (0,5%); CRT PBS: Controle solução tampão fosfato salino; OL: Óleo de pequi livre; PENE: Nanoemulsão de óleo de pequi..... | <b>25</b> |

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução .....</b>                                                                                | <b>12</b> |
| <b>1.1 Câncer de mama.....</b>                                                                            | <b>12</b> |
| <b>1.2 Bioprospecção de produtos naturais .....</b>                                                       | <b>13</b> |
| <b>1.3 Nanotecnologia e nanofitoterápicos .....</b>                                                       | <b>15</b> |
| <b>1.4 Óleo de Pequi .....</b>                                                                            | <b>17</b> |
| <b>2. Objetivos .....</b>                                                                                 | <b>19</b> |
| <b>2.1 Objetivo Geral.....</b>                                                                            | <b>19</b> |
| <b>3. Metodologia.....</b>                                                                                | <b>20</b> |
| <b>3.1 Extração do óleo de Pequi.....</b>                                                                 | <b>20</b> |
| <b>3.2 Formulação das nanoemulsões a base de óleo de Pequi .....</b>                                      | <b>22</b> |
| <b>3.3 Avaliação físico-química das nanoemulsões a base de óleo de Pequi.....</b>                         | <b>22</b> |
| <b>3.4 Cultura celular e ensaio de viabilidade celular .....</b>                                          | <b>22</b> |
| <b>3.5 Análise estatística.....</b>                                                                       | <b>23</b> |
| <b>4. Resultados e discussão .....</b>                                                                    | <b>23</b> |
| <b>4.1 Caracterização físico-química das diferentes PENEs.....</b>                                        | <b>23</b> |
| <b>4.2 Avaliação da atividade antitumoral das diferentes PENEs em células de<br/>câncer de mama .....</b> | <b>25</b> |
| <b>5. Conclusões .....</b>                                                                                | <b>29</b> |
| <b>Referências bibliográficas .....</b>                                                                   | <b>30</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

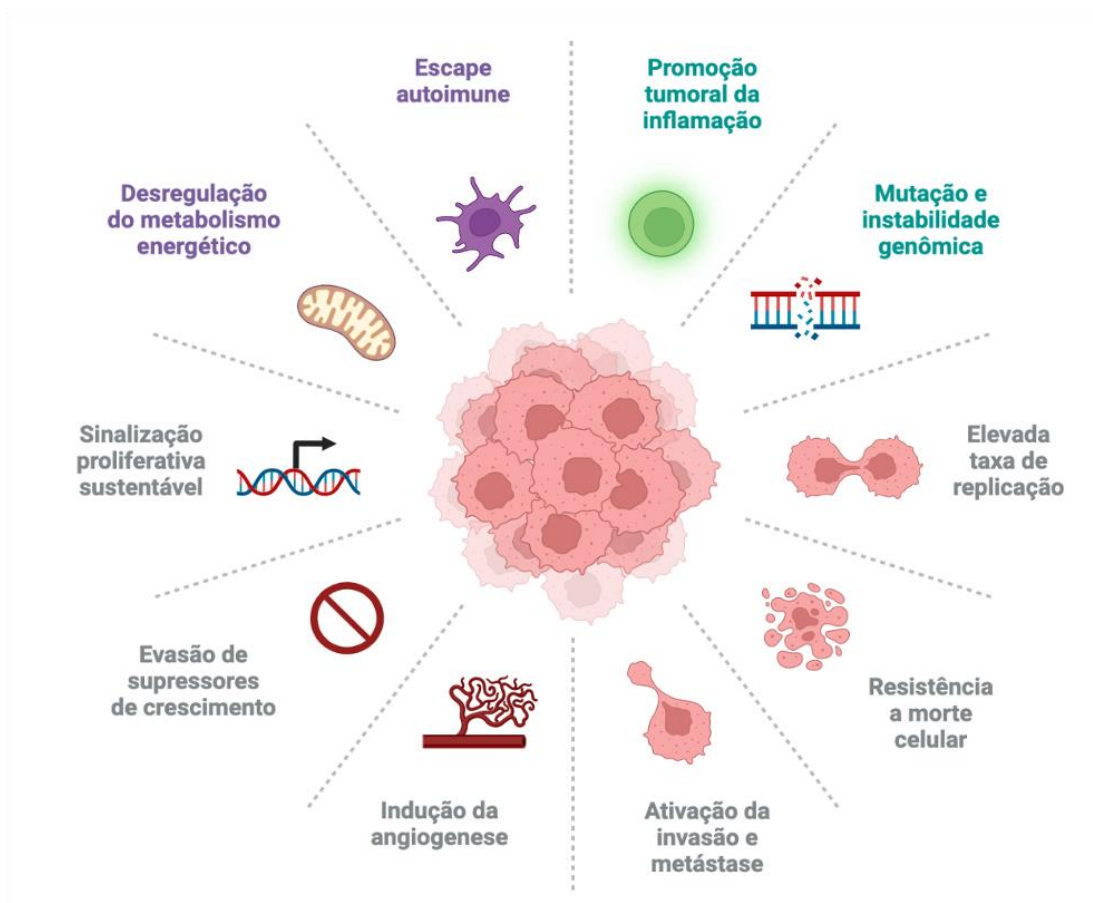
### 1.1 Câncer de mama

O câncer é um conjunto diversificado de doenças caracterizadas pela proliferação celular anormal que resulta em alterações na funcionalidade e arquitetura de tecidos. A capacidade de células tumorais em sustentar a exacerbada proliferação é resultado da ocorrência de processos carcinogênicos que alteram a biologia celular das células tumorais e as diferenciam das células normais. Essas características foram descritas por Hanahan e Weinberg (2011) no estudo dos “*Hallmarks of cancer*” e elucidam os meios com os quais as células tumorais escapam dos mecanismos de regulação de proliferação e até mesmo induzem de maneira independente a produção de estímulos proliferativos, favorecendo assim o desenvolvimento e progressão tumoral (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), somente em 2021, estima-se que cerca de 66.280 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados no Brasil (INCA, 2022). Esse tipo tumoral é caracterizado pela formação de tumores no tecido mamário que promovem anormalidades na morfofisiologia do tecido. É a principal causa de morte em mulheres diagnosticadas com câncer no mundo, principalmente devido a elevada taxa metastática em órgãos complexos como pulmões, fígado e sistema nervoso central (HOUGHTON; HANKINSON, 2021).

O tratamento clínico do câncer de mama representa um grande desafio. A ocorrência de efeitos adversos e baixa eficácia são recorrentes aos tratamentos convencionais que são constituídos principalmente por cirurgias para remoção da massa tumoral e utilização de drogas com atividade citotóxica de baixa seletividade (GEZICI; ŞEKEROĞLU, 2019). Somando-se a isso, a variabilidade das alterações moleculares que ocorrem durante a carcinogênese garante a cada célula tumoral uma assinatura genética distinta. Como resultado dessa elevada heterogeneidade tumoral, diferentes respostas clínicas aos tratamentos são observadas (PETERS; GONZALEZ, 2018).

Esse contexto evidencia a necessidade da descoberta de novas terapias, capazes de contornar o desenvolvimento e progressão tumoral de maneira eficiente e com redução da ocorrência de efeitos adversos nocivos (ANGUS et al., 2019). Diferentes abordagens vêm sendo avaliadas quanto à sua efetividade frente ao câncer de mama. Dentre elas, os produtos naturais apresentam características moleculares que promovem propriedades biológicas relevantes para o uso no tratamento do câncer e podem ser alternativas eficazes frente a tumores resistentes aos tratamentos convencionais, como também, podem reduzir os efeitos adversos (CHEN et al., 2021).



**Figura 1:** Esquema descritivo dos processos celulares envolvidos no desenvolvimento do câncer.  
Fonte: software Biorender®.

## 1.2 Bioprospecção de produtos naturais

A biodiversidade tem sido a principal fonte de compostos terapêuticos desde as primeiras civilizações. O tratamento de doenças, por séculos, era baseado na

preparação de plantas e seus derivados por meio de conhecimentos transmitidos de geração em geração e que compõem a medicina tradicional. Com a evolução da ciência, incluindo as áreas de química e farmácia, tornou-se possível a realização de desenhos experimentais relacionados à bioprospecção de produtos da biodiversidade. Esses trabalhos produziram uma base científica para aplicações terapêuticas já utilizadas na medicina tradicional, além de possibilitarem a descoberta de novos potenciais terapêuticos que podem resolver vários desafios de saúde pública (NETO et al., 2020).

Atualmente, as moléculas utilizadas na farmacoterapia são em sua maioria produzidas por processos sintéticos. No entanto, em um estudo desenvolvido por Newman e Cragg em 2020, constatou-se que aproximadamente 40% de todos os medicamentos registrados no mundo durante o período de 1981-2019 são baseados em produtos da biodiversidade. Sendo considerados substâncias sintéticas análogas a moléculas naturais ou compostos combinados isolados de plantas e do metabolismo de organismos, bem como fitoterápicos, que são formulações contendo extratos brutos de plantas. Essas drogas têm sido usadas com sucesso no tratamento de doenças emergentes, como câncer, hipertensão, infecções bacterianas e virais (NEWMAN; GRAGG, 2020).

Um fator que explica esse resultado estatístico é a alta diversidade estrutural presente em moléculas de produtos naturais e que não são alcançadas em processos de triagem sintética. Essa complexidade química é resultado dos processos de biossíntese, coordenados por diferentes vias metabólicas. Essas vias são compostas por enzimas que promovem a construção de estruturas químicas tridimensionais com alta ocorrência de farmacóforos, que são sítios envolvidos na interação dessas moléculas com alvos presentes nas cascatas de sinalizações celulares que desencadeiam as respostas biológicas de grande interesse terapêutico (KUMAR & WALDMANN, 2019; PIMENTEL et al., 2015).

A existência de uma grande variedade de espécies vegetais no Brasil confere à biodiversidade brasileira uma posição de destaque como fonte de recursos naturais com valioso potencial terapêutico. Segundo a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), cerca de 20% de todas as plantas catalogadas no mundo estão presentes nos

seis biomas brasileiros: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Figura 2) (DUTRA et al., 2016; PIMENTEL et al., 2015). Aproximadamente 55.000 espécies já foram catalogadas no Brasil, das quais apenas cerca de 1.100 receberam atenção científica em termos de realização de estudos para avaliação das suas propriedades terapêuticas. Esse cenário revela um enorme potencial da biodiversidade brasileira ainda a ser explorado e que pode fornecer matéria-prima para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos inovadores (NETO et al., 2020; VALLI et al., 2018).



**Figura 2:** Representação da localização territorial dos seis biomas brasileiros: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Fonte: <https://guiadoestudante.abril.com.br/curso-enem/aula-26-biomas-no-brasil-e-no-mundo>

### 1.3 Nanotecnologia e nanofitoterápicos

Algumas características físico-químicas intrínsecas de moléculas e extratos naturais podem dificultar a sua farmacocinética. Por serem moléculas complexas, os produtos naturais apresentam baixa solubilidade aquosa, baixa absorção e reduzido

tempo de retenção nos sistemas biológicos, o que compromete a sua eficácia e aplicação terapêutica. Diante disso, a nanotecnologia tem sido largamente aplicada no desenvolvimento de formulações inovadoras, capazes de promover maior estabilidade aos compostos bioativos frente às condições fisiológicas e possibilitar maior interação com sítios biológicos alvo (SAMPAIO et al., 2022).

Os nanofitoterápicos são estruturas nanométricas ( $10^{-9}$  m) onde os compostos bioativos naturais são encapsulados e apresentados de maneira otimizada aos sistemas biológicos. A nanoestruturação protege os compostos bioativos das barreiras fisiológicas como alterações de pH, ataques enzimáticos e degradação. Além disso, a elevada área de superfície de contato apresentada pelas nanoestruturas favorece a sua passagem pela membrana plasmática aumentando a absorção celular. Essa otimização da farmacocinética pode potencializar as atividades terapêuticas dos compostos e até mesmo favorecer o surgimento de atividades biológicas ainda não observadas (KASHYAP et al., 2021).

Somando-se a isso, o desenvolvimento dos nanofitoterápicos pode ser direcionado para a produção de nanopartículas que apresentam propriedades físico-químicas como tamanho, forma e superfície que as direcionem para as células alvo. Pensando-se no tratamento do câncer, terapias capazes de atuar especificamente em células tumorais, protegendo as células normais de ataques citotóxicos são altamente relevantes para o desenvolvimento de tratamentos com menos efeitos adversos.

Apesar da elevada heterogeneidade tumoral, as células tumorais compartilham algumas características que podem ser exploradas para o desenvolvimento de nanoestruturas capazes de atuar de maneira específica no sítio tumoral alvo. A incorporação de moléculas na superfície das nanopartículas capazes de interagir com células tumorais via reconhecimento ligante-receptor ou antígeno-anticorpo são abordagens muito interessantes de entrega ativa de nanopartículas. Além disso, as alterações na vascularização do sítio tumoral de tumores sólidos possibilitam o acúmulo das nanopartículas no sítio tumoral e as nanoestruturas podem ter o seu tamanho e forma otimizados para aumentar esse efeito (KASHYAP et al., 2021).

Nesse contexto, os nanofitoterápicos são tecnologias promissoras que podem ser exploradas de modo a viabilizar o uso de um vasto arsenal de moléculas oriundas da biodiversidade e que apresentam relevante atividade antitumoral. O desenvolvimento dessas tecnologias pode solucionar diversos problemas em relação ao tratamento do câncer, além disso, pode impulsionar a movimentação da cadeia de agregação de valor aos produtos naturais da biodiversidade brasileira.

#### **1.4 Óleo de Pequi**

O Pequi é um fruto produzido pela árvore *Caryocar brasiliense*, largamente distribuída pelo Cerrado brasileiro. A partir deste fruto é possível extrair um óleo rico em compostos bioativos que apresentam propriedades terapêuticas. Na medicina tradicional, o óleo de Pequi é utilizado no tratamento de diversas doenças como infecções do trato respiratório, cicatrização de feridas, doenças cardíacas e dentre outras (COUTINHO et al., 2020; NASCIMENTO-SILVA; NEVES, 2019; TORRES et al., 2016).

A composição do óleo de Pequi é constituída majoritariamente por ácidos graxos e em menor proporção por metabólitos secundários. Essas moléculas atuam em conjunto e apresentam a capacidade de reduzir a viabilidade de células tumorais (BRITO et al., 2022; OMBREDANE et al., 2020). Diversos estudos já foram conduzidos avaliando a atividade antitumoral do óleo de Pequi em modelos *in vitro* e *in vivo*. A administração de óleo de Pequi previamente ou concomitantemente com moléculas carcinogênicas em modelos *in vivo* demonstrou o potencial do óleo em reduzir e, até mesmo, reverter a progressão tumoral (COLOMBO et al., 2015; MIRANDA-VILELA et al., 2013; MIRANDA-VILELA et al., 2014).

Investigando a literatura acerca de estudos envolvendo a avaliação da atividade antitumoral de compostos isolados presentes no óleo de Pequi, é possível identificar os possíveis mecanismos de ação antitumoral. O ácido oleico, um ácido graxo insaturado e componente majoritário do óleo de Pequi (~54%), desempenha diversos mecanismos relacionados com a inibição da proliferação celular de células tumorais (ROLL et al., 2018). No câncer de mama, o ácido oleico é um inibidor da

expressão do oncogene HER2 (Fator de crescimento epidérmico humano 2), responsável pela indução da expressão de proteínas associadas com a progressão tumoral e metástase (FARAG & GAD, 2022).

Adicionalmente, os metabólitos secundários presentes em concentrações minoritárias na composição do óleo de Pequi, apresentam atividades biológicas que podem atuar de maneira sinérgica em associação às atividades antitumorais do ácido oleico. Os carotenóides, dentre eles, o  $\beta$ -caroteno e licopeno são os principais metabólitos secundários presentes no óleo de pequi (ROLL et al., 2018). Essas moléculas possuem uma estrutura poli-isoprenóide abundante em ligações duplas, que servem de sítios para ligação de espécies reativas de oxigênio. A atividade antioxidante desempenhada por essas moléculas é capaz de contornar a evolução da carcinogênese (JELIC et al., 2021; TAN & NORHAIZAN, 2019).

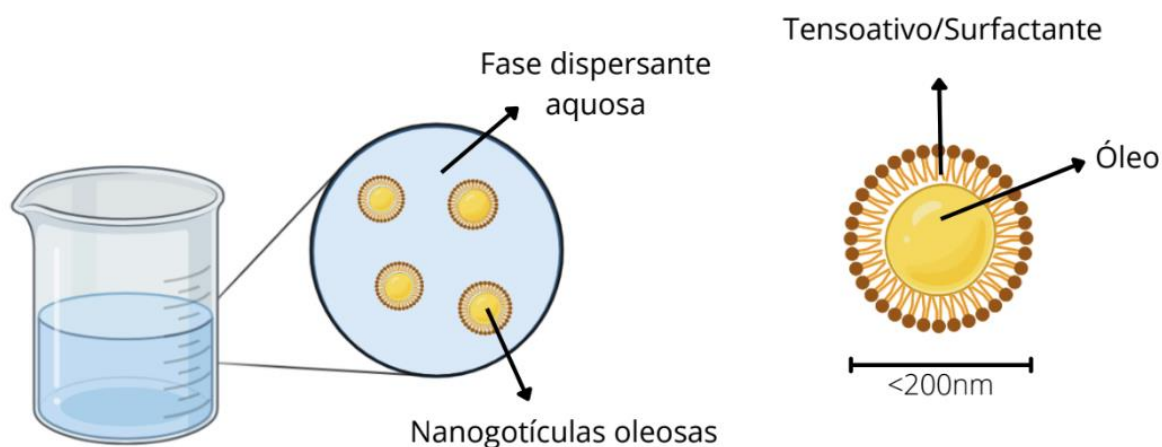
Apesar de sua potencial atividade antitumoral, a característica hidrofóbica do óleo de Pequi reduz a sua biodisponibilidade. Em contato com fluídos biológicos, as moléculas lipofílicas do óleo se organizam de modo a exibirem a menor área de contato possível, formando aglomerados de baixa dispersão e que são rapidamente excretados sem alcançar o tecido alvo (COUTINHO et al., 2020; LEHNINGER et al., 2014).

A nanotecnologia fornece ferramentas para otimizar a farmacocinética de compostos hidrofóbicos por meio da formação de um sistema de nanoemulsão, no qual o óleo é encapsulado no interior de gotículas de tamanho nanométrico (<100nm) estabilizadas por surfactantes (Figura 2) (COUTINHO et al., 2020). Quando encapsulado, o óleo exibe um melhor perfil de dispersão e com isso sua atividade antitumoral pode ser potencializada. Este efeito já foi elucidado na literatura, em que nanoemulsões à base de óleo de Pequi (PENE) foram capazes de provocar danos em organelas essenciais e, conseqüentemente, reduzir a viabilidade de células de câncer de mama *in vitro* (OMBREDANE et al., 2020; OMBREDANE et al., 2022).

Embora as evidências científicas apontem para a potencial eficácia antitumoral do óleo de Pequi, a escassez de dados referentes a origem e metodologias de extração do óleo inviabiliza a comparação dos resultados e a determinação dos

melhores métodos de extração que conservem os compostos bioativos. As diferentes metodologias de extração do óleo de Pequi influenciam diretamente no perfil fitoquímico do óleo extraído e consequentemente, na reprodutibilidade das suas atividades terapêuticas. Isso já foi observado em um estudo comparando a atividade anti-inflamatória do óleo de Pequi extraído por fervura e prensagem a frio ((BRITO et al., 2022; TORRES et al., 2016).

Diante desse contexto, estudos envolvendo a avaliação comparativa da atividade antitumoral utilizando amostras de óleo de Pequi extraídas por diferentes metodologias se faz necessária para melhor direcionar as pesquisas envolvendo o óleo, bem como, promover a validação e otimização das metodologias de extração realizadas na cadeia de produção do óleo de Pequi.



**Figura 3:** Esquema representativo da organização estrutural das nanoemulsões. Fonte: Criado pela autora no software Biorender®.

## 2. OBJETIVOS

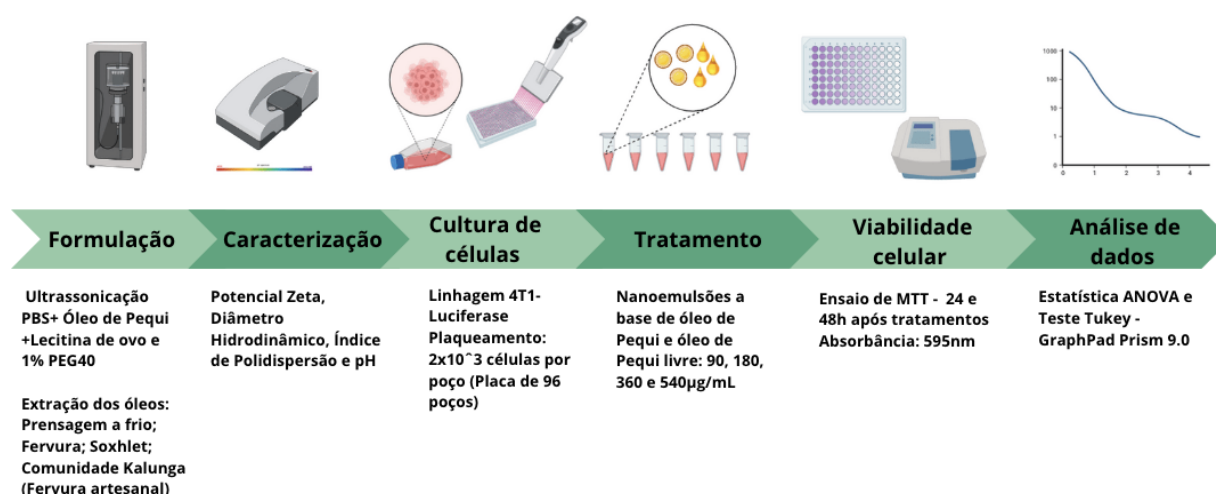
### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antitumoral do óleo de Pequi livre e nanoestruturado extraído pelas metodologias de prensagem a frio, fervura, *soxhlet* e fervura artesanal (comunidade extrativista) em cultura de células de câncer de mama.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Formular e caracterizar nanoemulsões a base de óleo de Pequi extraído pelas diferentes metodologias, quanto aos aspectos de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e pH.
- Avaliar a viabilidade celular de células de câncer de mama triplo-negativo da linhagem 4T1-Luciferase tratadas pelos períodos de 24 e 48h com os óleos de Pequi extraídos pelas diferentes metodologias na sua forma livre e em nanoemulsões.

## 3. METODOLOGIA



**Figura 4:** Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo. Fonte: Criado pela autora nos softwares Biorender® e Canvas®.

### 3.1 Extração do óleo de Pequi

A extração do óleo de Pequi foi realizada em colaboração com a equipe do Prof Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas do Departamento de Ciência dos Alimentos (Universidade Federal de Lavras, MG). Foram realizadas três diferentes metodologias

de extração: *soxhlet*, fervura e prensagem a frio. Em todas as metodologias foram utilizados os frutos provenientes do mesmo lote e o óleo foi extraído da polpa do fruto, contudo, nas extrações por *soxhlet* e prensagem a frio, a polpa do fruto foi secada em forno a 60°C por 24h.

Na extração por *soxhlet*, após o processo de secagem, a polpa do Pequi foi moída utilizando liquidificador industrial (METVISA modelo LQ-6) e 250g do material moído foi adicionado em dois balões volumétricos contendo um litro de acetona ou éter etílico. Após o período de 4 horas, o material extraído foi filtrado por papel filtro *Whatman* e o solvente removido pelo extrator *soxhlet*. Este processo de extração foi repetido duas vezes (RIBEIRO et al., 2012).

A extração por prensagem a frio foi realizada utilizando o equipamento Mini Prensa Ecirtec MPE-40 em suas configurações originais e o óleo obtido filtrado por meio de peneira de aço inoxidável em temperatura ambiente e também pelo papel filtro *Whatman* a 60°C durante toda a noite (RIBEIRO et al., 2012).

Na extração por fervura em ambiente laboratorial, o fruto foi adicionado em recipiente de alumínio contendo água em fervura. Após 40 minutos, o fruto foi removido e a polpa foi separada utilizando uma colher, posteriormente a polpa foi fervida e as gotículas de óleo presentes na superfície da água foram colhidas utilizando colher (RIBEIRO et al., 2012). Adicionalmente, a extração por fervura foi também realizada artesanalmente e cedida pela comunidade extrativista Kalunga da cidade de Cavalcante-Goiás.

O presente estudo está em acordo com a Lei Brasileira da Biodiversidade (Lei número 13.123 de 20 de maio de 2015) e registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com número de registro AC22EF9.

### **3.2 Formulação das nanoemulsões a base de óleo de Pequi**

As nanoemulsões a base de óleo de pequi (PENEs) foram produzidas de acordo com Ombredane et al., 2020. A lecitina de ovo foi utilizada como surfactante, 1% de PEG-40 como co-surfactante, óleo de pequi como fase oleosa, em uma proporção 1:2 (v/v) diluídos em solução de tampão fosfato salino (PBS). O método de nanoemulsificação consistiu na ultrasonicação em pulso alternado a 20 kHz em banho de gelo por 6 minutos realizado em 2 etapas: primeiro em uma solução concentrada e depois diluída em 1:7.5 (v/v) de PBS. Uma formulação sem óleo de Pequi foi preparada seguindo os mesmos métodos citados. Todas as formulações foram estocadas a 4°C sem exposição à luz.

### **3.3 Avaliação físico-química das nanoemulsões a base de óleo de Pequi**

A caracterização físico-química das nanoemulsões foi realizada em temperatura ambiente no equipamento ZetaSizer® Nano ZS90 (Malvern, UK), avaliando-se o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta das nanogotículas por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com angulação de 90°. Foram realizadas 3 leituras de cada amostra 24 horas após a obtenção das formulações. O pH da formulação foi avaliado utilizando fita indicadora de pH.

### **3.4 Cultura celular e ensaio de viabilidade celular**

Células de câncer de mama (4T1-Luciferase) foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços em uma densidade de 2x10<sup>3</sup> células por poço e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, as células foram tratadas com o branco, nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por *Soxhlet* (PENES), nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por prensagem a frio

(PENEP), nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura (PENEF), nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura artesanal (PENEK) e os óleos de Pequi livres obtidos pelas diferentes metodologias de extração nas concentrações de 90, 180, 360 e 540 µg/mL. A solubilização dos óleos de pequi livres foi realizada em uma solução de etanol diluído em PBS na concentração de 1% de etanol. Após o tratamento as células foram incubadas pelos períodos de 24 e 48 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

A viabilidade celular foi analisada por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Depois dos períodos de 24 e 48 horas de incubação, os tratamentos foram descartados e cada poço recebeu 150µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL diluído em DMEM e as placas foram novamente incubadas em estufa. Após o período de 2h, a solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan formados foram diluídos com a adição de 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro com leitor de microplaca (Thermo Fisher Scientific®, USA) no comprimento de onda de 595 nm. Foram realizadas duas replicatas independentes deste experimento.

### **3.5 Análise estatística**

A análise estatística empregada para avaliação dos resultados foram os testes de normalidade Shapiro-Wilk seguido dos testes ANOVA *two-way* e pós-teste de comparação múltipla Tukey. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 9.0.1.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização físico-química das diferentes PENEs**

As técnicas de espalhamento de luz dinâmica e eletroforética (do inglês *dynamic light scattering* - DLS) foram utilizadas para a determinação dos parâmetros de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões produzidas utilizando óleo de Pequi obtido pelas diferentes metodologias de extração. As diferentes nanoemulsões apresentaram tamanho

hidrodinâmico variando entre aproximadamente 79 a 95 nm, índice de polidispersão <0.03, potencial zeta variando entre aproximadamente -2 a 0,3 mV e pH 6 (Quadro 1).

|                            | Branco         | PENES          | PENEF          | PENEP          | PENEK          |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Tamanho Hidrodinâmico (nm) | 87,22 ± 0,9185 | 80,53 ± 0,6646 | 80,04 ± 0,4013 | 79,39 ± 0,2401 | 95,73 ± 0,6513 |
| Índice de Polidispersão    | 0,232 ± 0,002  | 0,198 ± 0,009  | 0,194 ± 0,006  | 0,186 ± 0,024  | 0,179 ± 0,007  |
| Potencial Zeta (mV)        | 0,323 ± 0,773  | -2,16 ± 1,20   | -0,666 ± 0,385 | -1,18 ± 0,940  | -1,38 ± 0,548  |
| pH                         | 6              | 6              | 6              | 6              | 6              |

**Quadro 1:** Resultado da caracterização físico-química de nanoemulsões a base de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração. Branco: Formulação sem óleo (surfactantes + veículo); PENES: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por Soxhlet (solvente); PENEF: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura; PENEP: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por prensagem a frio; PENEK: Nanoemulsão de óleo de Pequi extraído por fervura artesanal (Comunidade Kalunga).

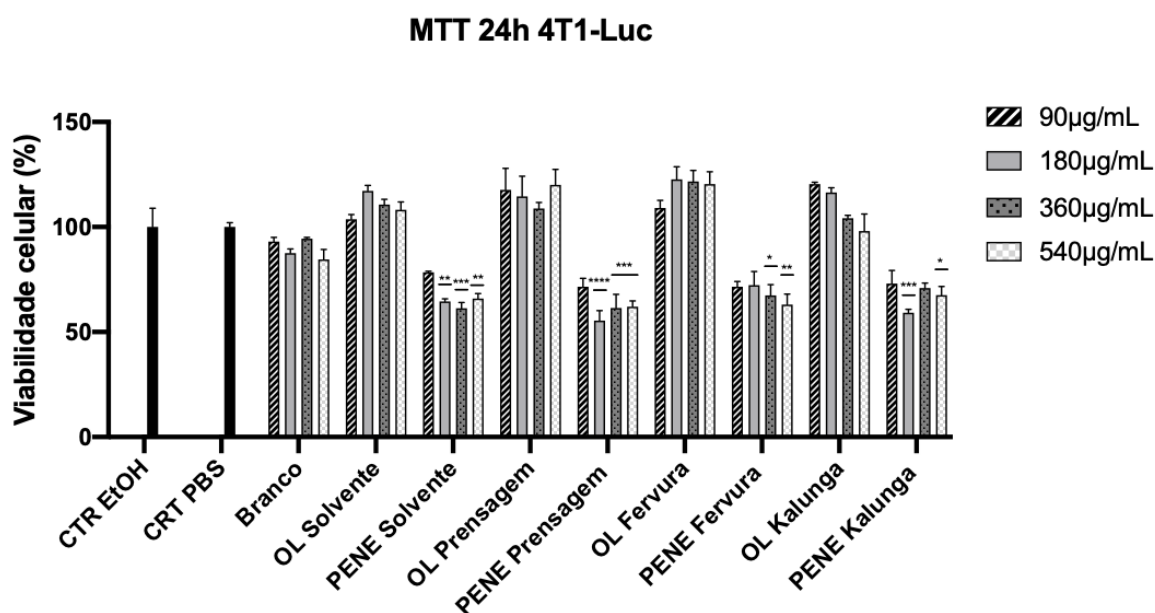
A produção de nanoemulsões pela metodologia de ultrassonicação consiste na submissão da solução, contendo o surfactante e as fases aquosa e oleosa, a ondas sonoras de alta energia que oscilam e formam bolhas de cavitação. Essas bolhas quebram as gotículas grandes do óleo em gotículas menores de tamanho na escala nanométrica (<200nm) (SINGH et al., 2017). Além da metodologia de alta energia impactar diretamente no tamanho das nanogotículas formadas, a composição das fases aquosa e oleosa e a proporção de surfactante utilizado determinam as características físico-químicas da nanoemulsão (BARKAT et al., 2020).

De acordo com os resultados do quadro 1, as nanoemulsões produzidas com os diferentes óleos de Pequi, apresentaram perfis de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta e pH semelhantes. Esses resultados demonstram a possibilidade de obtenção de nanoemulsões padronizadas mesmo utilizando óleos de Pequi extraídos por diferentes metodologias, o que viabiliza a análise comparativa dos efeitos antitumorais dessas formulações, já que a caracterização físico-química das nanoemulsões determina o seu modo de interação com os componentes biológicos,

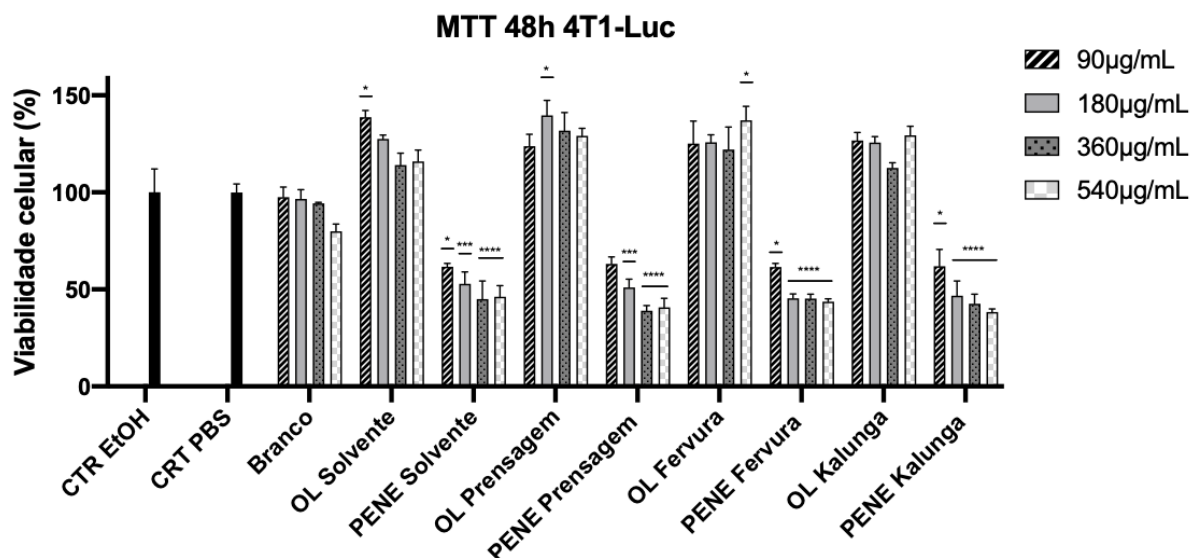
e conseqüentemente, a reprodutibilidade das atividades biológicas (WILSON et al., 2022). Além disso, também favorece o escalonamento da cadeia produtiva dessas formulações.

#### 4.2 Avaliação da atividade antitumoral das diferentes PENEs em células de câncer de mama *in vitro*.

A avaliação da atividade antitumoral das PENEs (PENES, PENEK, PENEK e PENEK) e seus respectivos óleos livres foi realizada por meio do ensaio de MTT nos períodos de 24 e 48 horas em células de câncer de mama da linhagem 4T1-Luciferase. No período de 24 horas, os tratamentos com os óleos de Pequi livres não apresentaram atividade antitumoral, mantendo a viabilidade celular em níveis superiores ao grupo controle. Já as PENEs apresentaram atividade antitumoral nas concentrações de 180 a 540 µg/mL, reduzindo a viabilidade das células de câncer de mama em aproximadamente 45% (Figura 5) ( $p < 0.05$ ). Após 48 horas de incubação, os tratamentos com os óleos de Pequi livres aumentaram a proliferação celular ( $p < 0,05$ ), enquanto as PENEs apresentaram acentuação do efeito antitumoral observado em 24 horas, reduzindo a viabilidade celular de maneira dose-dependente em aproximadamente 60% em todas as concentrações testadas (90, 180, 360 e 540 µg/mL) ( $p < 0.05$ ) (Figura 6).



**Figura 5:** Viabilidade de células de câncer de mama (4T1-Luc) no período de 24 horas após exposição a diferentes nanoemulsões a base de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas:  $p < 0.0001$  \*\*\*\*;  $p < 0.001$  \*\*\*;  $p < 0.01$  \*\*;  $p < 0.05$  \*. CRT EtOH: Controle etanol (0,5%); CRT PBS: Controle solução tampão fosfato salino; OL: Óleo de pequi livre; PENE: Nanoemulsão de óleo de pequi.



**Figura 6:** Viabilidade de células de câncer de mama (4T1-Luc) no período de 48 horas após exposição a diferentes nanoemulsões a base de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração. Diferenças significativas em relação aos grupos controle expressas:  $p < 0.0001$  \*\*\*\*;  $p < 0.001$  \*\*\*;  $p < 0.01$  \*\*;  $p < 0.05$  \*. CRT EtOH: Controle etanol (0,5%); CRT PBS: Controle solução tampão fosfato salino; OL: Óleo de pequi livre; PENE: Nanoemulsão de óleo de pequi.

As diferentes metodologias de extração do óleo de Pequi influenciam diretamente no perfil fitoquímico do óleo extraído. A afinidade dos compostos aos solventes utilizados na extração, como também, a estabilidade dos compostos bioativos diante das condições submetidas na extração, como a temperatura alcançada, pode degradar compostos e paralelamente facilitar a extração de outros (BRITO et al., 2022; TORRES et al., 2016).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos por plantas e apresentam diversas atividades terapêuticas relacionadas com a ação anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (ALBUQUERQUE et al., 2021). A extração de óleos vegetais por fervura foi demonstrada como eficiente na extração de maior concentração de compostos fenólicos em relação à extração por prensagem a frio (TORRES et al., 2016). Isso pode ser resultado tanto da temperatura atingida na

fervura como do uso de água na extração, que permite uma maior dissolução de compostos hidrossolúveis (BRITO et al., 2022). No entanto, fatores como exposição prolongada do óleo ao oxigênio, ocorrência de polimerização e interação dos compostos fenólicos com outras moléculas do óleo podem resultar na degradação destes compostos bioativos (BRITO et al., 2022).

Em contrapartida, os ácidos graxos, palmítico e oleico, são os constituintes majoritários do óleo de Pequi, correspondendo a cerca de 90% da sua composição (MIRANDA-VILELA et al., 2009). Esses compostos apresentam características químicas distintas em comparação aos compostos fenólicos, sendo melhor extraídos por meio da utilização de solventes hidrofóbicos, como os utilizados na extração *Soxhlet*. Entretanto, temperaturas elevadas ocasionam a hidrolisação dos ácidos graxos o que pode comprometer as suas atividades biológicas (RIBEIRO et al., 2012).

No estudo desenvolvido por Brito et al. (2022), os extratos lipofílicos de óleo de Pequi extraídos com o uso de solventes orgânicos, reduziram a viabilidade de células de câncer de mama MCF-7 em maior proporção, em comparação com o extrato hidrofílico. Esse resultado indica o elevado impacto da fração lipofílica na atividade antitumoral do óleo.

O nosso grupo de pesquisa já avaliou a atividade antitumoral de nanoemulsões a base de óleo de Pequi extraído por prensagem a frio. No estudo de Ombredane et al. (2020), o óleo de Pequi livre e nanoestruturado apresentaram semelhante atividade antitumoral em células de câncer de mama (4T1) no período de 24 horas. No presente estudo, os diferentes óleos de Pequi livres não apresentaram atividade antitumoral em 24 e 48h.

Este contraste pode estar relacionado com as diferentes origens do óleo de Pequi, já que a sazonalidade impacta na caracterização química do óleo, especialmente na produção de metabólitos secundários. Como demonstrado no estudo de Carneiro et al., (2023), em que a caracterização química da polpa do pequi foi comparada entre os frutos obtidos nos estados de Minas Gerais, Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Piauí. A sazonalidade dos diferentes estados resultou em diferenças nas concentrações de compostos bioativos como os lipídios, carotenóides e compostos fenólicos.

Os pontos positivos e negativos das metodologias de extração do óleo de pequi para a extração de compostos bioativos devem ser considerados para a obtenção do óleo para uso terapêutico. Em relação a extração por fervura, as altas temperaturas promovem a inativação das enzimas responsáveis pela oxidação do óleo, permitindo um elevado tempo de prateleira. Adicionalmente, essa metodologia é utilizada pelas comunidades extrativistas, com isso, o uso desse produto para o desenvolvimento de formulações terapêuticas pode agregar valor para as pequenas comunidades extrativistas movimentando assim a bioeconomia. No entanto essa metodologia é de baixo rendimento, para produzir 1 litro de óleo são necessários cerca de 600 frutos (Carneiro et al., 2023).

Na extração por prensagem a frio, as baixas temperaturas preservam a integridade dos compostos bioativos. No entanto, nessa extração, uma grande quantidade de óleo pode ser retida na massa do pequi que é formada após a prensagem e que não é possível recuperar. Além disso, o contato do óleo extraído com partes metálicas da prensa pode gerar ácidos graxos livres e reduzir a qualidade do óleo extraído (Carneiro et al., 2023).

A extração com solventes é o tipo de extração com maior rendimento, no entanto, por utilizar solventes orgânicos, gera resíduos tóxicos sendo necessário uma etapa de destilação adicional no processo de extração para remoção desses solventes. Além disso, é uma metodologia de alto custo (Carneiro et al., 2023).

Apesar da heterogeneidade das características físico-químicas das metodologias utilizadas para a extração do óleo de Pequi, no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas quanto à atividade antitumoral das nanoemulsões produzidas a base destes óleos. Isso permite inferir que as diferentes extrações foram capazes de extrair e manter a estabilidade dos compostos bioativos responsáveis pela atividade antitumoral do óleo de Pequi.

Adicionalmente, a nanoestruturação do óleo resultou na potencialização da sua atividade antitumoral em células de câncer de mama. As nanogotículas quando em contato com a superfície celular interagem com a bicamada lipídica, desorganizando-a de modo a liberar o conteúdo oleoso no interior das células. Isso permite uma maior internalização dos compostos bioativos presentes no óleo, o que pode resultar na

potencialização dos efeitos biológicos. Outros mecanismos como a endocitose mediada por clatrina e caveolina também podem aumentar a internalização celular do óleo de pequi e consequentemente, aumentar a atividade citotóxica em células tumorais (OMBREDANE et al., 2021).

Somando-se a isso, segundo Vasconcelos et al. (2021), um importante aspecto a ser avaliado durante o desenvolvimento de uma nova tecnologia é a oferta de insumos necessários para a sua produção. Nesse sentido, a manutenção da atividade antitumoral em células de câncer de mama das PENEs produzidas a partir de amostras de óleo de Pequi extraídas por diferentes metodologias corrobora para a viabilidade do escalonamento da produção dessa formulação potencialmente eficaz para o tratamento adjuvante do câncer de mama.

## **5. CONCLUSÕES**

No presente estudo, foi possível, produzir, de forma padronizada, nanoemulsões à base de óleos de Pequi obtidos pelas metodologias de extração *soxhlet* (solvente), prensagem a frio, fervura em ambiente laboratorial e artesanal. As diferentes nanoemulsões não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos avaliados. Adicionalmente, a apresentação do óleo de Pequi em nanoemulsões resultou na potencialização da atividade antitumoral em células de câncer de mama, não sendo observados diferenças significativas no efeito antitumoral das diferentes nanoemulsões. Com isso, é possível concluir que os diferentes métodos de extração não impactaram na atividade antitumoral das diferentes PENEs. No entanto, a avaliação da atividade antitumoral, no presente estudo, se restringiu à avaliação da viabilidade celular por um único parâmetro. Outros parâmetros como análise dos impactos dos tratamentos em organelas celulares podem melhor descrever os mecanismos associados com a atividade antitumoral das PENEs. Além disso, a análise do perfil fitoquímico dos diferentes óleos de Pequi também pode ser relevante para a interpretação dos resultados.

## 6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, B. R. et al. "Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges." **Food & function** vol. 12,1 (2021): 14-29. doi:10.1039/d0fo02324h

ALEXANDRE, T. R. Efeitos de nanoemulsões à base de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* mart.) e ácido anacárdico em células de câncer de mama. 2018. 125 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

ANGUS, L. et al. "The genomic landscape of metastatic breast cancer highlights changes in mutation and signature frequencies." **Nature genetics** vol. 51,10, 1450-1458, 2019.

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

BARKAT, M. A. et al. "Therapeutic Nanoemulsion: Concept to Delivery." **Current pharmaceutical design** vol. 26, 2020. 1145-1166. doi: 10.2174/1381612826666200317140600

BRITO, R. M. et al. Bioactive compounds of pequi pulp and oil extracts modulate antioxidant activity and antiproliferative activity in cocultured blood mononuclear cells and breast cancer cells. **Food & nutrition research**, v. 66, 2022.

CARNEIRO, C.R. et al.,. Potential Challenges of the Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from Pequi (*Caryocar brasiliense*) Oil. **Foods**, 12, 1907, 2023. Doi:10.3390/foods12091907

CHEN, H. et al. The Natural Products and Extracts: Anti-Triple-Negative Breast Cancer in Vitro. **Chemistry & biodiversity**, v. 18, n. 7, 1 jul. 2021.

COLOMBO, N. B. R. et al.,. “*Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis.” *Brazilian journal of medical and biological research* = **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas** vol. 48,9, 852-62, 2015.

COUTINHO, D. DE S. et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess)-Loaded Nanoemulsion, Orally Delivered, Modulates Inflammation in LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1–17, 1 nov. 2020.

DUTRA, R. C., et al.,. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, 112, 4–29. 2016.

FARAG, M. A.; GAD, M. Z. “Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management.” **Journal, genetic engineering & biotechnology** vol. 20,1 48. 16 Mar. 2022, doi:10.1186/s43141-022-00329-0

GEZICI, S.; ŞEKEROĞLU, N. Current Perspectives in the Application of Medicinal Plants Against Cancer: Novel Therapeutic Agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 19, n. 1, p. 101–111, 9 jan. 2019.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A.. Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HOUGHTON SC, HANKINSON SE. Cancer Progress and Priorities: Breast Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2021;30(5):822-844. doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-1193.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Dados E Números Sobre Câncer De Mama Relatório anual 2022. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-de-mama-relatorio-anual-2022>. Acessado em 26 de junho de 2023.

JELIC, M. D. et al. "Oxidative stress and its role in cancer." **Journal of cancer research and therapeutics** vol. 17,1. 22-28. 2021. doi:10.4103/jcrt.JCRT\_862\_16

KUMAR, K., & WALDMANN, H. Nature Inspired Small Molecules for Chemical Biology. In **Israel Journal of Chemistry**. Vol. 59, Issue 1, pp. 41–51, 2020.

JOANITTI Graziella Anselmo. Efeitos de extrato de sementes de *Vigna unguiculata* e do inibidor de proteases BTC1, livre e encapsulado em nanopartículas, em células de câncer de mama e na prevenção de câncer de pele. 2012, xvii, 132 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Animal)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

KASHYAP, Dharambir; et al.,. Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: opportunities and challenges. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 69, p. 5-23, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.014>.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

MIRANDA-VILELA A.L. et al. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutr Res**. 2009. doi: 10.1016/j.nutres.2009.10.022. PMID: 19963158.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. "Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: potential use against cancer." **Journal of biomedical nanotechnology** vol. 9,7, 1261-71. 2013.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. "Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations." **The Journal of nutritional biochemistry** vol. 25,11, 1161-1176. 2014.

NASCIMENTO-SILVA, N. R. R. DO; NAVES, M. M. V. Potential of Whole Pequi (*Caryocar* spp.) Fruit-Pulp, Almond, Oil, and Shell-as a Medicinal Food. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 9, p. 952–962, 1 set. 2019.

NETO, J. A. R., et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of ethnopharmacology**, 260, 112547. 2020.

NEWMAN, D. J., & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, 83(3), 770–803. 2020.

OMBREDANE, A. S. et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, p. 101819, 1 ago. 2020.

OMBREDANE, A. S. et al. In vivo efficacy and toxicity of curcumin nanoparticles in breast cancer treatment: a systematic review. *Frontiers in Oncology*, v. 11, 612903, mar. 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.612903.

OMBREDANE, A. S. et al. Pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells in vitro. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 153, 1 set. 2022.

PETERS, J. M. and GONZALEZ F. J. “The Evolution of Carcinogenesis.” **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology** vol. 165, 272-276, 2018.

PINHEIRO, A. C. et al. “Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in In Vitro and In Vivo Models.” **Nanomaterials (Basel, Switzerland)** vol. 12,23 4260. 30 Nov. 2022.

PIMENTEL, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, n.43 , p. 41-89, jun. 2015.

RIBEIRO, M. C. et al. Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil. **Food Science and Technology**. v. 32, n. 2, 2012.

SAMPAIO, M. C. et al.,. Nanotecnologia aplicada a fitoterápicos: Perspectivas para o SUS. In: LEITE, C. R. M. et al., (Org.). Ecossistema de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica em saúde. 1ed. **Rio Grande do Norte: Edições UERN**, v. 1, p. 229-262, 2022.

ROLL, M. M., et al. The pequi pulp oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. **Genetics and molecular biology**, 41(4), 858–869, 2018.

SILVA, Lucas Campos da. Análise da estabilidade oxidativa e efeitos antitumorais de nanoemulsões à base de óleos derivados da biodiversidade brasileira associadas ao resveratrol em células de câncer de pele não melanoma. 2020. 71 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

SINGH, Y. et al. “Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery.” **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society** vol. 252, 2017.

TAN, B. L., and NORHAIZAN, M. E. “Carotenoids: How Effective Are They to Prevent Age-Related Diseases?.” **Molecules** vol. 24,9 1801. 9 May. 2019.

TORRES, L. R. O. et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 97, p. 205–216, 1 nov. 2016.

VALLI, M., et al.,. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 90(1 Suppl 1), 763–778. 2018.

WAKS, A. G., and WINER, E. P. “Breast Cancer Treatment: A Review.” **JAMA : the Journal of the American Medical Association**, vol. 321, no. 3, p. 288–300, 2019.

