

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Kátia Nascimento

**NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare*
MART): PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA
SEGURANÇA *IN VITRO* E *IN VIVO* E EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN*
*VITRO***

Santa Maria, RS

2019

Kátia Nascimento

Nanocápsulas de óleo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* MART): preparação, caracterização, avaliação da segurança *in vitro* e *in vivo* e eficácia antitumoral *in vitro*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Coorientador (a): Prof^a. Dr^a. Michele Rorato Sagrillo

Santa Maria, RS

2019

NASCIMENTO, KATIA

NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare* MART): PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA IN VITRO E IN VIVO E EFICÁCIA ANTITUMORAL IN VITRO / KATIA NASCIMENTO.- 2019.

111 p.; 30 cm

Orientador: JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Coorientadora: MICHELE RORATO SAGRILLO

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2019

1. tucumã 2. óleo 3. nanocápsulas 4. câncer de mama 5. toxicidade I. PAZ DA SILVA, JOSÉ EDSON II. RORATO SAGRILLO, MICHELE III. Título.

Kátia Nascimento

**NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare* MART):
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *IN VITRO* E
IN VIVO E EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VITRO***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 23 de agosto de 2019:



José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

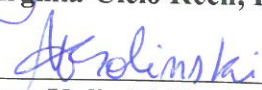
Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)



Gilberti Helena Hubscher Lopes, Dra. (UFSM)



Virginia Cielo Rech, Dra. (UFN)



Alencar Kolinski Machado, Dr. (UFN)

Santa Maria, RS
2019

Dedico esta tese

*A todas as mulheres que enfrentam e enfrentaram o câncer de mama.
Que Deus, nosso Pai Maior, conceda a benevolência do constante aprendizado a todos os
que trabalham pela ciência, para que, um dia, doenças como o câncer de mama deixem de
existir.*

*Ao meu amor, meu Nêne, Márcio, pelo apoio, amor, cuidado, incentivo e dedicação a mim e
ao meu futuro profissional.*

*A minha mãezinha, Verônica, por, de joelhos, sempre rezar por mim e torcer pelas minhas
conquistas.*

Aos meus filhos de quatro patas, Toby e Monique, pelo sentimento de amor em cada olhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e oportunidade de poder, a cada dia, aprender mais. Por me iluminar nos momentos em que achava que não daria conta e sempre me guiar para o melhor caminho. Muito obrigada Meu Deus e a todos os espíritos de luz, anjos da guarda por sempre estarem comigo.

Agradeço infinitamente e acredito que jamais terei palavras suficientes para expressar a tamanha gratidão que tenho pela minha coorientadora, professora e amiga Michele Rorato Sagrillo. Sem você este trabalho não aconteceria. Desde o primeiro momento que me incetivou a fazer um doutorado, me pegou pela mão e juntas fomos até a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) encontrar o professor José Edson. Cada conversa, cada “chamada”, cada gesto foram extremamente significativos para que, após estes quatro anos, eu pudesse estar defendendo o meu doutorado. Acordou às duas da manhã para poder estar comigo às três horas no experimento dos peixes, esteve comigo em todos os momentos. Lutou por mim, brigou por mim. Esteve comigo em um dos momentos mais difíceis de minha trajetória profissional. A minha profunda gratidão, respeito, admiração e carinho por você, professora Michele, que Deus lhe ilumine e sempre guie os seus passos.

Ao meu orientador, Professor José Edson Paz da Silva, o meu profundo agradecimento, por ter me aceitado e pela oportunidade de estudar na UFSM, sempre estar disposto a me ouvir e ajudar no que fosse preciso. Que Deus lhe ilumine sempre, guiado os seus passos e que sempre tenhas esta serenidade que nos passa em cada conversa. O meu muito obrigada.

Agradeço à professora Aline Ourique, pela ajuda e disponibilidade de sempre esclarecer minhas dúvidas durante a execução deste trabalho.

Quanto a tantas pessoas que estiveram comigo durante estes quatro anos, provavelmente não conseguirei citar todas, mas cito brevemente alguns dos amigos que sempre estarão em meu coração e que tanto me ajudaram: Gerson, meu amigo, irmão, Deus sabe o quanto tu me faz falta, obrigada por tudo. Casal (Priscila e Pablo) meus amigos amados, lembro de cada dia que estiveram comigo nesta jornada, lembro de cada reagente, cada experimento que compartilhamos. Andiara, amiga querida, obrigada por cada célula que você me ajudou a cultivar e sempre estava disposta a me ajudar, sem palavras. Lauren, jamais esquecerei o dia em que de madrugada estava comigo para o experimento dos peixes, obrigada pelo carinho e energia que sempre me transmitiu nesta caminhada. Matheus e Carine, não

tenho palavras para agradecer a atenção e dedicação comigo. Com toda certeza, vocês foram fundamentais para o êxito com os experimentos com peixes. Muito obrigada, e que sempre tenham muita luz no caminho de vocês. Walter querido, cada abraço, cada palavra e auxílio, serei eternamente grata. Tenho um carinho gigantesco por você. Professor Alencar, meu amigo querido, obrigada por fazer parte da minha história, por tantas vezes que me deu dicas e me ajudou. Que o seu caminho seja sempre luz, você merece muito! Te admiro demais! Carlos Robalo! Meu ex chefe e um pai que ganhei nesta vida, querido, que tanto me incetivou a fazer doutorado e que abriu as portas dos laboratórios da Universidade Franciscana (UFN), para que eu pudesse realizar parte de meus experimentos. Muito obrigada por todo o carinho por mim.

Ao meu Nêne, amor da minha vida, obrigada por me aguentar, pois sei que não foi fácil me ouvir dizendo que não iria coseguir acabar o doutorado, que estava com medo. Mas como sempre, você me acalmou, me guiou e devolveu a direção.

A minha mãe, que tanto orgulho expressa em dizer que sua filha vai ser Doutora. Obrigada mãezinha, por sempre me incetivar a seguir em frente.

Ao meu pai, Paulo, por sempre me incentivar e apoiar em minhas decisões profissionais. O meu muito obrigada.

Aos meus sogros queridos, Dona Miriam e Seu Amauri, agradeço pelo imenso apoio durante esta jornada e todo o amor e carinho que tem por mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade em poder me qualificar profissionalmete na Universidade que sempre sonhei em estudar. Também agradeço a todos os professores pelos ensinamentos e construção do meu conhecimento.

Obrigada a todos os que estiveram comigo nesta trajetória. São muitas pessoas que fizeram parte desta caminhada. Eu sempre soube, mas gostaria de reforçar: ninguém caminha sozinho, por isso, devemos sempre estar de mãos dadas para que a plenitude tome conta de cada etapa em nossas vidas.

“A gratidão individual é uma nota harmônica a contribuir para a sinfonia universal, ampliando-se e tornando-se um sentimento coletivo que proporciona o equilíbrio social e espiritual da humanidade”.

Divaldo Pereira Franco

Epígrafe

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

RESUMO

NANOCÁPSULAS DE ÓLEO DE TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare* MART): PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *IN VITRO* E *IN VIVO* E EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VITRO*

AUTOR: KÁTIA NASCIMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MICHELE RORATO SAGRILLO

O câncer de mama é uma doença de grande complexidade molecular e sua incidência cresce a cada ano. Para 2019 são esperados aproximadamente sessenta mil novos casos no Brasil, dado que gera preocupação principalmente às mulheres. Em vista disso, estudos visam a novas formas e substâncias para o tratamento desta doença as quais tenham propriedades moduladoras do processo tumoral através de sua matriz química, como por exemplo, o fruto tucumã, do Bioma Amazônia. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo, desenvolver nanocápsulas inéditas do óleo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.), assim como, avaliar seu efeito antitumoral em células de adenocarcinoma de mama e a toxicidade em modelo *in vitro* e *in vivo*. Em sua caracterização, o óleo de tucumã apresentou esqualeno, β -sistosterol, *all-trans*- β -caroteno e os ácidos graxos oleico e palmítico majoritariamente. Além de atividade antioxidante nos ensaios DPPH e ABTS. As nanocápsulas preparadas apresentaram tamanho de partícula adequado, aproximadamente 213 nm, confirmado por microscopia de força atômica. Assim como estabilidade quanto ao tamanho de partícula, pH, índice de polidispersão e potencial zeta. Além disso, verificou-se que a formulação mais adequada para o óleo de tucumã foi a otimizada, com menor concentração de tensoativo Span 60[®] e óleo. Quanto ao efeito antiproliferativo na linhagem celular MCF-7, as nanocápsulas de tucumã apresentaram IC₅₀ de 50 μ g/mL enquanto que o óleo livre de 130 μ g/mL. Quanto aos ensaios de toxicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as nanocápsulas e o óleo livre não foram tóxicos. Contudo, as nanocápsulas brancas e os surfactantes aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio nos peixes. Assim, pode-se concluir que as nanocápsulas são promissoras para o transporte do óleo de tucumã e também foi evidenciado o promissor efeito antiproliferativo destas sobre células de adenocarcinoma de mama, fornecendo subsídios para uma futura aplicação antitumoral.

Palavras-chave: tucumã, óleo, nanocápsulas, câncer de mama, toxicidade.

ABSTRACT

NANOCAPSULES OF THE TUCUMÃ OIL (*Astrocaryum vulgare* MART): PREPARATION, CHARACTERIZATION, SAFETY EVALUATION IN VITRO AND IN VIVO AND ANTITUMORAL EFFECTIVENESS *IN VITRO*

AUTHOR: KÁTIA NASCIMENTO
ADVISER: DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
COADVISER: DR^a. MICHELE RORATO SAGRILLO

Breast cancer is a disease of great molecular complexity and its incidence grows every year. By 2019 approximately sixty thousand new cases are expected in Brazil, as it generates concern mainly for women. In view of this, studies are aimed at new forms and substances for the treatment of this disease which have modulating properties of the tumor process through its chemical matrix, such as the tucumã fruit of the Amazonian Biome. In this sense, the present work aimed to develop novel nanocapsules of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart.), as well as to evaluate its antitumor effect on breast adenocarcinoma cells and toxicity *in vitro* and *in vivo* model. In its characterization, the tucumã oil presented squalene, β -sistosterol, *all-trans*- β -carotene and oleic and palmitic fatty acids mainly. In addition to antioxidant activity in the DPPH and ABTS assays. The prepared nanocapsules had an appropriate particle size, approximately 213 nm, confirmed by atomic force microscopy. As well as stability in particle size, pH, polydispersion index and zeta potential. In addition, it was found that the most suitable formulation for tucumã oil was optimized, with lower concentration of Span 60[®] surfactant and oil. As for the antiproliferative effect on MCF-7 cell line, the tucumã nanocapsules presented IC₅₀ of 50 μ g/mL while the free oil of 130 μ g/mL. As for toxicity assays, both *in vitro* and *in vivo*, nanocapsules and free oil were not toxic. However, white nanocapsules and surfactants increased the levels of reactive oxygen species in fish. Thus, it can be concluded that nanocapsules are promising for the transport of tucumã oil and their promising antiproliferative effect on breast adenocarcinoma cells was also evidenced, providing subsidies for future antitumor application.

Keywords: tucumã, oil, nanocapsules, breast cancer, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Fruto e óleo de tucumã – espécie *Astrocaryum vulgare* Mart. 25

EXPERIMENTOS INDEPENDENTES

Figura 1: Esquema ilustrativo do protocolo de hemólise. 34

Figura 2: Estabilidade das formulações de Fessi e colaboradores (1989): NB e NT no tempo de 30 dias a temperatura entre 2 a 8 °C. 35

Figura 3: Estabilidade das formulações de Venturini e colaboradores (2011): NB e NT no tempo de 30 dias a temperatura entre 2 a 8 °C. 36

Figura 4: Ensaio efeito corona. NB expostas por 24 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. 37

Figura 5: Ensaio efeito corona. NB expostas por 72 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. 38

Figura 6: Ensaio efeito corona. NT expostas por 24 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. 39

Figura 7: Ensaio efeito corona. NT expostas por 72 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. 40

Figura 8: Ensaio hemólise. 41

MANUSCRITO I

Figure 1. Chromatographic profile tucumã oil in phytosterols determination. Blue standard: β-sitosterol; red standard: tocopherol; green standard: squalene; tucumã oil (in black). 61

Figure 2. Swelling of poli-ε-caprolactone (PCL) polymer in tucumã oil. 62

Figure 3. (A) MTT; (B) dsDNA PicoGreen®; (C) DCFH-DA and (D) NO in PBMC's with 24 hours incubation. Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test. Values with p <0.05 were considered statistically significant. Being * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 and **** p < 0,0001. 63

Figure 4. MTT assay in MCF-7 cells after 72 hours of incubation. (A) Cells treated with TN (1 to 200 µg/mL); (B) FT-treated cells (1 to 200 µg/mL). Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test. Values with

p <0.05 were considered statistically significant. Being * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 and **** p < 0,0001..... 64

MANUSCRITO II

Fig. 1: Morphology of tucumã nanocapsules (TN). A: isolated TN. B: TN dispersed in the suspension..... 80

Fig. 2: Morphology of white nanocapsules (WN) using atomic force microscopy..... 80

Fig. 3: Nitric oxide levels in gills (a), liver (b) and brain (c) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucuma (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The analyzes were performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with p <0.05 were considered statistically significant. Being * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001..... 80

Fig. 4: DCFH-DA in gills (a), liver (b) and brain (c) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucumã (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The analyzes were performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with p <0.05 were considered statistically significant. Being * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001..... 80

Fig. 5: dsDNA PicoGreen® in gills (a), liver (b) and brain (c) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucumã (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The analyzes were performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with p <0.05 were considered statistically significant. Being * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001..... 80

Fig. 6: Plasma aspartate aminotransferase (a) and alanine aminotransferase (b) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucumã (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The test was performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with p <0.05 were considered statistically significant. Being * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001..... 80

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTOS INDEPENDENTES

Tabela 1: Constituintes e suas respectivas quantidades das NCs conforme Fessi e colaboradores (1989). 32

MANUSCRITO I

Table 1. Constituents and their respective quantities of tucumã oil nanocapsules. To a final volum 25 mL. 57

Table 2. Table S2. ^at_R: Retention time on the C₃₀ column. ^bLinear gradient Methanol: MTBE. ^cSpectral fine structure: Ratio of the height of the longest wavelength absorption peak (III) and that of the middle absorption peak (II). ^dRatio of the *cis* peak (A_B) and the middle absorption peak (II). ^en = 3 (drywt). ^fNot detected. ^gTentatively identified. 58

Table 3. Descending order of fatty acid (FA) composition of tucumã oil in milligrams of FA per gram of sample. 59

Table 4. Physicochemical characterization of tucumã oil nanocapsules (TN). 60

MANUSCRITO II

Tab. 1: Constituents and their respective quantities of NCs according to Venturini et al. (2011). 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS: Organização Mundial da Saúde
INCA: Instituto Nacional do Câncer
RLs: Radicais Livres
H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio
β: Beta
NCs: Nanocápsulas
CMSP: Células Mononucleadas de Sangue Periférico
DNA: *Desoxyribonucleic Acid*
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
BRCA-1: *Breast Cancer 1*
BRCA-2: *Breast Cancer 2*
ERs: Espécies Reativas
SSB: *Single Strand Break*
DSB: *Double Strand Break*
RE: Receptores de Estrogênio
RP: Receptores de Progesterona
HER-2: *Human Epidermal Receptor-type 2*
FDA: *Food and Drug Administration*
MDR: *Multiple Drug Resistance*
Pgp: glicoproteína P
HR⁺: *Hormonal Receptor*
BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein*
NPs: Nanopartículas
NEs: Nanoesferas
Anti-HER-2: Anticorpos HER-2
ERNs: Espécies Reativas de Oxigênio
DPPH: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*
ABTS: *2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*
NT: Nanocápsulas de Tucumã
NB: Nanocápsulas Brancas
TL: Óleo de Tucumã Livre
MTT: *3-(4,5) dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio*

DCFH-DA: Diclorofluoresceína Diacetato
ON: Óxido Nítrico
PCL: Poli- ϵ -caprolactona
Span 60[®]: Monoestearato de Sorbitano
Tween 80[®]: Polissorbato 80
rpm: rotações por minuto
IPD: Índice de Polidispersão
RPMI 1640: *Roswell Park Memorial Institute*
DMEM: *Dulbecco Modified Eagle Medium*
SFB: Soro Fetal Bovino
 μ g: microgramas
mL: mililitros
NC-T: Nanocápsulas de Tucumã
NC-B: Nanocápsulas Brancas
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
C-: Controle Negativo
C+: Controle Positivo
TS: Tensoativos
 α : Alfa
 ω : Ômega
AG: Ácidos Graxos
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
PGE2: Prostaglandinas E2
LTB4: Leucotrienos B4
TXA2: Tromboxana A2
PGE3: Prostaglandinas E3
LTB5: Leucotrienos B5
TXA3: Tromboxana A3
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade
IC₅₀: Inhibitory Concentration 50%
nm: nanômetros
 μ M: micromolar
RAR: *Retinoid Acid Receptors*
RXR: *Retinoid X Receptors*

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERALURA | 18 |
| 2.1 CÂNCER..... | 18 |
| 2.1.1 Câncer de mama | 19 |
| 2.1.1.1 <i>Carcinogênese do tumor de mama</i> | 20 |
| 2.1.1.2 <i>Tratamento do câncer de mama</i> | 22 |
| 2.1.2 Produtos naturais no tratamento do câncer | 23 |
| 2.1.2.1 <i>Tucumã (Astrocaryum vulgare MART)</i> | 24 |
| 2.1.3 Nanotecnologia no tratamento do câncer | 26 |
| 2.2 SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DE NPs PARA APLICAÇÃO ANTITUMORAL | 28 |
| 2.2.1 Avaliação de segurança farmacológica em modelos de peixes (<i>Rhamdia quelen</i>) ... | 29 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 31 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 4 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES..... | 32 |
| 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.2 RESULTADOS | 35 |
| 5 MANUSCRITOS | 42 |
| 5.1 MANUSCRITO I | 43 |
| 5.2 MANUSCRITO 2..... | 65 |
| 6 DISCUSSÃO GERAL..... | 87 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 96 |
| 8 PERSPECTIVAS..... | 98 |
| 9 REFERÊNCIAS | 99 |
| ANEXO A: CARTA DE ACEITE DO MANUSCRITO I..... | 110 |
| ANEXO B: SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II | 111 |

APRESENTAÇÃO

A presente tese foi redigida em conformidade com as normas vigentes no Manual de Dissertações e Teses (MDT de 2015) e no Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas desta Universidade. A tese foi organizada da seguinte forma: Introdução, Revisão Bibliográfica, Objetivos, Manuscritos, Discussão Geral, Conclusão, Perspectivas, Referências e Anexos.

- Na seção **Introdução** é apresentado o embasamento teórico abrangendo uma revisão de literatura bem como a justificativa para o desenvolvimento deste estudo.
- Na seção **Revisão Bibliográfica** é apresentado o embasamento teórico dos temas que permeiam esta tese.
- A seção **Objetivos** apresenta o principal objetivo e objetivos específicos os quais visam responder a hipótese de estudo desta tese.
- Quanto aos resultados, estão apresentados sob duas formas:
 - I) No corpo da tese, os quais se encontram no item **Experimentos Independentes**, com resultados que não compõem os manuscritos;
 - II) Na forma de manuscritos (Manuscritos I e II), os quais se encontram no item **Manuscritos**.
- Os itens **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão** e **Referências** específicas encontram-se compondo cada manuscrito.
- As seções **Discussão Geral** e **Conclusão**, encontradas ao final desta tese, apresentam apontamentos e interpretações gerais sobre os resultados apresentados nos manuscritos e nos experimentos independentes, os quais não compõem os manuscritos.
- A seção **Perspectivas** aborda os demais estudos que poderão ser realizados para dar continuidade e elucidação dos dados já encontrados.
- Na seção **Referências**, são listadas apenas as citações utilizadas nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão.
- O **Anexo A** contém a carta de aceite do Manuscrito I.
- O **Anexo B** contém a carta de submissão do Manuscrito II.

1 INTRODUÇÃO

Entre tantas doenças que acometem a população, o câncer ainda permanece com a maior morbimortalidade em todo o mundo apesar dos investimentos em novas formas terapêuticas. Atualmente em torno de 32 milhões de pessoas possuem a doença no mundo e o número de casos segue em ascensão (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2017).

Segundo informações do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018), estimou-se para o Brasil entre 2018-2019, aproximadamente 640 mil novos casos de câncer. Entre os mais incidentes, próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto. Sendo sessenta mil novos casos de câncer e mama.

O câncer de mama faz parte de um grupo heterogêneo de doenças, possuindo variadas manifestações clínicas, morfológicas e genéticas tendo como consequência diferentes respostas terapêuticas. Quanto às anormalidades proliferativas nos lóbulos e ductos da mama incluem hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e invasivo. Dentre esses últimos, o carcinoma ductal infiltrante é o tipo histológico mais comum e compreende entre 80 e 90% do total de casos (CHAÈS e ROMIEU, 2014; INCA, 2016).

Neste contexto, um dado que chama a atenção é o baixo índice desta neoplasia em Maués, município brasileiro no interior do estado do Amazonas, no qual existe uma baixa prevalência de algumas comorbidades como obesidade, hipertensão arterial, doenças coronarianas, Diabetes *Melittus* tipo 2 e neoplasias, demonstrando como principal hipótese, o papel relevante da dieta, já que esta população possui hábitos alimentares baseados no consumo de alimentos de origem natural, como os frutos por exemplo (SAGRILLO, et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Desta forma, a predominância no consumo de alimentos de origem vegetal está associada a uma redução no risco de doenças crônicas como arteriosclerose e câncer e estes efeitos têm sido particularmente atribuídos às substâncias que possuem atividade antioxidante, capazes de neutralizar os radicais livres (RLs) (NISHINO et al., 2005).

Estudo recente sugeriu que o extrato hidroalcolólico da casca e polpa de um fruto típico desta região, o tucumã da espécie *Astrocaryum aculeatum*, possui elevada capacidade antioxidante e ação na modulação da produção de RLs em sangue saudável exposto ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estes resultados indicaram que o tucumã poderia apresentar um potencial citoprotetor (SAGRILLO et al., 2015).

Conforme já mencionado, existem substâncias quimiopreventivas as quais exercem ação específica contra o desenvolvimento do câncer, como por exemplo, o β-caroteno, encontrado na matriz química do tucumã. Neste contexto, os compostos naturais têm sido

estudados como uma fonte de substâncias bioativas de diferentes classes com diversas atividades. Entre elas, muitos fitoquímicos da dieta têm sido estudados quanto aos seus efeitos citotóxicos ou apoptóticos em modelos celulares tumorais com vista a explicar a sua capacidade antineoplásica, como também, vislumbrando uma alternativa terapêutica de fontes naturais (KUCUK, 2002; DORAI e AGGARWALLI, 2004).

Como visto, são complexos os processos relacionados à carcinogênese e o tratamento de tumores como, por exemplo, o de mama o qual é agressivo e possui inúmeros efeitos adversos. Sendo assim, substâncias de origem natural atraem a atenção dos pesquisadores, e também a inserção de novos carreadores destas, a exemplo dos nanocarreadores, os quais visam aprimorar a entrega e tempo da substância ativa no organismo, não necessitando de doses elevadas e com janela terapêutica mais ampla. A nanotecnologia, neste caso, visa à diminuição dos efeitos adversos, resistência das células tumorais frente aos quimioterápicos, como também controlar a liberação destas substâncias com alto poder antioxidante, pois em altas concentrações, prejudicam sua atividade quimioterapêutica, tornando-a uma molécula pró-oxidante (HEATH e DAVIS, 2008).

Neste contexto, é necessário estudar substâncias pertencentes à matriz química de plantas e frutos que visem à prevenção, atraso ou até mesmo a reversão do fenótipo maligno destas células. Assim, devido à resistência de células tumorais aos tratamentos convencionais de quimioterapia, é necessário o desenvolvimento de novas formas de tratamento. Os produtos naturais, como frutas, sementes e óleos vêm ganhando destaque devido às propriedades moduladoras de doenças como o câncer (PATEL e GOGNA, 2015).

A associação de áreas como a nanotecnologia no desenvolvimento de novas formulações com o intuito de selecionar moléculas e células específicas no tratamento do câncer torna-se uma alternativa promissora. Sagrillo e colaboradores (2015) evidenciaram as propriedades quimioterapêuticas com os extratos de tucumã, assim, seu encapsulamento em escala nanométrica poderia aumentar o potencial de interação, atuando de maneira controlada e sustentada devido às propriedades físico-químicas das nanocápsulas (NCs), podendo tornar-se uma alternativa de tratamento em doenças como o câncer.

Em virtude de tais aspectos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver NCs contendo o óleo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart), bem como, avaliar a segurança farmacológica destes nanocarreadores *in vitro*, e em modelo de toxicidade *in vivo*, peixes *Rhamdia quelen* (jundiás), para posterior análise do efeito antitumoral em linhagem celular de adenocarcinoma de mama.

2 REVISÃO DE LITERALURA

2.1 CÂNCER

Denomina-se câncer o conjunto de mais de 100 doenças as quais possuem o crescimento desordenado de células capazes de invadirem tecidos e órgãos (INCA, 2014). Portanto, é caracterizado pela proliferação descontrolada de células levando à formação de um tumor (neoplasia). Um tumor maligno é uma doença genética e as mutações são fundamentais para sua etiologia e progressão. O desgaste das células em conjunto com o desequilíbrio da proliferação das mesmas pode desencadear o processo de oncogênese, isto é, desenvolvimento do câncer.

Uma vez iniciado, o câncer progride através do acúmulo de danos genéticos (mutações) em genes que realizam a manutenção da integridade celular e que são responsáveis pelo reparo do *Desoxyribonucleic Acid* (DNA) (FREITA et al., 2005). Neste sentido, o processo de carcinogênese é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão (YEH e HU, 2003). No primeiro estágio, *iniciação*, as células sofrem ação de agentes carcinogênicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando estresse oxidativo o qual induz alterações no DNA e modificações no padrão de metilação de genes e/ou proteínas histonas. Estes processos silenciam genes de supressão tumoral e ativam oncogenes (ZIECH et al., 2012). Existem enzimas polimerases responsáveis pelo reparo do DNA, as quais removem a maioria das mutações. No entanto, quando não reparado, desencadeiam-se danos oxidativos tanto no DNA nuclear quanto mitocondrial que se acumulam com a idade aumentando à suscetibilidade às neoplasias. Além do sistema de reparo, células danificadas podem ser eliminadas pelo sistema imunológico (AZIZ et al., 2012).

No segundo estágio, *promoção*, a célula alterada continua a se dividir gerando instabilidade genética e assim novas mutações. Os genes oncopromotores são os responsáveis por levar a célula a uma transformação maligna, assim como o estresse oxidativo que também é considerado um agente oncopromotor nesta fase (AZIZ et al., 2012).

No terceiro e último estágio, a *progressão*, ocorre o descontrole da proliferação celular de forma irreversível, a célula se torna indiferenciada, perdendo sua morfologia e função original. Também ocorre a indução da angiogênese e resistência a apoptose. Além de alterações em proteínas celulares adesivas levando a liberação do tecido e a migração para outras regiões corporais onde são formados tumores secundários, as metástases.

2.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama constitui o tumor maligno mais comum entre as mulheres, raramente acomete homens, cerca de 1% (INCA, 2015). Considerado raro antes dos 35 anos, acima desta idade, sua incidência cresce progressivamente, especialmente após os 50 anos. Estatísticas indicam o aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. Entre os tipos de câncer de mama, alguns evoluem de forma rápida, contudo, a maioria dos casos tem bom prognóstico. No ano de 2013, 14.388 pessoas vieram a óbito por esta enfermidade, sendo 181 homens e 14.207 mulheres (LEITE et al., 2010; INCA, 2016).

As taxas de sobrevivência do câncer de mama variam, de 80% ou mais na América do Norte, Suécia e Japão para cerca de 60% em países de renda média e abaixo de 40% em países de baixa renda. Os países menos desenvolvidos acabam sendo mais afetados, pois há falta de programas de detecção precoce, resultando em uma alta proporção de mulheres que apresentam doença em estágio tardio, e ainda, pela falta de diagnóstico adequado e tratamento (PARAZZINI et al., 2015; INCA, 2016).

Quanto à distribuição da doença no Brasil (INCA 2018), as maiores taxas de incidência ocorrem na região sul. A taxa bruta é a medida utilizada para quantificar este indicador, o qual corresponde ao número de casos para cada 100 mil mulheres. Sendo assim, na região sul esta taxa é de 73,07 casos/100 mil mulheres; região sudeste 69,50/100 mil mulheres; região centro-oeste 51,96/100 mil mulheres; região nordeste 40,36/100 mil mulheres e região norte 19,21/100 mil mulheres, com a menor taxa de incidência.

Estas diferenças podem decorrer conforme o nível de desenvolvimento da região, notando-se uma maior incidência, refletindo uma sociedade mais industrializada com consumo progressivo de uma alimentação inadequada, excesso de peso e estresse (INCA, 2016). Quanto aos baixos índices na região norte do país, este fator pode estar associado à dieta a qual é rica em frutos, sementes entre outros produtos naturais no Bioma Amazônia (SAGRILLO et al., 2015).

A etiologia do câncer de mama é constituída de uma série de fatores, entre eles, primeira menarca inferior aos 12 anos de idade, menopausa após os 55 anos, primeira gravidez após os 30 anos, uso de anticoncepcionais, terapias de reposição hormonal na menopausa, exposição à radiação ionizante, consumo de bebidas alcoólicas, dietas hipercalóricas, sedentarismo e predisposição genética (principalmente mutações em genes como *BRCA1 e 2 - breast cancer*) (INCA, 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

O câncer de mama pode surgir com o aparecimento de um nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, este pode possuir consistência branda, globosa e bem definida. Outros sinais são edema cutâneo semelhante à “casca de laranja”, retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo e secreção papilar. A secreção associada ao câncer geralmente é transparente, podendo ser rosada ou avermelhada devido à presença de eritrócitos. Podem também surgir linfonodos palpáveis na axila (ADAMI, HUNTER e TRICHOPAULOS, 2008).

Quanto aos fatores genéticos e epigenéticos, está relacionado ao desenvolvimento de mutações em genes supressores herdados como *BRCA1* e *2* (*breast cancer*), *TP53*, *PTEN*, *CDHI*, *STK1* e *ATM* (POLYAK, 2007). A história familiar da doença (herança de mutações genéticas) é um fator epidemiológico de risco bem estabelecido, entre 5 e 10% de todos os casos, tendo como característica o diagnóstico da doença em mulheres jovens (AMENDOLA e VIEIRA 2005; INCA, 2016).

O primeiro gene mapeado do câncer de mama e por isso denominado *BRCA1*, está localizado no braço longo do cromossomo 17(17q21). É composto por 24 éxons, dos quais 22 codificam uma proteína com 1863 aminoácidos. Já o segundo gene mapeado, o *BRCA2*, está localizado no braço curto do cromossomo 13(13q12) e sua estrutura é ainda mais complexa, sendo composto por 27 éxons, dos quais 26 são codificantes (MIKI et al., 1994). As proteínas BRCA desempenham funções de ativação e regulação da transcrição, reparo do DNA, controle da proliferação, diferenciação e do ciclo celular (VENKITARAMAN, 2002).

As mulheres com mutação nos genes *BRCA1* e *2* representam o grupo de maior importância epidemiológica na hereditariedade desta doença, pois, apresentam risco de 50 a 80% de desenvolvê-la ao longo da vida, além de risco cumulativo de câncer de ovário, em torno de 15 a 40% dos casos (GOMES et al., 2011). Quando a mutação é em *BRCA1*, o câncer é caracterizado como de alto grau, com expressão negativa de receptores de estrogênio e progesterona, possuindo maior probabilidade de metástases viscerais e ósseas, sendo o pior prognóstico (SOTIRIOU, PHIL e PUZSTAI, 2009). Já as mulheres que expressam mutações conjuntas em *BRCA1* e *2* desenvolvem neoplasias do tipo carcinoma ductal invasivo ou infiltrativo (BARROS, 2010).

2.1.1.1 Carcinogênese do tumor de mama

Assim como outros tumores malignos de uma forma geral, o câncer de mama tem sua origem a partir de uma mutação genética e epigenética, a qual afeta uma célula-tronco

localizada no ducto tubular da mama. A partir do momento que a mesma foi afetada, ela desenvolve um clone celular também alterado que prolifera com as características fenotípicas que adquiriu quando foi exposta e originou novos danos ao DNA, instabilidade genômica e perda da integridade dos mecanismos de reparo (POLYAK, 2007; HARTWIG et al., 2014).

Estima-se que aproximadamente 20% dos cânceres são vinculados a doenças inflamatórias (PARKIN e BRAY, 2006). As células inflamatórias ativadas induzem a produção excessiva de EROs. A formação destas no tecido inflamado bem como a contínua exposição promove o dano oxidativo e o aparecimento de mutações genéticas no DNA (ROESSNER et al., 2008). Quando as espécies reativas (ERs) atingem o DNA, oxidam as bases púricas e pirimídicas quebrando uma das fitas de forma simples chamada de *Single Strand Break* (SSB) ou quebras duplas, *Double Strand Break* (DSB). Durante o processo de replicação celular, as SSB podem desencadear as DSB (YOU e JONES, 2012).

Neste sentido, quando uma célula entra em desequilíbrio provocando o estresse oxidativo, pode levá-la a um processo de carcinogênese, pois as EROs ao reagirem com o DNA podem alterar sua estrutura genética formando mutações e instabilidades desencadeando novas mutações que tem por consequência a indução da multiplicação desordenada e a imortalização celular (resistência a apoptose) (HALLIWELL, 1994; BARROS et al., 2010).

Quando a célula-tronco foi geneticamente modificada, pode evoluir para linhagens neoplásicas mamárias de duas formas: células epiteliais luminais (expressam receptores hormonais ou estrogênicos) e células basais mioepiteliais (sem expressão de receptores hormonais). À medida que outras mutações vão ocorrendo no clone celular alterado, o tumor se diferencia em subtipos de acordo com a expressão de diferentes genes e moléculas (PRESEGUÉ-BOSCH e VAQUERO, 2011).

Assim, de acordo com a expressão de Receptores de Estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e expressão de proteínas HER-2 (proteínas receptoras *trans*-membrana da família tirosina-quinase) nas células tumorais, são classificados em cinco subtipos moleculares de câncer de mama: *basal-like*, luminal A, luminal B, *HER2+/-ER*, e *normal breast-like*. As características moleculares citadas constituem diferentes fenótipos malignos e consequentemente condutas clínicas e prognósticos distintos, requerendo estratégias terapêuticas específicas (SOTIRIOU, PHIL e PUZSTAI, 2009).

2.1.1.2 Tratamento do câncer de mama

A compreensão do amplo espectro de alterações genéticas e epigenéticas que atuam na carcinogênese mamária bem como da complexidade das células envolvidas, mudou a maneira e a lógica de desenvolvimento de novos fármacos alvo-específicos (SARTORI e FRAZZON, 2015). Os quimioterápicos dividem-se em classes com base no mecanismo que interferem na divisão celular. Eles podem ser combinados para ter maior eficácia, porém essa combinação gera maior toxicidade (WILLIS e WIANS, 2003).

Atualmente a terapia direcionada é utilizada no conjunto de fármacos antitumorais, entre eles, o trastuzumab (Herceptin[®]) o qual foi o primeiro desses novos fármacos a ser aplicado com sucesso no câncer de mama, primeiramente no câncer mamário metastático e hoje, também em estágios iniciais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Trata-se de um anticorpo monoclonal humano, com ação no sítio extracelular do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano tipo 2, do inglês, *Human Epidermal Receptor-type 2* (HER-2, também denominado HER-2/neu ou c-erbB2). É aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para pacientes com câncer de mama invasivo que superexpressam o HER-2 (HADDAD, 2010). Além deste, existem outros anticorpos monoclonais utilizados no tratamento do câncer de mama, entre eles: pertuzumab (Perjeta[®]) e Ado-trastuzumab emtansina (Kadcyla[®]) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Entre os tratamentos disponíveis, está a utilização de agentes quimiopreventivos. Entre esses fármacos, encontra-se o tamoxifeno (OLIVEIRA, ALDRIGHI e RINALDI, 2006). Esse medicamento age como bloqueador do estrogênio nas células de câncer de mama. Mas atua modulando o estrogênio em outros tecidos, como útero e ossos, e por isso, pode ser benéfico, prevenindo a desmineralização óssea em mulheres após a menopausa, ou maléfico, aumentando o risco de câncer de endométrio e causando fenômenos tromboembólicos (RIGGS e HARTMANN, 2003).

Além das implicações acima, destacam-se como efeitos colaterais ao uso do tamoxifeno: retenção hídrica, amenorreia, alteração do ciclo menstrual, corrimento e sangramento vaginal, câncer do colo de útero, náusea, perda de peso, mudança de humor, depressão, fraqueza e faringite (LEAL, CUBERO e GIGLIO, 2010).

Além disso, um dos maiores problemas encontrados hoje nos fármacos antineoplásicos é a resistência das células frente à quimioterapia, fenômeno chamado de resistência a múltiplas drogas, do inglês, *Multiple Drug Resistance* (MDR), pois ao sofrerem mutação genética, estas células são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes aos fármacos através da ativação de genes de resistência como MDR-1 conhecido como a glicoproteína P

(Pgp). Esta proteína funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, capaz de transportar fármacos para o exterior da célula, diminuindo a concentração intracelular a níveis subletais (GOTTESMAN e PASTAN, 1993).

Neste sentido, apesar do avanço da terapia endócrina para o câncer de mama receptor hormonal positivo, do inglês, *Hormonal Receptor* (HR⁺), o desafio que ainda continua é que cerca de 50% dos tumores tem resistência à terapia hormonal (JI et al., 2019). No câncer de mama, a proteína de resistência ao câncer de mama, *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), também conhecida como BCRP/MXR/ABCP, faz parte da família ABC dos hemitransportadores, identificada em linhagens celulares (câncer de mama e cólon) resistentes à mitoxantrona, que exibem resistência a múltiplas drogas sem expressão de Pgp ou MRP (LEE et al., 1997). Sendo assim, ainda buscam-se alternativas que visem responder a estas terapias, e muitas vezes utilizando agentes combinados, bem como, diversos esforços tem sido voltados ao desenvolvimento de novos agentes antitumorais com base em produtos de origem natural (LIU et al., 2017).

2.1.2 Produtos naturais no tratamento do câncer

Os produtos naturais têm sido utilizados a muito tempo de forma empírica para o tratamento de doenças. Dados da OMS relatam que, mais de 80% da população mundial utiliza medicamentos de origem botânica (EKOR, 2014). Neste sentido, o estudo dos componentes biologicamente ativos de produtos naturais derivados de plantas, animais e microrganismos levaram a vários avanços na farmacoterapia (ZHANG et al., 2017). Receberam maior atenção devido estudos que relatam sua atividade antitumoral, onde 74,9% dos medicamentos contra o câncer (excluindo vacinas e biológicos) desenvolvidos entre os anos 40 e 2010 são de origem natural (NEWMAN e CRAGG, 2012). Os componentes ativos de compostos naturais, como alcaloides, taxanos e flavonoides, foram utilizados no desenvolvimento de medicamentos quimioterapêuticos para tratar vários tipos de câncer entre eles, leucemias, mama, ovário e próstata (KRONENBERG, MINDES e JACOBSON, 2005; GORDALIZA, 2007; ALI et al., 2012).

Dentre estes produtos, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas de compostos complexos, com aroma e muitas vezes voláteis (NAKATA et al., 2013; PATEL e GONGA, 2015). Além destes, também são utilizados os óleos virgens de frutas os quais contém maiores quantidades de componentes nutricionais, como antioxidantes, ácidos graxos essenciais, fosfolípidos, fitoesteróis e outros fenólicos bioativos (HERNANDEZ, 2016).

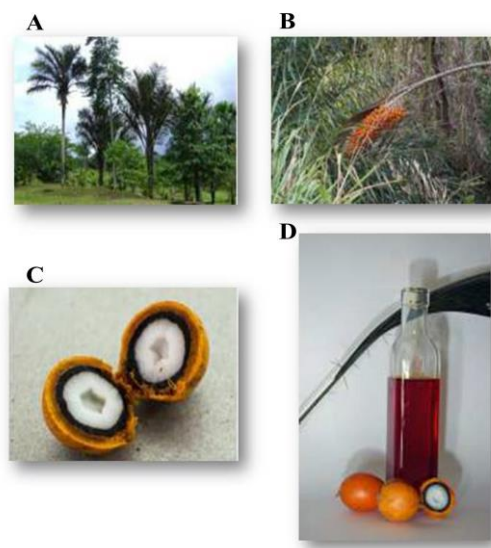
Desta forma as substâncias bioativas que compõem estes óleos marcam sua utilização na cura de doenças, com funções antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, anti-úlcerativa, anti-diabética, ansiolítica, anti-convulsivante, neuro-protetora e ainda, antitumoral (BURT, 2004; DE SOUSA, 2011; AMORATI et al., 2013; DE CÁSSIA et al., 2014; QUINTAS et al., 2015).

2.1.2.1 Tucumã (*Astrocaryum vulgare* MART)

O Brasil é o país com a maior diversidade de espécies vegetais do mundo, tendo em torno de 43.020 espécies vegetais conhecidas (Ministério do Meio Ambiente). Dentre os biomas brasileiros, o amazônico é o com maior abundância de espécies nativas de plantas frutíferas as quais despertam o interesse dos pesquisadores nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmética (CLEMENT, LLERAS e VAN LEEUWEN, 2005). Dentre estas plantas, está o tucumã, um fruto típico da Amazônia pertencente ao gênero *Astrocaryum* e que apresenta diversas espécies: *Astrocaryum vulgare* Mart., *A. aculeatum* Meyer., *A. segregatum* Dr., *A. princeps* Bard., *A. giganteum* Bar., *A. tucumã* Mart., *A. acaule* Mart., *A. cantensis*, *A. chonta* Mart., *A. leiphota* Bard., *A. undata* Mart (VILLACHICA, 1996).

O tucumanzeiro é uma palmeira espinhosa, com caules em número variável, de dois a seis. Atinge até 10 metros de altura e com 10 a 20 cm de diâmetro, cobertos com espinhos pretos com cerca de 20 cm de comprimento. Os cachos com cerca de 1 metro, 150 frutos elipsoides verdes que adquirem cor amarelo alaranjada quando maduros (FERREIRA et al., 2008) conforme imagem a seguir (Figura 1).

Figura 1 - Fruto e óleo de tucumã – espécie *Astrocaryum vulgare* Mart.



Fonte: Adaptado de AmazonOil®. A) Tucumãzeiro (palmeira do fruto tucumã – *Astrocaryum vulgare*); B) Fruto tucumã em cachos; C) Fruto tucumã partido ao meio evidenciando sua polpa (branca) e D) Óleo de tucumã - *Astrocaryum vulgare*.

Da amêndoa é extraído o óleo o qual é comestível e possui características organolépticas e nutricionais que atraem seu consumo pela indústria de alimentos e cosmética. Quanto à sua utilização popular, o tucumã, também denominado “manteiga de tucumã” possui muitas utilidades: o caroço é utilizado no artesanato, as folhas fornecem uma fibra resistente e a polpa é consumida *in natura* ou em forma de uma bebida, o “vinho de tucumã” (macerada com água). Além disso, pode-se fazer o biscoito, a barra de cereal e a farinha de tucumã (BORA et al., 2001).

A polpa contém elevada concentração de pró-vitamina A, o β -caroteno, valor só igualável à polpa do buriti (*Mauritia flexuosa*). Chaves e Pechnik (1947) constataram que o fruto é capaz de suprir três vezes as necessidades diárias de vitamina A de uma criança e representa a dose diária recomendada para um adulto que é de 800 RE/100 g. Desta forma, 100 gramas da polpa equivalem a 52.000 unidades de vitamina A.

O mesocarpo, epicarpo e o óleo de tucumã mostraram altos teores de β -caroteno, sugerindo possibilidades de aplicações como ingredientes visando à suplementação de pró-vitamina A em produtos alimentícios ou em formulações específicas (FERREIRA et al., 2008). O óleo possui ômega 3, 6 e 9, comportando-se como excelente emoliente com elevado poder de espalhabilidade e por isso, utilizado em produtos cosméticos (MORAES e GUTJAHR, 2009).

Em 1983, a EMBRAPA criou um projeto com o objetivo de coletar e avaliar plantas de cultura ou de exploração pré-colombiana, estando entre as espécies prioritárias para o início dos trabalhos o tucumã (*Astrocaryum vulgare*). Os pesquisadores evidenciaram as potencialidades do óleo devido aos relatos do alto teor de β -caroteno.

Santos e colaboradores (2015) realizaram estudo com a finalidade de avaliar os níveis de substâncias bioativas e a capacidade antioxidante total de frutos de palmeiras amazônicas nativas, visando identificar seus componentes funcionais e assim valorizar seu consumo. Foram encontrados predominantemente vitamina C, flavonoides e carotenoides, 19, 31 e 7,2 mg/100 g respectivamente.

Rocha e colaboradores (2014), na Reserva Extrativista Marinha de Soure no Estado do Pará, correlacionaram as indicações terapêuticas dos moradores da reserva com a composição química do óleo de tucumã. Segundo os moradores, o óleo é utilizado para tratamento de aproximadamente 13 doenças, entre elas infecciosas e parasitárias, de pele e do tecido subcutâneo, transtornos do sistema nervoso, digestivo, mio-ostearticular e geniturinário. A inflamação foi a enfermidade mais mencionada nas três comunidades.

Outros estudos também relatam as potencialidades deste óleo: cicatrização de feridas e tratamentos anti-inflamatórios (MONTEIRO et al., 2011), tratamento do reumatismo (PIMENTEL, 1994; COELHO-FERREIRA, 2009) e tratamento de luxações e contusões (SHANLEY e MEDINA, 2005). O óleo pode ser utilizado puro ou associado a outras espécies, como a arruda (*Ruta graveolens*), pirarucu (*Kalanchoe pinnata*) e o desinflama (*Kalanchoe sp.*) (ROCHA et al., 2014).

Assim, o óleo de tucumã apresenta versatilidade na utilização terapêutica para os moradores das comunidades, com destaque para o emprego em processos inflamatórios e a presença de substâncias inibidoras de mediadores pró-inflamatórios. Havendo uma concordância com as indicações das comunidades, tendo em vista que a tradição de uso do óleo de bicho acompanha as famílias por gerações (ROCHA et al., 2014).

2.1.3 Nanotecnologia no tratamento do câncer

Um dos maiores desafios no desenvolvimento e utilização de medicamentos para combater o câncer é direcioná-los aos tecidos comprometidos sem que outros órgãos sejam afetados. Assim, a nanotecnologia e nanociência visam à síntese e caracterização de materiais na escala nanométrica (10^{-9}) (FERNANDES e FILGUEIRAS, 2008).

Neste sentido, estudos demonstram a capacidade de diferentes nanocarreadores como, por exemplo, as NCs para melhorar a entrega de medicamentos contra o câncer (LI et al.,

2014; WAUTHOZ et al., 2015).O fármaco antitumoral associado a um nanocarreador pode melhorar a eficácia terapêutica quando comparado aos medicamentos em sua forma livre (RYAN, KAMINSKAS e PORTER, 2014; BORRAJO et al., 2016).

Em vista disso, o maior potencial de aplicação nanotecnológica é o sistema de carregamento e liberação de fármacos no organismo (DURÁN e AZEVEDO, 2002), pois o tamanho da nanopartícula (NP) lhe confere propriedades especiais que determinam seu movimento no interior do organismo. Em tumor sólido, por exemplo, os vasos sanguíneos possuem paredes crivadas de poros, por onde as NPs escapam para os tecidos que o envolvem. Como resultado acumula-se, enquanto minimizam outras partes do corpo, evitam os efeitos colaterais provocados pelos quimioterápicos (SAHOO, PARVEEN e PANDA, 2006).

Quando um medicamento penetra em uma célula tumoral, proteínas podem ejetá-lo antes que ela comece a agir, sendo um mecanismo natural de resistência. As NPs penetram na célula por endocitose, processo natural o qual cria-se uma bolsa na membrana celular em torno da partícula, levando-a para o interior da célula (JAMES, PHELPS e HOOD, 2003).

O lipossoma peguilado de doxorrubicina é um exemplo de composto quimioterápico tradicional, dentro de uma cápsula lipídica utilizada no tratamento dos cânceres de ovário, mieloma múltiplo e mama. A versão deste fármaco em lipossomas apresenta menor toxicidade para o coração que a doxorrubicina convencional, embora um novo efeito colateral tenha sido observado, a toxicidade da pele (JAMES, PHELPS e HOOD, 2003; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Neste sentido, as NPs poliméricas, NCs e nanoesferas (NEs), efetuam uma liberação gradual e constante do fármaco, devido ao seu tamanho. São protegidas do sistema imunológico e da degradação por outras substâncias que modificam sua distribuição, aumentando sua atividade farmacológica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Esses sistemas apresentam a capacidade de modificar a circulação intracelular dos fármacos através *Controlled Drug Delivery Systems* em que modulam a velocidade de liberação do medicamento no organismo mantendo sua concentração por maior tempo na circulação sanguínea e assim reduzindo o número de administrações (DURAN, MATTOSO e MORAES, 2006).

2.2 SEGURANÇA FARMACOLÓGICA DE NPs PARA APLICAÇÃO ANTITUMORAL

Embora a toxicidade dos nanomateriais seja uma realidade, os fármacos utilizados no tratamento do câncer também podem ser tóxicos contudo, nanocarreadores com fármacos direcionados às células tumorais, podem reduzir a toxicidade nos tecidos saudáveis (DROBNE, 2007).

Neste sentido, estudos vem sendo desenvolvidos com o intuito de minimizar os efeitos tóxicos destes quimioterápicos, como por exemplo, Tiwari e colaboradores (2012) que produziram imunolipossomas contendo anticorpos HER-2 (anti-HER-2) e doxorubicina os quais contornam a toxicidade associada à este fármaco. Kshirasagar e colaboradores (1997) utilizaram um cromóforo como excipiente para a veiculação do paclitaxel (Taxol[®]) com baixa solubilidade em água e efeitos colaterais tóxicos. Este quimioterápico é utilizado para tratamento dos cânceres de ovário, mama, pulmão e sarcoma de Kaposi. Um novo sistema que utiliza lipossomas termosensíveis ao Taxol[®] encapsulado foi utilizado e provou ser mais eficiente na entrega do medicamento, reduzindo o tamanho do tumor e produzindo menos toxicidade. Estes são exemplos em que a citotoxicidade dos nanomateriais muitas vezes é menor do que os fármacos que transportam, sugerindo benefícios de sua utilização como sistema de entrega.

Estudos de toxicologia convencional estão sendo adaptados para avaliar os efeitos dos nanomateriais. Entre as características físico-químicas necessárias para avaliação estão o tamanho, carga superficial, morfologia, composição química, solubilidade e aglomeração, como formação de corona proteica por exemplo. Os métodos podem incluir ensaios de viabilidade e proliferação celular, citometria de fluxo, fragmentação do material genético, ciclo celular, histologia, biodisponibilidade e biodispersão (DOKTOROVOVA et al., 2014).

A análise, *in vivo* e *in vitro* é a mais utilizada, no entanto, são encontrados dados imprecisos sobre toxicidade, em função de protocolos ainda não padronizados para o estudo acerca do efeito do biomaterial em modelos celulares ou animais. Além disso, a compreensão das interações bioquímicas é importante visto da perspectiva da segurança e desenvolvimento pré-clínico de sistemas baseados em nanotecnologia para entrega de medicamentos (FAN, ALEXEEFF and KHAN, 2015).

As interações entre NPs e sistemas biológicos, incluindo células, tecidos e organismos, constituem processos dinâmicos, influenciados pelas propriedades do nanossistema, como tamanho, área de superfície, forma, ângulo de curvatura, porosidade, cristalinidade superficial, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, funcionalidade química, carga de superfície e composição (KONG et al., 2011).

Por outro lado, os constituintes das NPs também podem influenciar a composição dos sistemas biológicos (proteínas, membranas, fosfolípidos, organelas, vesículas endocíticas, DNA e fluídos biológicos) com consequente diminuição da viabilidade celular nos ensaios de citotoxicidade (VERMA e STELLACCI, 2010).

Diferentes tipos de sistemas nanoestruturados projetados para entrega de medicamentos têm sido amplamente investigados nas últimas décadas. Visando uma abordagem voltada à avaliação do desempenho dos sistemas de entrega de fármacos nanoparticulados em comparação ao fármaco não nanoestruturado. A maioria destes estudos utiliza ensaios de citotoxicidade como principal ferramenta de análise para estabelecer a interação da NP com um sistema biológico (AFSHARI, DERAKHSHANDEH e HOSSEINZADEH, 2014).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são amplamente utilizados, às vezes como o principal objetivo do experimento, na investigação preliminar da toxicidade de um nanomaterial. Um exemplo é a utilização de linfócitos humanos, os quais circulam por todo o organismo, bem como são capazes de refletir possíveis danos recentes (HILLEGASS et al., 2010; ELSAESSER e HOWARD, 2012). A finalidade desses ensaios é prever um estudo toxicológico *in vivo*, complementando a sensibilidade e especificidade de estudos em animais (HANSEL, ENRIGHT e LEUSCHNER, 2007).

2.2.1 Avaliação de segurança farmacológica em modelos de peixes (*Rhamdia quelen*)

A avaliação da toxicidade de uma substância é realizada com o objetivo de prever os efeitos nocivos que poderá desencadear quando exposta às diversas vias de administração. Para cumprir este propósito, o modelo animal é o mais utilizado nos estudos toxicológicos, entretanto, sua utilização na pesquisa tem sido razão de diversas discussões em virtude do número de animais necessário e sofrimento causado, principalmente em estudos de toxicidade aguda (SCHECHTMAN, 2002).

Existe uma tendência mundial para reavaliar a utilização de animais nos experimentos, concretizada a partir de um programa denominado 3Rs: Substituição (*replacement*): visa substituir experimentos que utilizam animais por um método alternativo; Redução (*reduction*): redução do número de animais; e Refinamento (*refinement*): visa a diminuição da severidade dos processos. Essas técnicas compreendem a utilização de organismos como: bactérias, fungos, algas, peixes e crustáceos (SCHECHTMAN, 2002).

Neste contexto, o jundiá *Rhamdia quelen*, também conhecido por peixe-gato (classe: *Osteichthyes*, infraclasse: *Teleostei*, ordem: *Siluriformes*, família: *Heptapteridae*), é um peixe

de água doce, habitando lagos e rios. Prefere ambientes de água mais calma e possui importância econômica no Rio Grande do Sul, sendo uma espécie nativa bem adaptada em viveiros de piscicultura e consumida pela população. Podem ser encontrados desde o centro da Argentina até o sul do México (GOMES et al., 2000).

Os peixes são bons bioindicadores em bioensaios e biomonitoramentos, assim como mamíferos, pois podem sofrer bioacumulação. Respondem a agentes mutagênicos e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450, o qual desempenha papel fundamental no metabolismo de substâncias xenobióticas e compostos endógenos (GOKSOYR et al., 1991).

Rhamdia quelen é um tipo de peixe amplamente estudado em vários aspectos, como a sua ecologia (GOMIERO, SOUZA e BRAGA, 2007), fisiologia (HIGUCHI et al., 2011) e sua resposta à exposição a xenobióticos (MELA et al., 2013), metais (PEREIRA et al., 2016) e fármacos (GHELFI et al., 2016). Dado o seu longo período de vida, o peixe apresenta efeitos como a falha reprodutiva e a mortalidade em diferentes classes etárias em consequência de estressores ambientais (MELA et al., 2013). A partir do desequilíbrio no meio, ocorre declínio das defesas antioxidantes, formando espécies reativas de nitrogênio (ERNs), EROs ou ambas. Estas podem reagir com biomoléculas e induzir a peroxidação lipídica, quebras no DNA e oxidação de proteínas, levando potencialmente ao estresse oxidativo e consequentemente a processos patológicos (CONSTANTINI, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de óleo de tucumã (*Astrocaryum vulgare*), avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* e o efeito antitumoral *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterização da matriz química do óleo de tucumã (*Astrocaryum vulgare*):

- ✓ Quanto ao teor de fitosteróis;
- ✓ Concentração de beta-caroteno;
- ✓ Constituição de ácidos graxos.

b) Análise da atividade antioxidante do óleo de tucumã:

- ✓ Ensaio *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH);
- ✓ Ensaio *2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* (ABTS).

c) Estudos de pré-formulação com as nanocápsulas de tucumã (NT):

- ✓ Ensaio de inchamento do polímero;
- ✓ Desenvolvimento das NT pela metodologia de Fessi e colaboradores (1989);
- ✓ Desenvolvimento das NT pela metodologia de Venturini e colaboradores (2011);
- ✓ Estudo de estabilidade das NT;

d) Ensaio biológicos com as NT, nanocápsulas brancas (NB) e óleo de tucumã livre (TL):

- ✓ Ensaio corona proteica;
- ✓ Atividade hemolítica;
- ✓ Células mononucleadas de sangue periférico: *3-(4,5) dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio* (MTT), Diclofluoresceína Diacetato (DCFH-DA), *PicoGreen*[®] e Óxido Nítrico (NO);
- ✓ Células de adenocarcinoma de mama (MCF-7): MTT;
- ✓ Peixes *Rhamdia quelen*: DCFH-DA, *PicoGreen*[®], ON e doseamento das transaminases hepáticas.

4 EXPERIMENTOS INDEPENDENTES

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Precipitação do polímero pré-formado pela metodologia de Fessi e colaboradores (1989)

Os constituintes das suspensões de NCs foram adicionados em 2 fases como mostra a tabela 1: uma orgânica e outra aquosa. A fase orgânica foi composta pelo polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL), monoestearato de sorbitano (Span 60[®]), óleo de tucumã e acetona. Já a fase aquosa, foi constituída por água ultrapura milli-Q[®] e polissorbato 80 (Tween 80[®]).

Os componentes da fase aquosa e da fase orgânica foram pesados em béqueres distintos. Os mesmos foram mantidos sob agitação magnética contínua e moderada em banho-maria (temperatura de 40 °C) durante 60 minutos, até sua total solubilização. Em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente sob a fase aquosa. Para as NB as mesmas proporções foram utilizadas com a diferença de que foi utilizado um óleo inerte, o Crodamol GTCC.

A mistura formada foi mantida sob as mesmas condições de temperatura e agitação por 30 minutos e levada ao rotaevaporador a 80 rotações por minuto (rpm), visando a eliminação do excesso de água e solvente.

Tabela 1: Constituintes e suas respectivas quantidades das NCs conforme Fessi e colaboradores (1989).

| Fase orgânica | Quantidades |
|---------------------------|--------------------|
| PCL | 0,25 g |
| Span 60 [®] | 0,19 g |
| Óleo de tucumã | 0,77 g |
| Acetona | 66,75 mL |
| Fase aquosa | |
| Tween 80 [®] | 0,19 g |
| Água milli-Q [®] | 135,25 mL |

Para um volume final de 25 mL.

Estabilidade das formulações

As amostras foram submetidas ao estudo de estabilidade em refrigerador (2 a 8 °C), durante 30 dias. Os parâmetros físico-químicos: pH, tamanho, Índice de Polidispersão (IPD) e carga foram analisados nos seguintes tempos: inicial (zero), 7, 15 e 30 dias.

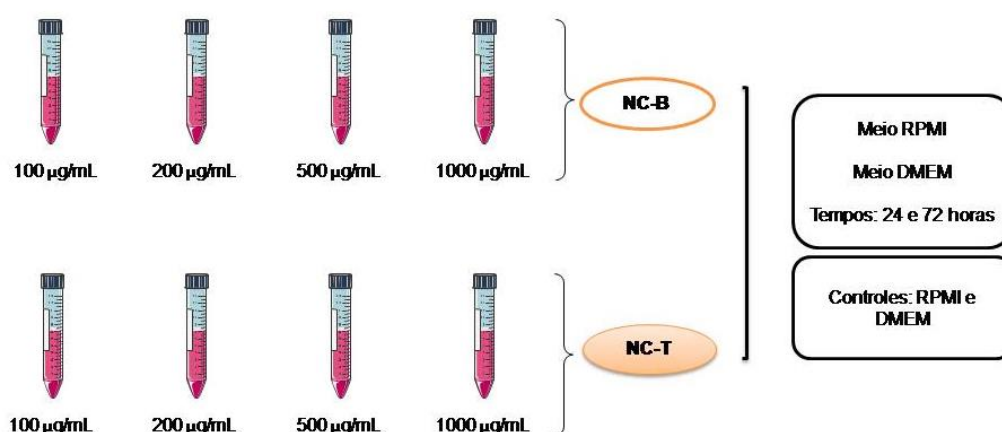
Efeito corona

Este ensaio teve por finalidade observar o comportamento das proteínas dos meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Invitrogen*[®]) e *Dulbecco Modified*

Eagle Medium (DMEM) (*Invitrogen*[®]) quando em contato com as NT e NB por 24 e 72 horas de incubação em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, simulando as mesmas condições de cultivo celular. Após estes tempos foi realizada a caracterização físico-química das NCs: pH, tamanho, IPD e carga. O ensaio foi desenvolvido da seguinte forma: os meios de cultura foram preparados contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (*Invitrogen*[®]) e 1% de antibióticos (Streptomicina/Penicilina) (*Invitrogen*[®]).

Foram preparadas as respectivas diluições de NCs nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg/mL. Em tubos cônicos foram adicionados 800 µL de tratamento e completados com os respectivos meios de cultura para um volume final de 10 mL. Apenas os meios de cultura foram utilizados como controle negativo. Para realizar a comparação, foram caracterizadas as suspensões de NB e NT. Esquema deste protocolo conforme a figura 1.

Figura 1: Esquema ilustrativo do ensaio corona proteica.



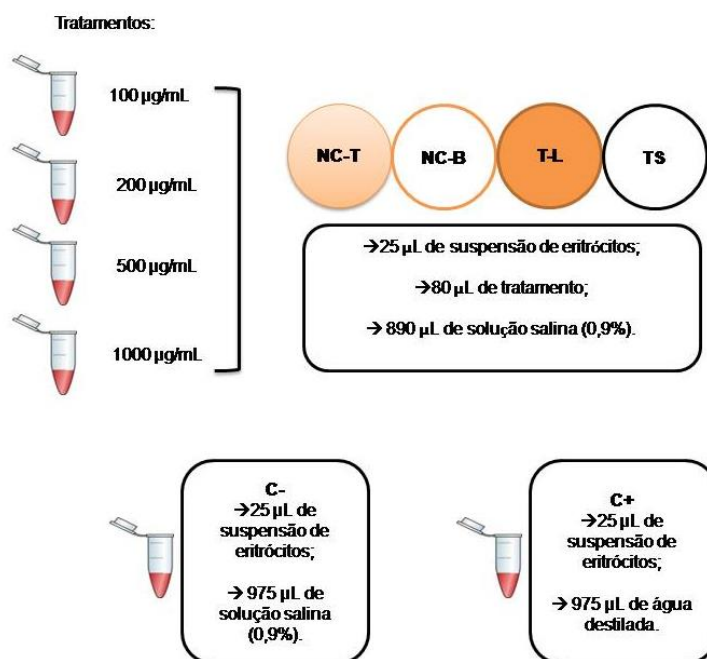
Hemólise

Este ensaio teve por finalidade avaliar a possível atividade hemolítica das NT, NB e TL. A metodologia utilizada foi conforme método descrito por Pape, Pfannenbecker e Hope 1987. Os eritrócitos foram isolados a partir de uma punção venosa em tubo de heparina (Vacuette[®]) de voluntários saudáveis de amostras de descarte do Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC) da Universidade Franciscana sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da mesma sob nº (CAAE: 31211214.4.0000.5306) com ausência de dados de identificação. Após a coleta, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm para retirar o plasma.

Após esta primeira etapa, foram realizadas 3 lavagens dos eritrócitos com solução salina (0,9%) da seguinte forma: após a retirada do plasma, os eritrócitos foram transferidos para um tubo cônico e nele foi adicionada solução salina proporcionalmente ao volume de eritrócitos (1:1). O tubo foi homogenizado suavemente e centrifugado 10 minutos a 3000 rpm. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes (até obtenção de um sobrenadante transparente). O mesmo foi retirado e ao tubo foi adicionado (1:1) solução salina e homogenizado.

As amostras foram incubadas por 10 minutos sob agitação rotatória leve a temperatura ambiente e logo centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e a leitura realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Para a realização das leituras nas maiores concentrações de NT e NB foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) (1:1). Como controles foram utilizados: controle negativo (C-) (eritrócitos + solução fisiológica 0,9%); controle positivo (C+) (eritrócitos + água destilada); tensoativos (TS) (mistura de tensoativos, Tween 80[®] + Span 60[®], nas mesmas concentrações dos tratamentos NB, NT e TL. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle positivo. O preparo das amostras foi realizado conforme figura 2.

Figura 2: Esquema ilustrativo do protocolo de hemólise.

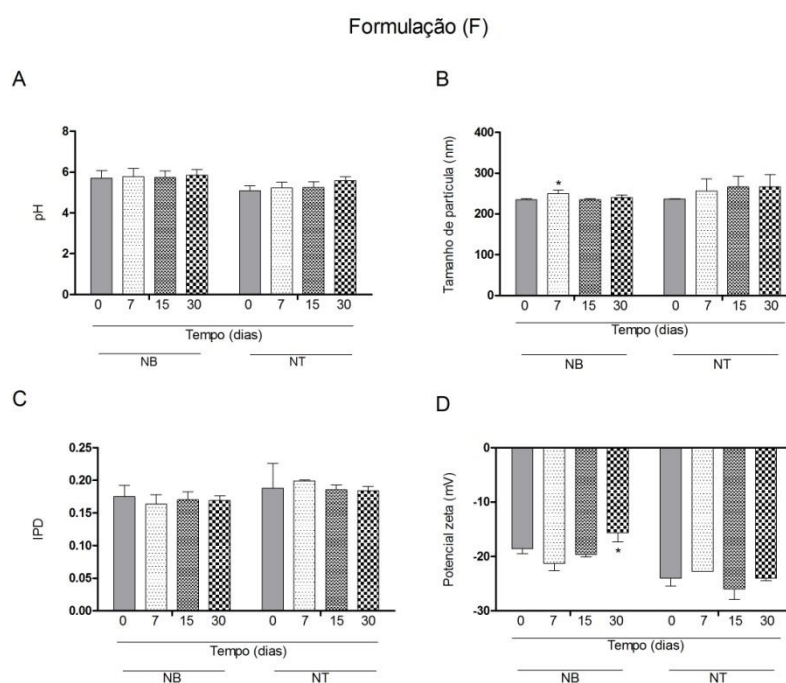


4.2 RESULTADOS

Estabilidade das formulações

As características físico-químicas como pH, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta, da formulação de Fessi e colaboradores (1989) durante 30 dias estão apresentadas na figura 3. Houve diferença significativa em comparação ao tempo inicial, em 7 dias, em que a NB apresentou aumento no tamanho de partícula. Além disso, a NB em 30 dias apresentou aumento do potencial zeta. Quanto aos outros parâmetros, todos permaneceram iguais ao tempo inicial.

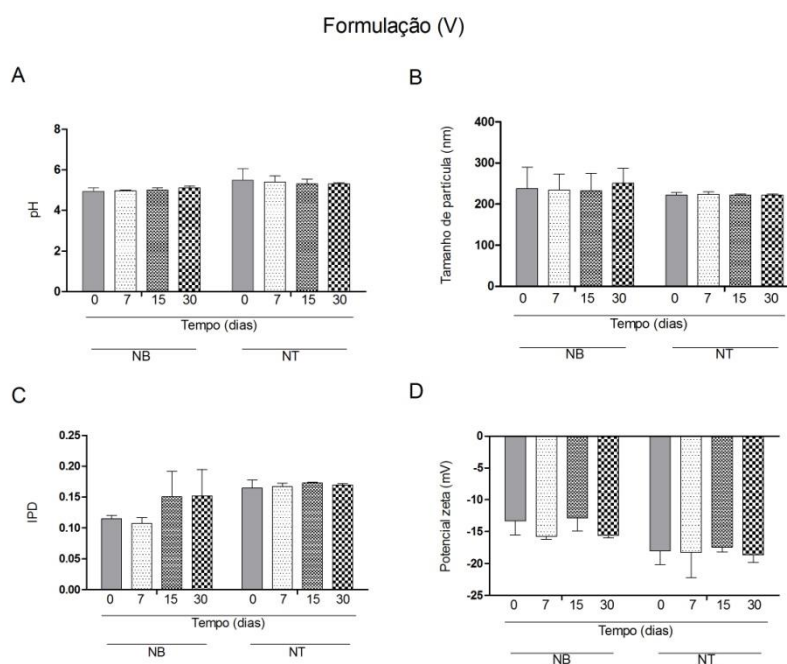
Figura 3: Estabilidade das formulações de Fessi e colaboradores (1989): NB e NT no tempo de 30 dias a temperatura entre 2 a 8 °C.



(F): Formulação com base na metodologia de Fessi e colaboradores (1989). Parâmetros analisados: pH, tamanho de partícula em nanômetros (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta em milivolts (mV). Tempos analisados: 0 (inicial), 7, 15 e 30 dias. Dados expressos com média \pm desvio padrão (D.P). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de *Dunnnett*, comparando os dias referentes a cada NC com o seu respectivo tempo inicial. Os dados demonstrados são referentes a três lotes independentes. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Quanto às formulações de Venturini e colaboradores (2011), a figura 4 apresenta seu estudo de estabilidade no tempo máximo de 30 dias. Nenhum parâmetro foi alterado durante os 30 dias analisados em comparação ao tempo inicial.

Figura 4: Estabilidade das formulações de Venturini e colaboradores (2011): NB e NT no tempo de 30 dias a temperatura entre 2 a 8 °C.



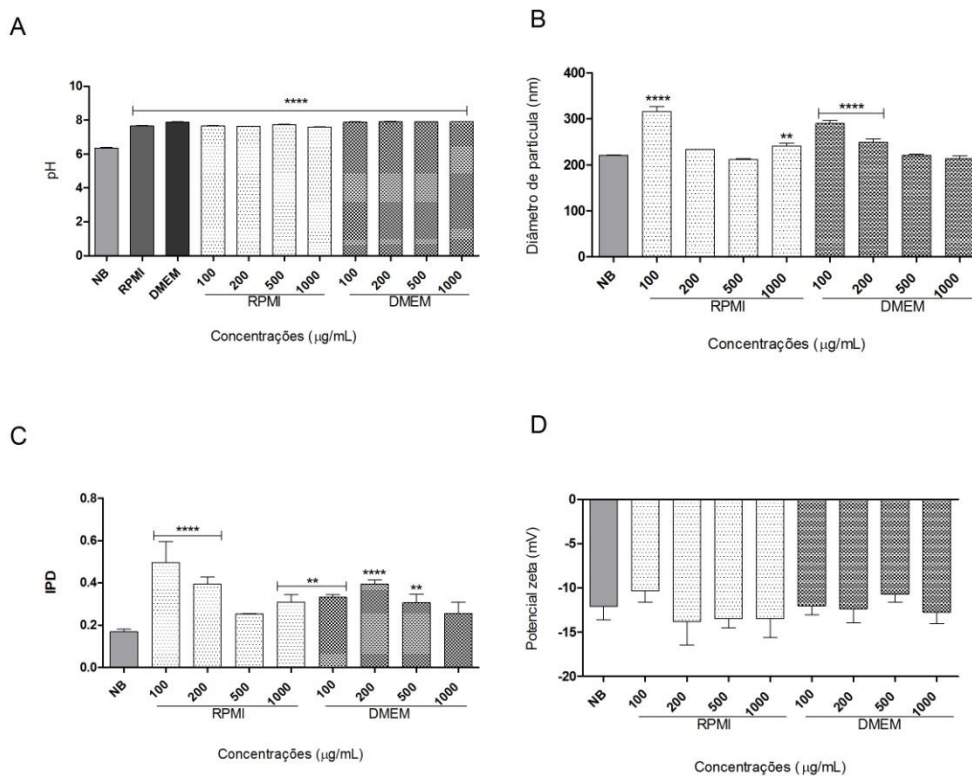
(V): Formulação com base na metodologia de Venturini e colaboradores (2011). Parâmetros analisados: pH, tamanho de partícula em nanômetros (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta em milivolts (mV). Tempos analisados: 0 (inicial), 7, 15 e 30 dias. Dados expressos com média \pm desvio padrão (D.P). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de *Dunnnett*, comparando os dias referentes a cada NC com o seu respectivo tempo inicial. Os dados demonstrados são referentes a três lotes independentes. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Efeito Corona

Para o efeito corona, foram analisados os parâmetros físico-químicos da caracterização das NCs nos tempos de 24 e 72 horas: pH, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta. Abaixo está apresentada a figura 5 com a análise das NB em 24 horas. O pH das NB ficou em torno de 7,0 após o contato com os meios de cultura. Houve aumento do tamanho de partícula nos dois meios de cultura: RPMI (100 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e DMEM (100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Assim como o IPD, que aumentou em: RPMI (100, 200 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e DMEM (100, 200 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Figura 5: Ensaio efeito corona. NB expostas por 24 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Efeito Corona 24 h: NB

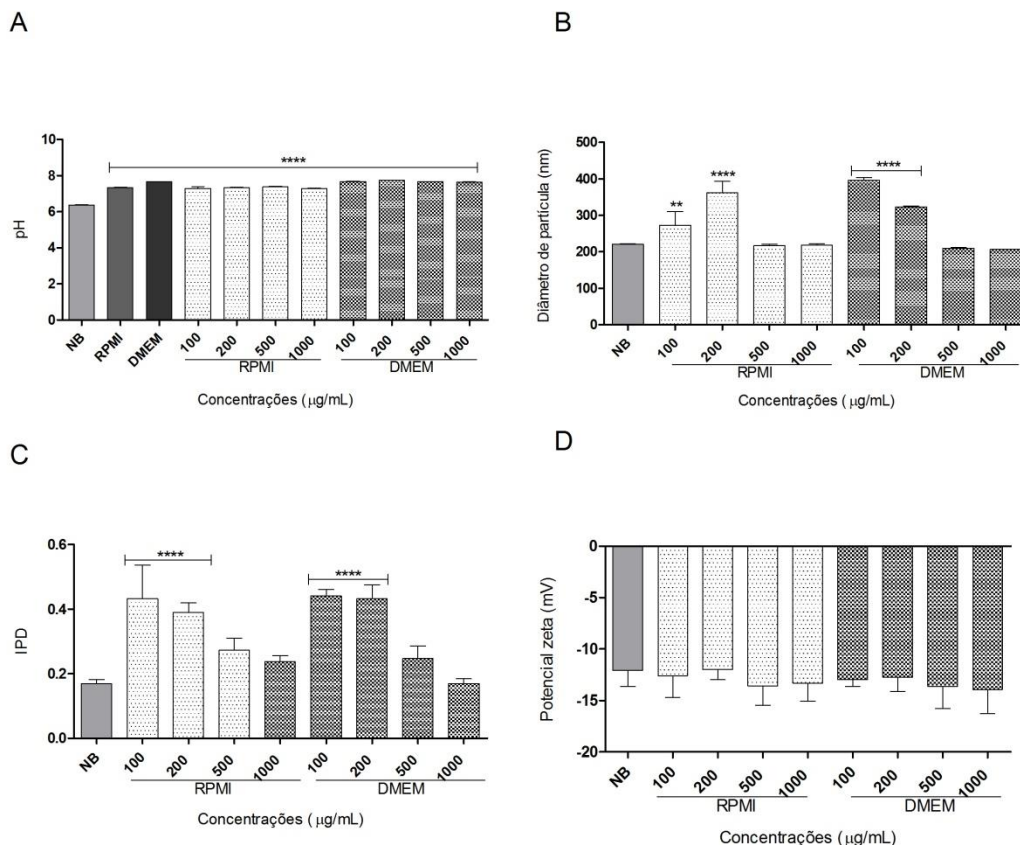


Parâmetros analisados: pH, tamanho de partícula em nanômetros (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta em milivolts (mV). Dados expressos com média \pm desvio padrão (D.P). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de *Dunnett*, comparando com as NB sem o contato com os meios de cultura. Os dados demonstrados são referentes a três lotes independentes. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A seguir está apresentada a figura 6, com a análise das NB em 72 horas. O pH das NB passou a 7,0 quando em contato com os meios de cultura. Houve aumento no tamanho de partícula e IPD nas concentrações 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ dos meios de cultura.

Figura 6: Ensaio efeito corona. NB expostas por 72 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Efeito Corona 72 h: NB

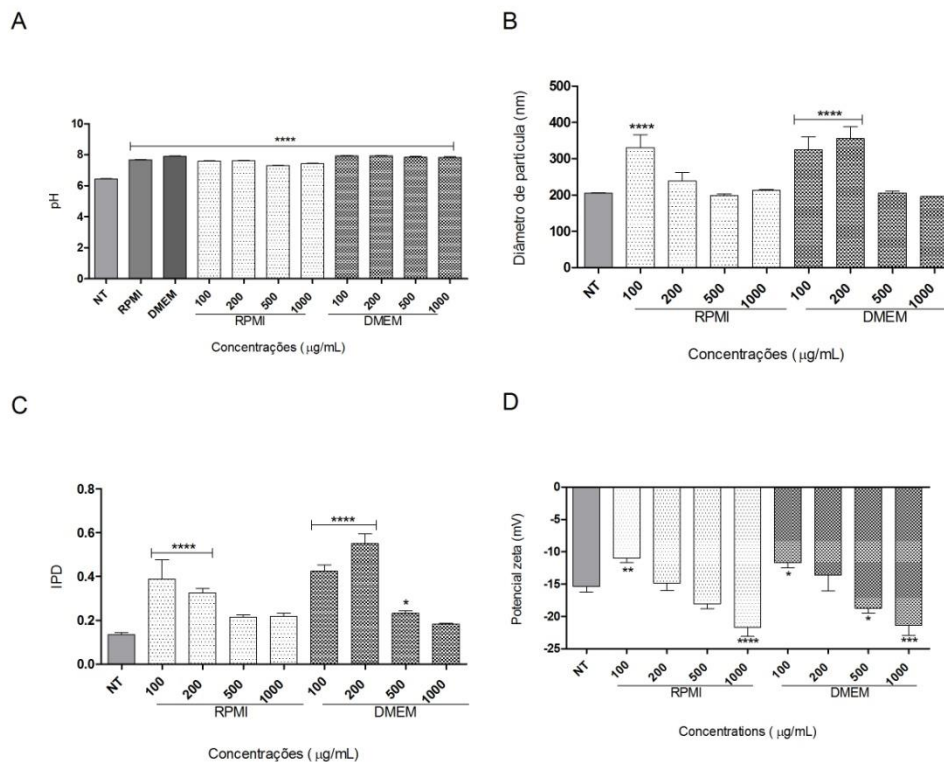


Parâmetros analisados: pH, tamanho de partícula em nanômetros (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta em milivolts (mV). Dados expressos com média \pm desvio padrão (D.P). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de *Dunnnett*, comparando com as NB sem o contato com os meios de cultura. Os dados demonstrados são referentes a três lotes independentes. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Abaixo está apresentada a figura 7 com a análise das NT em 24 horas de exposição aos meios de cultura. Houve aumento do tamanho de partícula nos dois meios de cultura: RPMI (100 $\mu\text{g/mL}$) e DMEM (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). Assim como o IPD, que aumentou em: RPMI (100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e DMEM (100, 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$). Quanto ao potencial zeta, em ambos os meios de cultura, aumentou na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ e diminuiu em 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 7: Ensaio efeito corona. NT expostas por 24 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Efeito Corona 24 h: NT

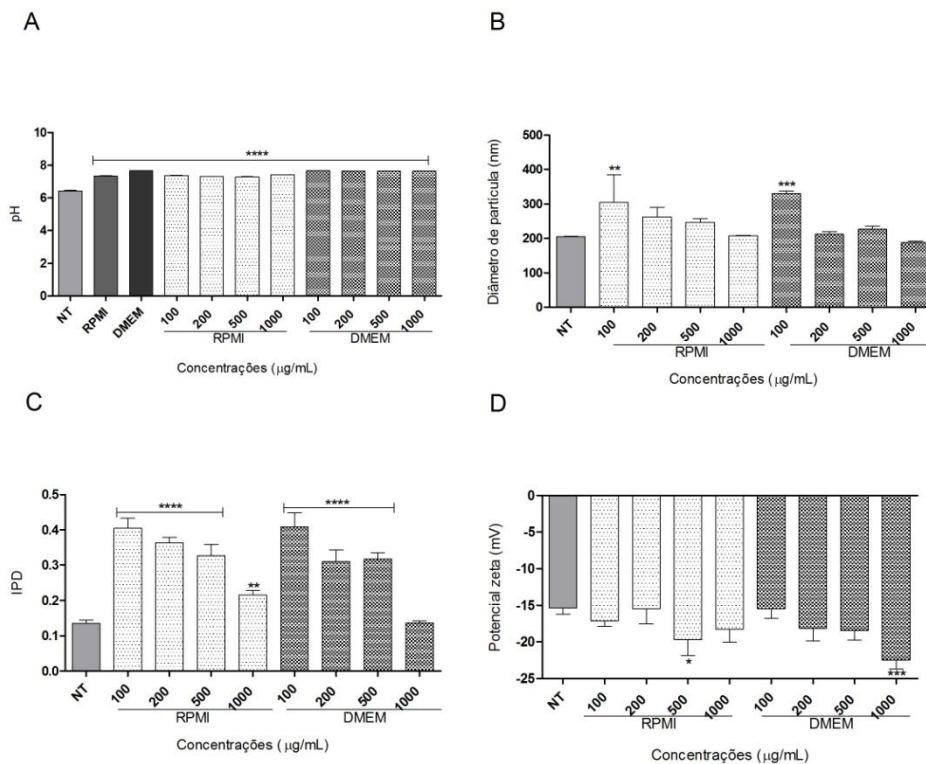


Parâmetros analisados: pH, tamanho de partícula em nanômetros (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta em milivolts (mV). Dados expressos com média \pm desvio padrão (D.P). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de *Dunnnett*, comparando com as NB sem o contato com os meios de cultura. Os dados demonstrados são referentes a três lotes independentes. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A seguir, a figura 8, com a análise das NT em 72 horas de exposição aos meios de cultura. Houve aumento do tamanho de partícula nos dois meios na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Assim como o IPD, que aumentou em todas as concentrações expostas e DMEM (100, 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$). O potencial zeta teve aumento em RPMI (500 $\mu\text{g/mL}$) e DMEM (1000 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 8: Ensaio efeito corona. NT expostas por 72 horas aos meios RPMI e DMEM nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Efeito Corona 72 h: NT

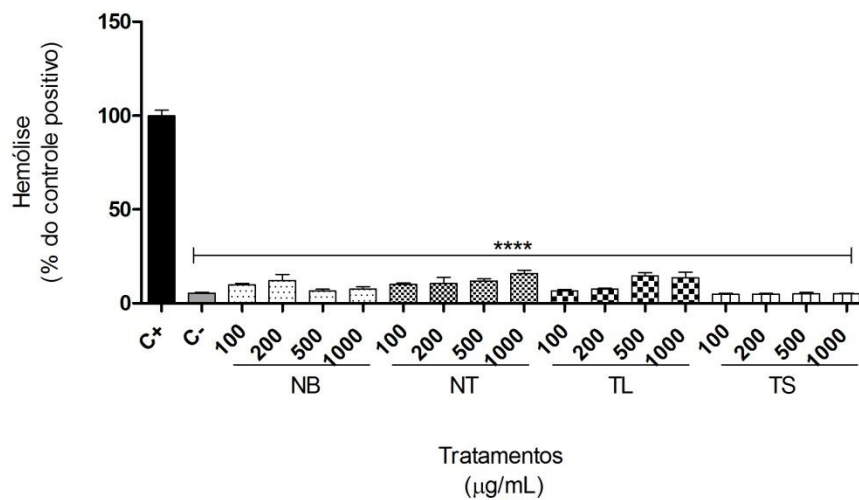


Parâmetros analisados: pH, tamanho de partícula em nanômetros (nm), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta em milivolts (mV). Dados expressos com média \pm desvio padrão (D.P). As análises foram realizadas por variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo teste de *Dunnett*, comparando com as NB sem o contato com os meios de cultura. Os dados demonstrados são referentes a três lotes independentes. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Hemólise

Na figura 9 está apresentado o resultado do ensaio de hemólise nos eritrócitos, onde as concentrações testadas, NB, NT, TL e TS não apresentaram atividade hemolítica sendo diferentes controle positivo do ensaio, o qual apresenta este efeito.

Figura 9: Ensaio hemólise.



Controle negativo (C-): eritrócitos em solução salina. Controle positivo (C+): eritrócitos em água destilada. Resultados expressos em porcentagem do controle positivo. Dados expressos por média \pm desvio padrão (DP). As análises foram seguidas por Anova de uma via, seguida de teste *post hoc* de *Dunnnett*. Valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 MANUSCRITOS

A continuação dos resultados desta tese está apresentada sob a forma de manuscritos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências específicas, encontram-se compondo os manuscritos, os quais estão estruturados de acordo com as normas das revistas que foram submetidos, sendo: **Natural Product Research** (Manuscrito I) e **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** (Manuscrito II).

Manuscrito I: Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of Tucumã oil nanocapsules in breast adenocarcinoma cells (MCF-7).

Manuscrito II: Evaluation of the *in vivo* safety of tucumã oil nanocapsules in experimental model of silver catfish *Rhamdia quelen*.

5.1 MANUSCRITO I

Submetido ao Periódico Natural Product Research.

Phytochemical analysis and evaluation
of the antioxidant and antiproliferative effects of Tucumã oil nanocapsules in breast
adenocarcinoma cells (MCF-7)

Kátia Nascimento¹, Priscila Marquezan Copetti², Andressa Fernandes³, Bruna Klein⁴, Aline Fogaça⁵, Leila Queiroz Zepka⁶, Roger Wagner⁷, Aline Ferreira Ourique², Michele Rorato Sagrillo², José Edson Paz da Silva¹.

Authors' institutional affiliations

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences. Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil.

²Postgraduate Program in Nanosciences. Franciscan University, Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil.

³Department of Technology and Food Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil.

⁴Laboratory of Bromatology, Franciscan University, Santa Maria, Rio Grande do Sul state, Brazil.

Corresponding author:

Michele Rorato Sagrillo

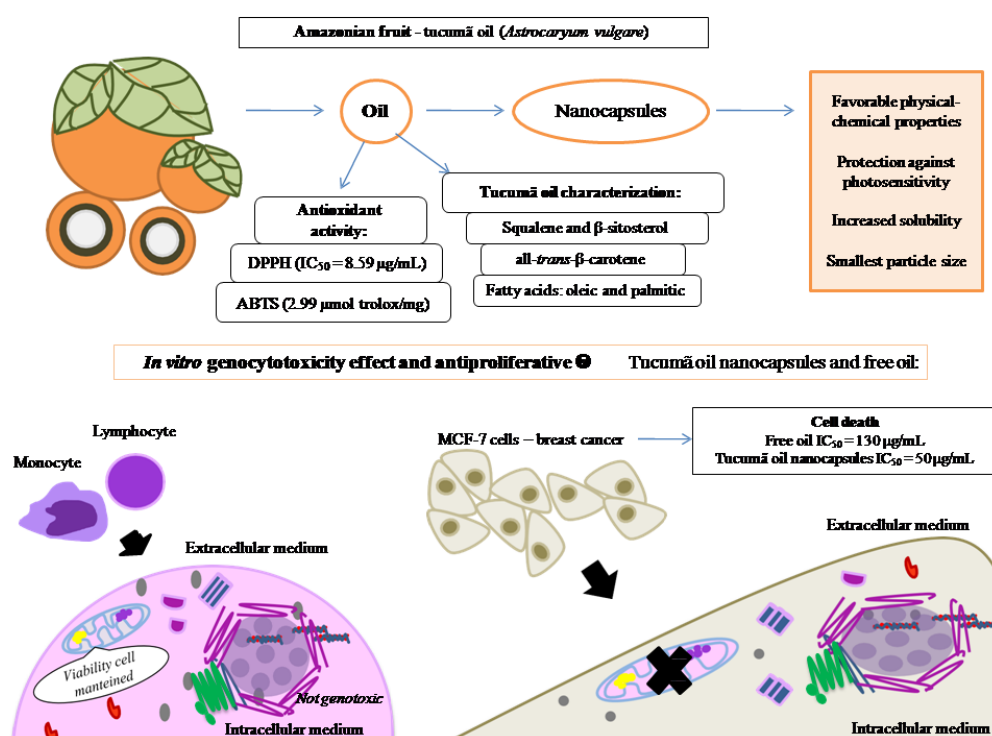
e-mail: sagrillorm18@gmail.com

Permanent address: Rua dos Andradas, 1614.

Zip code: 97010-032, Brazil.

Phone: +55 55 3220-1200

Graphical Abstract



Abstract

In this work was to develop an inedited nanocapsule with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*). The oil presents of phytosterols (squalene and β -sitosterol), all-*trans*-beta-carotene, acids oleic and palmitic. Antioxidant activity showed a good performance in DPPH and ABTS assays. The nanocapsules were prepared and demonstrated in their characterization particle size ($206 \pm 0.69 \text{ nm}$). The cytogenotoxicity evaluation was performed using the MTT, dichlorofluorescein, nitric oxide and dsDNA PicoGreen[®] assays. Antitumor efficacy assays in MCF-7 cells demonstrated that free oil and tucumã nanocapsules had IC_{50} of 130 and 50 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Thus, previous studies of toxicity are relevant, as they generate future subsidies, aiming at the potential application of nanostructures and in addition, the promising effect of NCs of tucumã oil on the antiproliferative effect in breast adenocarcinoma cells was evidenced.

Keywords: Cytotoxicity, breast cancer, nanocapsules, tucumã, oil.

Introduction

Diet in human health has been debated and epidemiological studies have indicated that high vegetable and fruit intake is associated with reduced risk of chronic diseases such as arteriosclerosis, diabetes and cancer. These effects have been attributed to substances with antioxidant activity, able to deactivate free radicals (Nishino et al. 2005). In this context, the Amazon biome, northern region of Brazil, has been contributing to research on the properties of its fruits, in particular the tucumã. However, there are some fruits that present high carotenoids concentrations that the potential anticancer activities were not studied. This is the case of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) an Amazonian palm fruit that is one of the traditional components of the regional breakfast (Shanley et al. 2010).

In addition to this, *Astrocaryum vulgare* Mart (Villachica 1996), arouses interest because its oil is described as having healing and anti-inflammatory properties (Monteiro et al. 2011), besides the high content of β -carotene, intense orange, being photosensitive and with high oxidation capacity. It is a source of fatty acids which makes it dense, making solubility difficult. Thus, the best alternative for applicability of this oil would be its nanocapsules production, making it soluble and protected from light.

In view of these aspects, the main objective of the present study was to perform the phytochemical characterization of tucumã oil, to verify its antioxidant activity, to produce and characterize a nanocapsule, as well as to evaluate its cytogenotoxic profiles in mononuclear and antiproliferative cells against breast adenocarcinoma cells MCF-7.

Experimental

Characterization tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart)

Extraction and physical composition of the oil

Virgin tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) was obtained commercially from AmazonOil[®] Industry, located in Ananindeua – PA, Brazil. Fruits were collected from the Amazon Forest and the oil was obtained from the pulp by cold pressing with no use of preservatives or solvents for its extraction. Product code: 032; Lot: AMO 032-001/ 0317; Number of analysis: 020/2017.

Phytosterols determination

Phytosterols were determined according to Meinhart et al. (2017) methodology with some modifications. Was utilized a gas chromatograph equipped with flame ionization detector (GC-FID) - Varian, Star model 3400CX (CA, USA) and automatic sampler - Varian,

model 4200 (CA, USA) and separated in a capillary column BPX-5 (SGE; Australia - 25 m × 0.22 mm × 0.25 μm). The quantification was performed by the external standardization method, comparing the areas obtained from solutions of known concentrations of the standard containing phytosterols squalene, β-sitosterol and α-tocopherol, with the areas obtained from the samples by means of a standard curve.

Carotenoids determination

The carotenoids extraction was performed by the method of Mandelli et al. (2012). Carotenoids were analyzed by HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped to quaternary pump (model LC-20AD). Carotenoids separation was performed on a column C30 YMC (5 μm, 250 x 4.6 mm) (Waters, Wilmington-DE, USA). HPLC-PDA parameters were defined as described by De Rosso and Mercadante (2007). Total carotenoid content was calculated as the sum of the contents of each individual carotenoid separated in column C30.

Fatty acids composition

For fatty acids analysis, the derivatization of the oil was performed according to Hartman and Lago (1973). Results were calculated and expressed as milligram of fatty acid/gram of oil (Visentainer 2012).

Antioxidant activity of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart)

DPPH assay

Antioxidant activity of oil was analyzed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, by Brand-Williams et al. (1995), updated by Roesler et al. (2007). A concentration curve between 1 and 150 μg/mL was constructed and DPPH was the negative control. The concentration of tucumã oil capable of inhibiting the DPPH radical by 50% was calculated by IC₅₀.

ABTS assay

The assay with the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical was performed according to Re et al. (1999). A curve was constructed with the vitamin E analog, trolox, at the concentrations of 10, 25, 50 and 75 μg/mL. Results expressed in μmol trolox/mg.

Tucumã oil nanocapsules

Polymer swelling assay

The purpose of this experiment was to evaluate the interaction of poly- ϵ -caprolactone (PCL) polymer with tucumã oil over 90 days. A polymer film was produced (concentration of 0.5 g/mL) and contacted with tucumã oil and after, it was weighed at 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days in a calibrated balance.

Nanocapsules development

Tucumã oil NCs (TN) were prepared by precipitation of preformed polymer, according Venturini et al. (2011) (Table S1). The constituents of the NCs suspension were added in two phases, one organic and one aqueous. The organic phase was composed of the polymer PCL, sorbitan monostearate (Span 60[®]), tucumã oil and acetone. Already the aqueous phase, by ultrapure water milli-Q[®] and polysorbate 80 (Tween 80[®]). The aqueous and organic phase components were weighed and kept at 35-40 °C under moderate and continuous magnetic stirring for 60 minutes until complete solubilization of the constituents. Then, the organic phase was slowly poured under the aqueous phase, observing the Tyndall effect. The mixture formed was maintained under the same temperature and stirring conditions for 30 minutes and rotated at 80 rotations per minute (rpm) to remove excess water and solvent.

TABLE S1

Nanocapsules physicochemical characterization

Suspension refractive index

TN refractive index was performed by bench refractometer directly in suspensions.

pH

pH analyse was performed by calibrated potentiometer directly in suspensions. The results were expressed as the average of three determinations.

Size and polydispersion index

TN mean diameter and polydispersion index (PDI) determination was performed through the dynamic light scattering (Zetasizer[®]Nanoseries, Malvern Instruments). Two volumetric flasks for 10 mL were prepared, one for each suspension, and was added ultrapure

filtered water. Then 20 μL of each suspension was added and then transferred to a cuvette for reading. The results were determined through the average of three analyzes.

Zeta potential

NCs charge was performed through by electrophoresis (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern Instruments). Two volumetric flasks for 10 mL were prepared, one for each suspension, and was added sodium chloride (NaCl - 0.9 mM) filtered. Then 20 μL of each suspension was added and then transferred to a cuvette for reading. The results were determined through the average of three analyzes.

***In vitro* cytogenotoxicity effect and antiproliferative**

PBMC's treatments

The safety evaluation of TN and free tucumã oil (FT) at the concentrations of 100, 200, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was analyzed in cytogenotoxicity marker cells, PBMC's. Samples were isolated from a venous puncture in a heparin tube (Vacuette[®]) of healthy volunteers under the approval of the Ethics Committee on Human Research under No. (CAAE: 31211214.4.0000.5306) with absence of identification data. To obtain PBMC, Histopaque[®] reagent was used, which separates the cells by density gradient.

A concentration of 2×10^5 cells/mL was seeded, which were treated and as controls: negative control: C- (cells in culture medium) and positive control: C+ (hydrogen peroxide - H_2O_2 : 100 μM). After treatments the plates were incubated in CO_2 oven at 37 °C for 24 hours.

MCF-7 treatments

The antiproliferative activity of TN and FT was evaluated in the breast adenocarcinoma MCF-7 lineage, purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). Cells were maintained in culture bottles in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen[®]) and 100 U/mL streptomycin (Invitrogen[®]). Were maintained in a humid atmosphere containing 5% carbon dioxide (CO_2).

MCF-7 cells are adherent, thus, after obtaining a confluency, 2×10^5 cells/mL were first seeded in 96 well plates 24 hours prior to the treatments, for adherence to the culture plate. After 24 hours the TN and FT treatments were started. Cells were exposed to treatments for 72 hours in an oven containing 5% CO_2 . A concentration curve was stipulated: 1, 5, 10, 20, 50, 70, 100, 130, 150, 170 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The controls consisted of negative control (C-):

cells in culture medium and positive control (C+): *all-trans*-retinoic acid (ATRA) chemotherapy at 1 μM concentration. The ATRA control was used because, international protocols already make use of it in the treatment of breast cancer due to its inhibitory activity of the cellular growth.

MTT assay

The method was performed as described by Mossman (1983). The cell viability was determined using the formula: Viability % = (optical density of sample/optical density of control) \times 100. The 50% inhibition proliferative concentrations (IC_{50}) values of tucumã oil and NT was also calculated.

2.6.4 Nitric oxide assay

This assay detects the presence of organic nitrite in the sample which is analyzed by the formation of a pink color when the Griess reagent is added to the sample containing nitric oxide (NO^{2-}), according to Choi et al. (2012). The results were expressed as a percentage of the negative control.

Dichlorofluorescein assay

2,7-dichloro-fluorescein-diacetate (DCFH-DA) fluorimetric assay of was aimed at analyzing the content of reactive oxygen species (ROS) (more sensitive to H_2O_2) directly proportional to the fluorescence intensity, providing an indirect measure of the total ROS rate, according to Esposti et al. (2002). The results were expressed as a percentage of the negative control.

Quant-iT™ dsDNA PicoGreen® assay

This technique can be used DNA quantification released in the medium due to cellular apoptosis, according to methodology of Há et al. (2011). The results were expressed as a percentage of the negative control.

Statistical

Statistical program GraphPad Prism® (version 6.0) was used to perform the statistical analyzes. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). All experiments were conducted in triplicate and Anova was used for one route followed by Dunnet's post hoc test.

Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Where, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Results and discussion

Tucumã oil characterization

Oil extraction and physical composition

According to certificate analysis of the manufacturer AmazonOil[®], the density of tucumã oil was 0.975 g/cm^3 ; refractive index (40 °C): 1.43 Zeiss; acidity index: 15.25 mg NaOH/g oil; peroxide index: 5 meq/1000 g, iodine index: 5 $\text{gI}_2/100 \text{ g}$; saponification index: 181.4 mg KOH/g. Total bacteria, fungi and yeasts: absent.

Phytosterols determination

Figure S1 shows the chromatogram for content of phytosterols present in tucumã oil, where squalene and β -sitosterol were found. Phytosterols are essential substances to animal and plant cell membranes, having antioxidant, anti-inflammatory properties (Lomenick et al. 2015), analgesic and cholesterol lowering (Maguire et al. 2004).

FIGURE S1

Carotenoids determination

Table S2 shows the carotenoid profile from tucumã oil, the major compound was *all-trans*- β -carotene ($212.69 \pm 0.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). This data is in agreement with other studies, which emphasize high content of β -carotene in the fruit of tucumã (Ferreira et al. 2008; Sagrillo et al. 2015). This carotenoid is a precursor of vitamin A, a chemopreventive, antioxidant compound, capable of regulating cell growth and differentiation by controlling ROS production (Lomenick et al. 2015) and lipid peroxidation (Elliott 2005).

TABLE S2

Fatty acids composition

Fatty acids (FA) content of tucumã oil is shown in table S3. Oil was characterized with high amounts of oleic acid (unsaturated) with 368.7 mg FA/g (omega 9 family, ω -9), as well as palmitic acid (saturated) with 198.23 mg FA/g, being in accordance with the literature (Ferreira et al. 2008). Diets rich in oleic acid raise levels of High Density Lipoprotein (HDL), reducing Low Density Lipoprotein (LDL) levels (Mozaffarian et al. 2005).

TABLE S3

Tucumã oil antioxidant activity

DPPH and ABST assays

The DPPH assay had IC_{50} of 8.59 $\mu\text{g/mL}$ and the ABST TEAC = 2.99 μmol trolox/mg. The ABTS assay it is a capturing method ABTS radical cation which, express of the antioxidant capacity of trolox equivalent, or TEAC (Sánchez-Moreno 2002). In a study conducted by Sagrillo et al. (2015), the antioxidant activity of pulp and bark extract of tucumã of the species *Astrocaryum aculeatum* was analyzed, where the IC_{50} were 11.24 and 8.98 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In a study conducted by Kollen et al. (2013) with buriti fruit, which is also a palm native to the Amazon Biome, presented in the DPPH assay an IC_{50} of 12.28 mg/mL.

Tucumã oil nanocapsules

Polymer swelling assay

Through 90 days of analysis, no increase in polymer mass in contact with tucumã oil was observed compared to the initial time (Figure S2). The swelling test of the polymer was performed in order to verify if the polymer selected for composition of the wall of the NCs would be dissolved by the components of the oily core. The PCL appears to maintain its stability after the addition of tucumã oil. This methodology was proposed by Guterres et al. (1995) in order to determine the swelling of the polymer by the oily core components, there by assessing the suitability of the raw materials (polymers and oils) for the formulation of NCs. Thus, when the masses of the polymers remain constant at certain time intervals, there is an indication that their integrity is being maintained.

FIGURE S2

Nanocapsules physicochemical characterization

Refractive index of TN suspension was 1.61 ± 0.005 . This is important for analysis of size, PDI and zeta potential. pH, size, PDI and charge values of the NCs are showed table S4. TN had size, PDI, charge and pH values according to the literature. pH of TN suspension, was 6.43 ± 0.03 for both. Mora-Huertas, Fessi and Elaissari (2010), consider that the pH values of NC suspensions are between 3.0 and 7.5 when applying nanoprecipitation, emulsion-diffusion or layer-by-layer methods. In this study, the method was the precipitation of the preformed polymer.

TN size was 206 ± 0.69 nm. The average diameters of NCs prepared from preformed polymers are between 250 and 500 nm. Diameters smaller than 500 nm as well as the use of

biocompatible materials are important characteristics for the biological application of NPs (Bender et al., 2012). PDI of TN was 0.14 ± 0.007 . PDI represents the uniformity of suspended particles in which values between 0.1 and 0.25 indicate a narrow size distribution and values greater than 0.5 indicate wide distribution (Wu et al. 2011).

The charge was measured through the zeta potential of TN was -15.4 ± 0.70 mV. The zeta potential provides the surface charge of the NP, which determines its stability in the suspension. This parameter depends mainly on the chemical nature of the polymer and the stabilizing agents (Mora-Huertas, Fessi and Elaissari, 2010). TN were prepared with PCL, which has a negative charge. The zeta potential is a physical property and corresponds to the electric potential of the NPs influenced by the composition of the NC and the medium in which they are dispersed (Wu et al., 2011; Lobato et al., 2013). This parameter is widely used to indicate suspension stability in colloidal dispersions, where values greater than 30 mV and less than 30 mV promote high stability preventing particle aggregation (Mohanraj and Chen, 2006).

TABLE S4

***In vitro* cytogenotoxicity effect and antiproliferative**

PBMC's

Figure S3 shows the results of the cytogenotoxicity assays after 24 hours of treatment. In MTT assay (A), NT at concentrations of 100, 200 and 500 $\mu\text{g/mL}$ slightly decrease in cell viability (10%). Kong et al. (2009) classified the reduction of cell viability in categories, being considered slightly cytotoxic when it is between 60 to 90%. Genotoxicity assay (B), no increase of DNA in cell supernatant in any of the treatments. In the DCFH-DA (C) assay only FT (200 $\mu\text{g/mL}$) increased ROS. β -carotene can prevent cell damage and prevent the production of ROS (Bestwick and Milne 1999). NO levels (D) increased in all contractions of TN and 200 $\mu\text{g/mL}$ of the FT. Macrophages after 24 hours exposure to lipid NPs also increased NO (Le Roux et al. 2017). NPs greater than 100 nm can be internalized into macrophage precursor cells by increasing NO levels (Yu et al. 2012).

FIGURE S3

MCF-7

Figure S4 shows the MTT assay in MCF-7 cells after 72 hours exposure to TN and FT. The IC_{50} of TNs was 50 $\mu\text{g/mL}$, whereas that of TF, 130 $\mu\text{g/mL}$. The physical-chemical properties of TN, which due to the smaller size, increase the permeability by the cellular

membrane and cell retention, potentializing the action of the oil. By maintaining it stable and released gradually with a stable antiproliferative effect when compared to FT, which only maintains it in higher concentrations. There is evidence that β -sitosterol presents antitumor action against prostate, colon and breast cancer according to studies carried out by Awad (2007). β -carotene can regulate the expression of genes responsible for cell proliferation and differentiation and apoptosis of tumor cells (Kucuk 2004).

FIGURE S4

Conclusion

The results of this report indicate that tucumã oil has antioxidant activities, no cytotoxicity and genotoxicity, either in free or nanoencapsulated form and TN has antiproliferative potential of against MCF-7. The anticancer activity of the TN may be related to the presence of β -sitosterol, squalene (phytosterols), all-trans- β -carotene, oleic acid, antioxidant capacity, as well as for better permeability and retention in the tumor cell. This study is the first to report the biological potentials of a tucumã oil nanocapsule of this species.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support from UFSM, UFN, FAPERGS (ARD 17/2551-0000805-7) and AmazonOil® Industry.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Awad AB, Chinnam M, Fink CS, Bradford PG. (2007). β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomed.* 14:747–754.
- Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DSP, Guterres SS, Pohlmann AR. (2012). Hemocompatibility of poli- ϵ -caprolactone lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int J Pharm.*426:271-279.
- Bestwick CS, Milne L. (1999). Effects of L-carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. *Biochim Biophys Acta.* 1474:47-55.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Int.* 28:25-30.

- Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol.* 280(2): 164-170.
- De Rosso VV, Mercadante AZ. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem.*55:5062-5072.
- Elliot R. (2005). Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochim Biophys Acta.*1740(2):147-54.
- Esposti MD. (2002). Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods.* 26: 335-340.
- Ferreira ES, Lucien VG, Amaral AS, Silveira CS (2008). Physicochemical characterization of the fruit and oil extracted from tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). *Alim Nutr.*19:427-433.
- Guterres SS, Fessi H, Barrat G, Devissaguet JP, Puisieux F (1995). Poly(d,l-lactide) nanocapsules containing diclofenac. I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.* 13:57–63.
- Há TTN, Huy NT, Murao LA, Lan NTP, Thuy TT, Tuan HM, Nga CTP, Tuong VV, Dat TV, Kikuchi MK, et al. (2011). Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One.*6:1-7.
- Kong N, Jiang T, Zhou Z, Fu J. (2009). Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells *in vitro*. *Dent Mater.*25:1371-1375.
- Koolen HF, Da Silva FMA, Gozzo FC, De Souza AQL, De Souza ADL. (2013). Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa*) by UPLC–ESI-MS/MS detector. *Food Res Int.* 51:467–473.
- Kucuk O. (2004). Cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21(3-4):189-97.
- Le Roux G, Moche H, Nieto A, Benoit J, Nessler F, Lagarce F. (2017). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules. *Toxicol In Vitro.* 41:189-199.
- Lobato KBS, Paese K, Forgearini JC, Guterres SS, Jablonski A, Rios AO. (2013). Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chem.* 141:3906–3912.
- Lomenick B, Shi H, Huang J, Chen C. (2015). Identification and characterization of β -sitosterol target proteins. *Bioorg Med Chem Lett.*25:4976-4979.
- Maguire LS, O’Sullivan SM, Galvin K, O’Connor TP, O’Brien NM. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr.* 55(3):171-178.
- Mandelli F, Miranda VS, Rodrigues E, Mercadante AZ. (2012). Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremeophile microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1781-1790.

- Meinhart AD, Ferreira TF, Petrarca MH, Silva LH, Moraes MR, Ballus CA, Souza PO, De Souza TCL, Wagner R, Bolini HMA, et al. (2017). Mixed oil formulations enriched in essential fatty acids and reduced ratio of n-6/n-3. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* 119:1-11.
- Mohanraj VJ, Chen Y. (2006). Nanoparticles – a review. *Trop J Pharm Res.* 6:561-573.
- Monteiro MVB, Bevilaqua CML, Palha MDC, Braga RR, Schwanke K, Rodrigues ST, Lameira OA. (2011). Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. *Acta Amazônica.* 4(2):233-242.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 385:113–142.
- Mossman TIM. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.
- Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, Stampfer MJ, Willett WC, Siscovick DS, et al. (2005). Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation.* 111(2):157-64.
- Nishino H. et al. (2005). Cancer prevention by phytochemicals. *Oncology.* 69:38-40.
- Re R, Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTA radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26(9):1231-1237.
- Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CA, Pastore GM. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Sci Technol Int.* 27:53-60.
- Sagrillo MR, Garcia LFM, Souza Filho OC, Duarte MMF, Ribeiro EE, Cadoná FC, Cruz IBM. (2015). Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chem.* 173:741-748.
- Sánchez-Moreno C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci Technol Int.* 8:121-137.
- Shanley P, Medina G. (2005). *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica.* Belém: CIFOR, Imazon. 300p.
- Venturini CG, Jägerb E, Oliveira CP, Bernardic A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR. (2011). Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 375:200-208.
- Villachica H. (1996). *Frutales y hortalizas promisorias de La Amazonía: tratado de cooperación amazónica.* Lima: Secretaria Pro-Tempore, Tratado de Cooperación Amazónica. 367p.
- Visentainer JV. (2012). Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid ester in biodiesels and foods. *Quím Nov.* 35:274-279.

Wu L, Zhang J, Watanabe W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 63:456-469.

Yu SS, Lau CM, Thomas SN, Jerome WG, Maron DJ, Dickerson JH, Hubbell JA, Giorgio TD. (2012). Size and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages. *Int J Nanomedicine.* 7:799-813.

TABLES

| Constituents | Quantities |
|----------------------------|-------------------|
| PCL | 0.25 g |
| Span 60 [®] | 0.09 g |
| Tucumã oil | 0.40 g |
| Acetone | 67.50 mL |
| Aqueous phase | |
| Tween 80 [®] | 0.19 g |
| milli-Q [®] water | 132.50 mL |

Table 1. Constituents and their respective quantities of tucumã oil nanocapsules. To a final volum 25 mL.

| Peak | Carotenoid | tr ^a (min) | UV-vis characteristics | | | Carotenoid content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt) ^e |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---|-------------------------|------------------------|--|
| | | | $\lambda_{\text{m}\ddot{\text{a}}\text{x}}$ ^b (nm) | III/II ^c (%) | AB/II ^d (%) | |
| 1 ^g | 5,8-epoxy- β -carotene | 23.9 | 402,426, 451 | 50 | 0 | 24.12 \pm 0.2 |
| 2 ^g | 13- <i>cis</i> - β -carotene | 25.0 | 337, 420, 443, 469 | 20 | 140 | 39.63 \pm 0.3 |
| 3 ^g | <i>all-trans</i> - α -carotene | 28.2 | 420, 443,471 | 33 | nd ^f | 16.78 \pm 0.1 |
| 4 ^g | <i>all-trans</i> - β -carotene | 32.2 | 425, 450, 479 | 25 | 0 | 212.69 \pm 0.4 |
| 5 ^g | 9- <i>cis</i> - β -carotene | 34.3 | 421, 445, 470 | 20 | nd ^f | 51.60 \pm 0.2 |
| Total carotenoids | | | | | | 344.82 \pm 0.6 |

Table 2. Table S2. ^at_R: Retention time on the C₃₀ column. ^bLinear gradient Methanol: MTBE. ^cSpectral fine structure: Ratio of the height of the longest wavelength absorption peak (III) and that of the middle absorption peak (II). ^dRatio of the *cis* peak (A_B) and the middle absorption peak (II). ^en = 3 (drywt). ^fNot detected. ^gTentatively identified.

| Fatty acid | mg of fatty acid/g sample |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Oleic (C18:1n9c) | 368.7 |
| Palmitic (C16:0) | 198.23 |
| Stearic (C18:0) | 26.9 |
| Linoleic (C18:2n6c) | 25.3 |
| Tricosanoic (C23:0) | 14.43 |
| α -linolenic (C18:3n3) | 10.74 |
| Miristic (C14:0) | 3.62 |
| Lauric (C12:0) | 3.56 |
| Arachidic (C20:0) | 1.86 |
| Gondoic (C20:1) | 1.59 |
| Docosadyenoic (C22:2) | 1.49 |
| Margaric (C17:0) | 0.78 |
| Palmitoleic (C16:1) | 0.77 |
| Lignoceric (C24:0) | 0.7 |
| Behenic (C22:0) | 0.4 |
| cis-10-heptadecanoic (C17:1) | 0.3 |
| Pentadecanoic (C15:0) | 0.2 |
| Capric (C10:0) | 0.13 |
| Caprilic (C8:0) | 0.09 |
| Caproic (C6:0) | 0.03 |

Table 3. Descending order of fatty acid (FA) composition of tucumã oil in milligrams of FA per gram of sample.

| NC | pH | Size (nm) | PDI | Charge (mV) |
|-----------|------------|------------------|-------------|--------------------|
| TN | 6.43± 0.03 | 206± 0.69 | 0.14± 0.007 | -15.4± 0.70 |

Table 4. Physicochemical characterization of tucumã oil nanocapsules (TN).

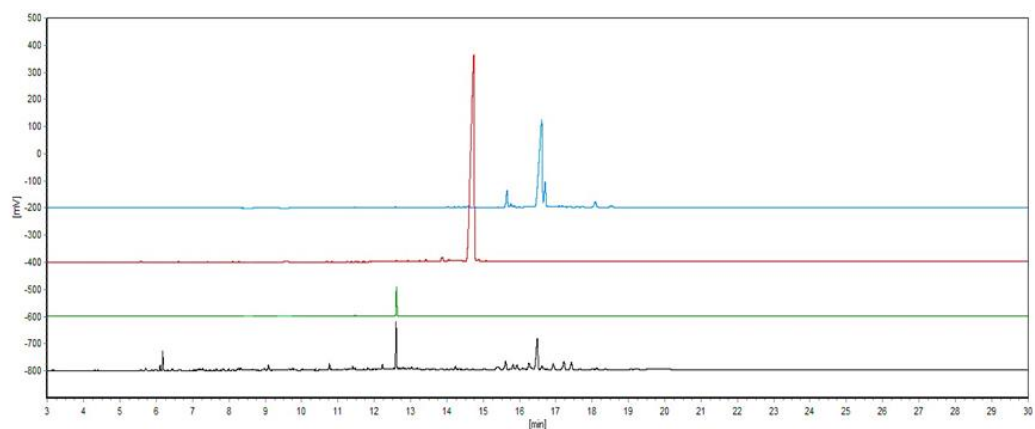
FIGURES:

Figure 1. Chromatographic profile tucumã oil in phytosterols determination. Blue standard: β -sitosterol; red standard: tocopherol; green standard: squalene; tucumã oil (in black).

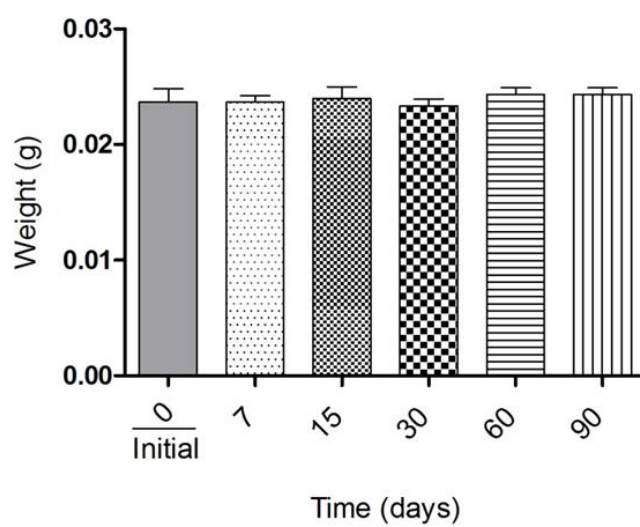


Figure 2. Swelling of poli- ϵ -caprolactone (PCL) polymer in tucumã oil.

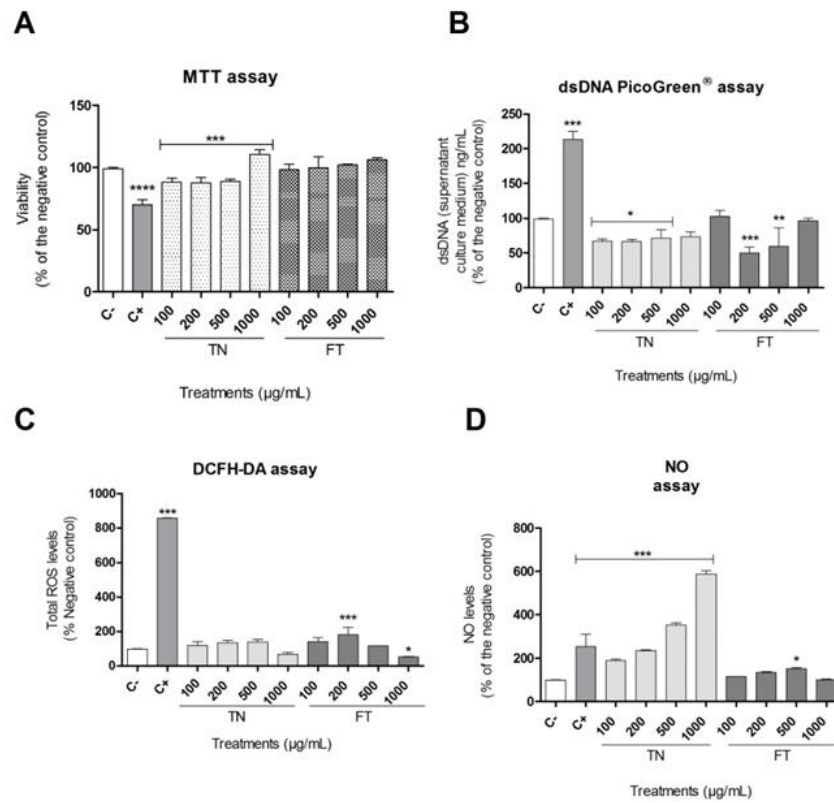


Figure 3. (A) MTT; (B) dsDNA PicoGreen®, (C) DCFH-DA and (D) NO in PBMC's with 24 hours incubation. Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analyzes were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ and **** $p < 0,0001$.

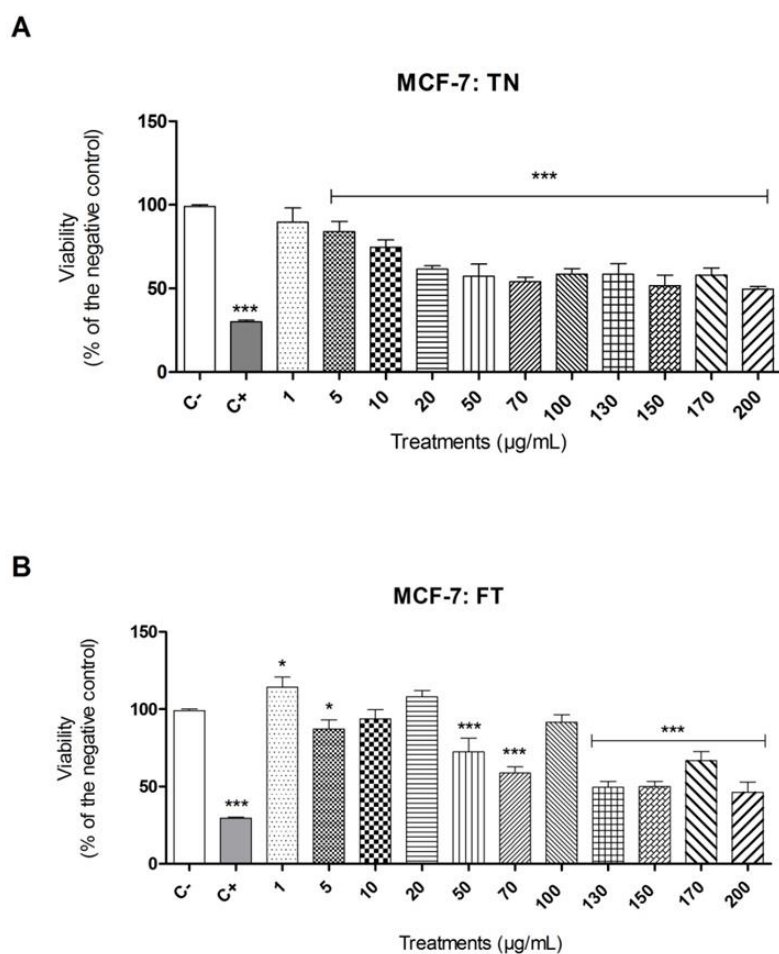


Figure 4. MTT assay in MCF-7 cells after 72 hours of incubation. (A) Cells treated with TN (1 to 200 µg/mL); (B) FT-treated cells (1 to 200 µg/mL). Results expressed as percentage of the negative control (100%). Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analyses were performed by 1-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

5.2 MANUSCRITO 2

Submetido ao Periódico Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.

Evaluation of the *in vivo* safety of tucumã oil nanocapsules in an experimental model of silver catfish *Rhamdia quelen*

Kátia Nascimento^a, Matheus Dellaméa Baldissera^b, Carine de Freitas Souza^b, Gerson Fernandes de Brum^c, Andíara Prates Ramos^c, Roberta Cogo Riéffel^c, Lauren Pappis^a, Walter Paixão de Sousa Filho^c, André Gundel^d, Alencar Kolinski Machado^c, Aline Ferreira Ourique^c, Bernardo Baldisserotto^b, Michele Rorato Sagrillo^c, José Edson Paz da Silva^a.

^aPharmaceutical Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Zip code 97105-900, RS, Brazil; ^bPharmacology Graduate Program, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Zip code 97105-900, RS, Brazil; ^cPostgraduate Program in Nanosciences, Center for Technological Sciences, Franciscan University (UFN), Santa Maria, Zip code 97010-032, RS, Brazil; Pampa Federal University (UNIPAMPA), Bagé, ZIP Code 96413-170, RS, Brazil.

*Corresponding author: Michele Rorato Sagrillo. Universidade Franciscana – UFN, Santa Maria, RS, Brazil. Zip code 97010-032, Phone: 55-55- 32201200, e-mail: sagrillorm18@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the toxicity of nanocapsules of the oil of tucumã, a typical fruit of the Amazon Region, to silver catfish, *Rhamdia quelen*. Fish were exposed to water treated with different concentrations of tucumã nanocapsules, white nanocapsules, solubilized oil and surfactant vehicles. After three days of exposure, fish were euthanized and liver, gills and brain removed for analysis of the dichlorofluorescein, nitric oxide and PicoGreen® assays. Plasma was collected for assay of hepatic transaminases. The nanocapsules had a diameter of 221 ± 1.27 nm, confirmed by atomic force microscopy. The oil nanocapsules were not toxic to this species of fish, but white nanocapsules and surfactant increased the levels of reactive oxygen species. Thus, nanocapsules are promising for the transport of tucumã oil. In view of the anti-inflammatory and anti-inflammatory properties of this oil, it is possible to envisage its application in skin diseases for example, since they present essentially inflammatory conditions.

Keywords: nanotoxicology, fish, tucumã oil, natural products.

Introduction

Substances of natural origin such as plant oils and extracts have often been used empirically in diseases treatments. According to the World Health Organization (WHO), 80% of the world's population uses natural products or synthetic drugs based on them to treat diseases. Natural products have a significant role in drug discovery and development (Ekor, 2014; Newman and Cragg, 2016). In this context, the consumption of virgin fruit oils, nutritional components, essential fatty acids, phospholipids, phytosterols and other bioactive phenolics has been gaining attention due to their potential therapeutic applications (Hernandez, 2016) as anti-inflammatory, antimicrobial, analgesic, and anti-ulcerative (De Cássia et al., 2014; Quintas et al., 2015). Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) is an edible orange-yellow Amazon fruit (Villachica, 1996; Ferreira et al., 2008) and extensively consumed in North Brazil (Bora et al., 2001). Recently, several evidences have reported the beneficial effects of *A. vulgare* oil as hepatoprotector in a model of alloxan-induced diabetes (Baldissera et al., 2018) and anti-inflammatory in a model of pulmonary infection (Bony et al., 2012), making this food an interest source of antioxidant compounds due to its high β -carotene content. However, some concerns are associated with consumption of *A. vulgare* oil as: photosensitivity of β -carotene, and difficult solubility related to its higher content of fatty acids. Thus, an alternative for the applicability of this oil would be its nanoencapsulation, making it soluble and protected light. When nanotechnology is applied to improve the characteristics of a product, it is important to analyze the potential deleterious effects on the organism, as toxicity depends on the administration route, material type and nanocarrier size (Doktorovova, Souto and Silva, 2014).

Toxicology studies are being adapted to assess nanomaterials effects. The physicochemical characteristics required include size, surface charge, morphology, chemical composition, solubility and agglomeration, such as formation of a corona protein, for example. In addition, understanding of biochemical interactions is important, from the perspective of safety and preclinical development of nanostructured systems for drug delivery. In this study, we used the silver catfish *Rhamdia quelen* as an experimental model, a fish extensively used as experimental model in studies linked to ecology, physiology (Brito et al., 2017), response to exposure to xenobiotics (Mela et al., 2013), metals (Pereira et al., 2016) and drugs (Ghelfi et al., 2016), being considered a suitable bioindicator for bioassays and biomonitoring (Brito et al., 2017).

Thus, the aim of this study was to produce and characterize tucumã oil nanocapsules, as well as determine whether exposure to tucumã oil nanocapsules exerts toxic effects in brain, gills and liver of silver catfish.

Material and methods

Chemicals

Tucumã oil (*A.vulgare*) was obtained commercially from AmazonOil[®] Industry, located in Ananindeua – Pará state, Brazil. Product code: 032; Lot: AMO 032-001 / 0317; Number of analysis: 020/2017. The fruit was collected from the Amazon forest and the oil was obtained from the pulp by cold pressing with no use of preservatives or solvents for its extraction. According to the analysis certificate of the manufacturer AmazonOil[®], the density of tucumã oil was 0.974 g/cm³; acidity index: 17.39%; peroxide index: 2.17 meqO₂/kg; iodine index: 80 gI₂/100 g; saponification index: 190 mg KOH/g. Total bacteria, fungi and yeasts: absent. Oleic acid (68%) of the fatty acid composition. Total carotenoids: 345 µg/g⁻¹; carotenoid: *all-trans*-β-carotene (213 µg/g).

Poli-ε-caprolactone (PCL), sorbitan monostearate (Span 60[®]), polysorbate 80 (Tween 80[®]), penicillin/streptomycin, dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) were purchased from Sigma Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI), fetal bovine serum (FBS), amphotericin B, Quant-iT[™] dsDNA PicoGreen[®] kit were obtained from Invitrogen[®] (Eugene, OR, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

Tucumã oil nanocapsules development

Tucumã NCs (TN) and white NCs (WN) were prepared by precipitation of preformed polymer, according to Venturini et al. (2011) (table 1). WN were prepared with the same proportions, but an inert oil (Crodamol GTCC) was used as the core of the nanocapsule.

Table1

Nanocapsules physicochemical characterization

pH

The pH was analyzed by calibrated potentiometer directly in suspensions. The results were expressed as the mean of three determinations.

Size and polydispersity index (PDI)

NCs medium diameter and PDI determination were performed through the dynamic light scattering (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern Instruments). Two volumetric flasks for 10 mL were prepared, one for each suspension, and ultrapure filtered water was added. Then 20 μL of each suspension was added and the mixture transferred to a cuvette for reading. The results were determined through the mean of three analyzes.

Zeta potential

The NCs charge was performed through by electrophoresis (Zetasizer[®] Nanoseries, Malvern Instruments). Two volumetric flasks for 10 mL were prepared, one for each suspension, and filtered sodium chloride (NaCl) (0.9 mM) was added. Then 20 μL of each suspension was added and then transferred to a cuvette for reading. The results were determined through the mean of three analyzes.

Atomic force microscopy

The NCs suspensions were first diluted (1:10) in milli-Q[®] water and after, one 50 μL added to mica blade and dried at room temperature. TN and WN morphologies were analyzed by atomic force microscopy (AFM) using the Agilent Technologies 5500 equipment. The images were obtained at room temperature using non-contact mode with high resolution tips SSS-NCL (Nanosensors, 48 N/m force constant, resonance frequency 154 kHz). Images were captured using PicoView software 1.14.4 (Molecular Imaging Corporation[®]) and analyzed by PicoImage 5.1.

Evaluation of toxicity parameters in silver catfish *R. quelen*

Silver catfish maintenance

This study was conducted after approval in Committee of Ethics and Use of Animals under protocol number 074/2014. Juveniles (36.6 ± 15.9 g; 15.8 ± 3.0 cm) were bought from a local fish farm and transferred to the Fish Physiology Laboratory of the Federal University of Santa Maria. In the laboratory, animals were acclimated for seven days in aerated 250 L tanks with controlled temperature (20.9 ± 0.03 °C), pH (6.7 ± 0.03) and dissolved oxygen levels (5.88 ± 0.42 mg/L). The fish were given commercial pellets to satiation once a day and feeding continued through the experimental period.

Aquariums treatments

One hundred and two juvenile silver catfish were randomly divided into seventeen groups with 6 fish, as follows: free tucumã oil (FT), tucumã oil nanocapsules (TN), white NCs containing inert oil (WN), and surfactants which served as vehicles for tucumã oil and which were also used in the NCs (TS), each compound at the concentrations of 100, 200, 500 and 1000 µg/mL. There was also a control group without treatment. All groups were exposed to the water containing their respective treatments for two hours daily for three days, and after it was exchanged for clean water (without treatment).

Organs removal and preparation

After four days of treatment, fish were euthanized through spinal cord sectioning, as any anesthetic could generate some interference in the later trials since this study aimed at toxicity. Blood samples were collected using heparinized syringes, and were centrifuged at $1000 \times g$ for 15 min at 4 °C to obtain plasma, that was stored at -20 °C until utilization. The gills, liver and brain were removed and immediately transferred to tubes containing culture medium (RPMI 1640 enriched with 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Amphotericin B) under refrigeration. The methodology described by Pathak and Khandelwal (2006), with some modifications, was used for the dsDNA PicoGreen[®], NO (nitric oxide) and DCFH-DA assays in these organs. After removal, organs were individually transferred to petri plates and carefully macerated, filtered and centrifuged for 5 min at 1000 rpm. After further washing in culture medium, the supernatant was removed for the tests.

NO assay

According to Choi et al. (2012), 50 µL of the Griess reagent (1% solution I - Sulfanilamide + solution II - (N-1-naphthyl-ethylene-diamine-bichloro-bichlorate 0.1%), ratio 1: 1 was added to the supernatant. After first step, the plate was incubated for 15 minutes at room temperature and absorbance was measured spectrophotometrically at the wavelength of 540 nm. The results were expressed as a percentage of the negative control.

DCFH-DA assay

According to Esposti et al. (2002), 130 µL of Tris-HCl (10 mM, pH = 7.4) and 20 µL of DCFH-DA (1 mM) was added to the supernatant. The plate was incubated for 60 minutes at room temperature (under light) and the reading was performed in fluorimeter (SpectraMax[®]

i3x – Molecular Devices) at 525 nm of emission and 488 nm of excitation. The results were expressed as a percentage of the negative control.

Quant-iT™ dsDNA PicoGreen® assay

To the supernatant was added 80 μ L of 1x tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris HCl and 1 mM EDTA pH = 7.5) and 5 μ L of the PicoGreen® reagent. The plate was incubated for 5 min at room temperature (in the dark) and the reading was performed on a fluorimeter (SpectraMax® i3x - Molecular Devices) at 520 nm emission and 480 nm excitation. The results were expressed as a percentage of the negative control (Há et al., 2011).

Plasma AST e ALT measurements

Plasma AST and ALT enzymes were measured by UV-IFCC kinetic method using a kit (Labtest® Diagnóstica, Brazil) and read in semi-automated biochemical apparatus (Bioplus 2000).

Statistical analysis

Statistical program GraphPad Prism® (version 6.0) was used to perform the statistical analyzes. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). In Polymer swelling assay, One-way Anova was used followed by the Dunnett post hoc. The remaining tests were analysed of variance was used in a route (non-parametric tests; Kruskal-Wallis) followed by Dunnet test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

Nanocapsules physicochemical characterization

No significant difference was observed between groups regarding pH, particle size, PDI, charge and conductivity between TN and WN. Atomic force microscopy analysis revealed the morphology of TN with a size of 217 nm (Figure 1AB), while the figure 2 shows the morphology of WN with a size of approximately 209 nm.

Figures 1 and 2

pH of TN and WN suspensions was 6.4 ± 0.03 for both. Mora-Huertas, Fessi and Elaissari (2010) consider that the pH values of NC suspensions are between 3.0 and 7.5 when applying nanoprecipitation, emulsion-diffusion or layer-by-layer methods. Particle sizes of TN (221 ± 1.27 nm) and WN (220 ± 1.52 nm) were within the average diameter range of NCs

prepared from preformed polymers (250 and 500 nm). PDI represents the uniformity of suspended particles in which values between 0.1 and 0.25 indicate a narrow size distribution and values greater than 0.5 indicate wide distribution (Wu, Zhang and Watanabe, 2011). Consequently, suspensions of TN and WN presented uniform particles because their PDI was 0.2 ± 0.01 .

The charge parameter depends mainly on the chemical nature of the polymer and the stabilizing agents (Mora-Huertas, Fessi e Elaissari, 2010). TN and WN were prepared with PCL, which has a negative charge. The zeta potential is a physical property and corresponds to the electric potential of the NPs influenced by the composition of the NC and the medium in which they are dispersed (Lobato et al., 2013). This parameter is widely used to indicate suspension stability in colloidal dispersions, where values greater than -30 mV and less than 30 mV promote high stability preventing particle aggregation (Mohanraj and Chen, 2006). TN (charge: $-12,8 \pm 0.62$ mV; conductivity: 1.3 ± 0.05) and WN (charge: -12.1 ± 1.23 mV; conductivity: 1.2 ± 0.04) presented load within this range of values, therefore, according to the literature.

Toxicological profile

Survival index

Fish survival was 100% after three days of exposure to the treatments.

Nitric oxide assay

A significant decrease in gills NO levels were observed in the TS treatment at concentration of 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ compared to control group (Figure 3A). Similarly, a significant decrease in liver NO levels were observed under TS treatment at concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ compared to control group (Figure 3B). No significant difference was observed between groups regarding brain NO levels (Figure 3C).

Figure 3

DCFH-DA assay

A significant increase on ROS levels was observed in gills (500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$), liver (100, 200 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) and brain (100, 200 and 500 $\mu\text{g/mL}$) of silver catfish exposed to TS treatment compared to control group. Also, ROS levels significantly increase in the liver of fish exposed to WN in all concentrations compared to control group. Finally,

ROS levels significantly increase in liver of silver catfish exposed to 100, 200 and 1000 µg/mL FT compared to control group (Figure 4).

The main objective of this work was to analyze the possible toxicity of the TN in alternative animal model, silver catfish *R. quelen*. The TN were not cytotoxic to organs assessed after fish exposure to treatment waters. However, WN, FT and TS increased ROS levels, indicating an augmentation of free radical's production. In response to certain biotic or abiotic conditions, the level of ROS may increase in the cells and signal the activation of different pathways of cell death or autophagy. As they are produced and eliminated in different cell compartments, any stimulus extraneous to the cell can increase ROS production (Zandalinas and Mittler, 2018).

In this sense, there is the possibility of influence of the constituents of the NCs which may have acted synergistically, because lipid bilayer permeability is affected by non-ionic surfactants. The hydrophilic and lipophilic parts may interact with polar groups of the lipophilic tails of the lipid bilayer, resulting in plasmatic membrane rupture (Partearroyo et al., 1990).

An increase in ROS was observed in gills, liver and brain through the DCFH-DA assay at the TS concentrations administered. Span 60[®] and Tween 80[®] surfactants (TS group components) are emulsifying agents that permeate membranes with ease. At cellular level, the massive use of surfactants in detergents and cosmetic formulations with subsequent disposal in aquatic systems requires that they be biodegradable (Steber et al., 1995).

Gills and liver are the main target organs for fish xenobiotics. In liver, disorders occur in the metabolism of lipids and carbohydrates, indirectly affecting the function of other organs (Shiogiri et al., 2012). Thus, metabolic and enzymatic responses act as protective mechanisms against the absorption of toxic substances, but if these environmental conditions persist, damage to tissues (particularly gills) may compromise overall metabolism, including pathways involved in repair, growth, and reproduction.

The tucumã oil when nanoencapsulated did not alter the parameters of cytotoxicity, however the FT increased ROS production. Due to the characteristics of the oil, such as difficulty in solubility and photosensitivity (Bora et al., 2001), TN seem to be an alternative because they have a controlled release system of the active compounds, protection against photodegradation, oxidation and increase of solubility, considering their possible applicability. In this context, the tucumã fruit contains high concentrations of pro-vitamin A, β-carotene, 52.000 per 100 g, value only comparable to *Mauritia flexuosa* (buriti) pulp. In addition, it has omega 3, 6 and 9, being an excellent moisturizer, raw material for body lotions

for example (Moraes and Gutjahr, 2009). Santos et al. (2015) evaluated the levels of bioactive substances and the total antioxidant capacity of fruits of native Amazonian palms, in order to identify their functional components. Vitamin C, flavonoids and carotenoids were found predominantly, 19, 31 and 7.2 mg/100 g, respectively.

Rocha et al. (2014), through a study at the Soure Marine Extractive Reserve in the State of Pará, correlated therapeutic indications of the residents with the chemical composition of the tucumã oil. It is used to treat approximately 13 diseases, including infectious, parasitic, skin and subcutaneous tissue, disorders of the nervous system, digestive system, osteoarticular and genitourinary systems. Inflammation was the most mentioned disease in the three communities. Other studies also report the potentialities of tucumã oil: wound healing and anti-inflammatory treatments (Monteiro et al., 2011), treatment of rheumatism (Pimentel, 1994; Coelho-Ferreira, 2009), treatment of dislocations and bruises (Shanley and Medina, 2005). Thus TN could be applied in cosmetic products, for example, in view of skin diseases where the central mechanism is the inflammatory process.

Figure 4

Quant-iT™ dsDNA PicoGreen® assay

No significant difference was observed in double-stranded DNA in all treatments compared to control group (Figure 5).

Figure 5

Plasma AST and ALT measurements

No significant difference was observed between groups regarding plasma AST and ALT levels (Figure 6).

Figure 6

Conclusion

In conclusion, the NCs were promising carriers for tucumã oil, having good solubility when added to fish water, as well as their appropriate physico-chemical characteristics, such as size, PDI, load and pH. In addition, they were not toxic to fish when exposed to different concentrations, and could be an alternative to the use of this oil, due to its popular use, such as skin diseases.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support from UFSM, UFN, Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS,ARD 17/2551-0000805-7) and AmazonOil® Industry. BB and MDB are a recipient of Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq, Brazil) research fellow ships.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

All international, national and/or institutional guidelines applicable to the care and use of animals were followed. All procedures performed in animal studies were in accordance with the ethical standards of the institution or practice in which the studies were conducted. This study was conducted after approval in Committee of Ethics and Use of Animals under protocol number 074/2014.

References

- Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. (2013) Antioxidant activity of essential oils. *J Agric Food Chem* 61:10835-10847.
- Baldissera MD, Souza CF, Grando TH, Sagrillo MR, Cossetin LF, Silva AS, Stefani LM, Monteiro S. (2018) Tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) ameliorates hepatic antioxidant defense system in alloxan-induced diabetic mice. *J Food Biochem* 2-6.
- Bony E, Boudard F, Brat P, Dussosoy E, Portet K, Poucheret P, Michel A. (2012) Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: Chemical characterization and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. *Fitoterapia* 83:33–4.
- Bora PS, Narain N, Rocha RVM, De Oliveira Monteiro AC, De Azevedo Moreira R. (2001) Characterization of the oil and protein fractions of tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) fruit. *CYTA – Journal of Food* 3(2):111-116.
- Brito IAA, López-Barrera EA, Oliveira Ribeiro CA, SBL. (2017) Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. *Ecol Model* 347:40–49.
- Coelho-Ferreira M. (2009) Medicinal knowledge and plant utilization in Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J Ethnopharmacol* 126:159-175.
- Choi WS, Shin PG, Lee JH, Kim GD. (2012) The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cell Immunol* 280(2):164-170.

De Cássia SS, Andrade R, Oliveira LN, Sousa DP. (2014) A review on anti-inflammatory activity of phenyl propanoids found in essential oils. *Molecules* 19:1459–1480.

De Sousa DP. (2011) Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules* 16:2233–2252.

Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. (2014) Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a systematic review of *in vitro* data. *Eur J Pharm Biopharm* 87:1–18.

Ekor M. (2014) The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse actions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* 4(177):1-10.

Esposti MD, (2002) Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* 26:335-340.

Fan AM, Alexeeff G, Khan E. (2015). Toxicology and risk assessment. CRC Press Boca Raton FL.

Ferreira ES, Lucien VG, Amaral AS, Silveira CS. (2008) Physicochemical characterization of the fruit and oil extracted from tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). *Alim Nutr* 19:427-433.

Ghelfi A, Ribas JLC, Guiloski IC, Bettim FL, Piancini LDS, Cestari MM, Pereira AJ, Sasaki GL, Silva HC, Assis DE. (2016) Avaliação de biomarcadores bioquímicos, genéticos e hematológicos em bagre comercial *Rhamdia quelen* exposto ao diclofenaco. *Environ Contam Toxicol* 96:49-54.

Goksoyr A, Anderson T, Buhler DR, Stegeman JJ, Willians DE, Forlin L. (1991) Immunochemical cross-reactivity of (3-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol* 9:1-13.

Há TTN, Huy NT, Murao LA, Lan NTP, Thuy TT, Tuan HM, Nga CTP, Tuong VV, Dat TV, Kikuchi MK, Yasunami M, Morita K, Huong VTQ, Hirayama K. (2011) Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One* 6:1-7.

Hernandez EM. (2016) Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. *Funct Diet Lipids* 69:101.

Lobato KBS, Paese K, Forgearini JC, Guterres SS, Jablonski A, Rios AO. (2013) Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chem* 141:3906–3912.

Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Irabito IS, Da Silva CA, Maraschi AC, Prodocimo V, Freire CA, Randi MAF, Ribeiro CAO, De Assis HCS. (2013) The risk of exposure to copper based water to a neotropical freshwater catfish cultured (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol Environ Saf* 88:108-116.

Mohanraj VJ, Chen Y. (2006) Nanoparticles – a review. *Trop J Pharm Res* 6:561-573.

Monteiro MVB, Bevilaqua CML, Palha MDC, Braga RR, Schwanke K, Rodrigues ST, Lameira OA. (2011) Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. *Acta Amaz* 4(2):233-242.

- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 385:113–142.
- Moraes LRB, Gutjahr E. (2009) *Química de Oleaginosas – Valorização da biodiversidade Amazônica*. Brasília – DF. Embrapa - Accessed in 18/04/2017.
- Newman DJ, Cragg GM. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79(3):629-661.
- Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. (2015). Antiplatelet effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: a randomised clinical trial. *Plos One* 10:117-177.
- Pereira LS, Ribas JLC, Vicari SB, Silva J, Stival AP, Baldan FX, Valdez D, Grassi MD, Cestari MM, De Assis HCS. (2016) Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium on fresh water fish. *Ecotoxicol Environ Saf* 130:29-36.
- Pathak N, Khandelwal S. (2006) Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology* 220:26-36.
- Partearroyo MA, Ostolaza H, Goni FM, Barbera-Guillem E. (1990) Surfactant induced cell toxicity and cell lysis: a study using B16 melanoma cells. *Bioch Pharm* 40:1323–1328.
- Pimentel AGM. (1994) *Cultivo de plantas medicinais na Amazônia*. Belém: FCAP-Serviço de documentação e informação, 114.
- Rocha TT, Tavares-Martins AC, Lucas FCA, Martins RCC. (2014) Potencial terapêutico e composição química do óleo de bicho do tucumã (*Astrocariuem vulgare* Mart.) utilizado na medicina popular. *Scientia Plena* 10(11):1-9.
- Santos MFG, Mamede RVS, Rufino MSM, De Brito ES, Alves RE. (2015) Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. *Antioxidants* 4:591-602.
- Zandalinas SI, Mittler R. (2018). ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Rad Biol Med* 122: 21–27.
- Shanley P, Medina G. (2005) *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica*. Belém: CIFOR, Imazon. 300p.
- Steber J, Guhl W, Stelter N, Schroder FR. (1995) Alkyl polyglycosides - ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside Surfact Det* 32(6):515-521.
- Shiogiri NS, Paulino MG, Carraschi SP, Baraldi FG, Da Cruz C, Fernandes MN. (2012) A exposição aguda de um herbicida à base de glifosato afeta as brânquias e o fígado do peixe neotropical, *Piaractus mesopotamicus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 34(2):388-396.
- Venturini CG, Jägerb E, Oliveira CP, Bernardic A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR. (2011) Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 375:200–208.

Villachica . (1996) Frutales y hortalizas promisorias de La Amazonía: tratado de cooperación amazonica. Lima: Secretaria Pro-Tempore, Tratado de Cooperación Amazonica. 367p.

Wu L, Zhang J, Watanabe W. (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63:456–469.

Table

| Organic phase | Quantities |
|----------------------------|-------------------|
| PCL | 0.25 g |
| Span 60 [®] | 0.09 g |
| Tucumã oil | 0.40 g |
| Acetone | 67.50 mL |
| Aqueous phase | |
| Tween 80 [®] | 0.19 g |
| milli-Q [®] water | 132.50 mL |

Tab. 1: Constituents and their respective quantities of NCs according to Venturini et al. (2011).

Legends figures

Fig. 1: Morphology of tucumã nanocapsules (TN). A: isolated TN. B: TN dispersed in the suspension.

Fig. 2: Morphology of white nanocapsules (WN) using atomic force microscopy.

Fig. 3: Nitric oxide levels in gills (a), liver (b) and brain (c) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucuma (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The analyzes were performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Fig. 4: DCFH-DA in gills (a), liver (b) and brain (c) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucumã (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The analyzes were performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Fig. 5: dsDNA PicoGreen® in gills (a), liver (b) and brain (c) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucumã (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The analyzes were performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Fig. 6: Plasma aspartate aminotransferase (a) and alanine aminotransferase (b) of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed during 3 days to 100, 200, 500 and 1000 µg/mL of tucumã nanocapsules (TN), white nanocapsules (WN), free tucumã (FT) and vehicles for tucumã oil (TS). The test was performed by one-way Anova (KrusKall-Wallis non-parametric tests) followed by Dunnet's test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figures

Fig. 1

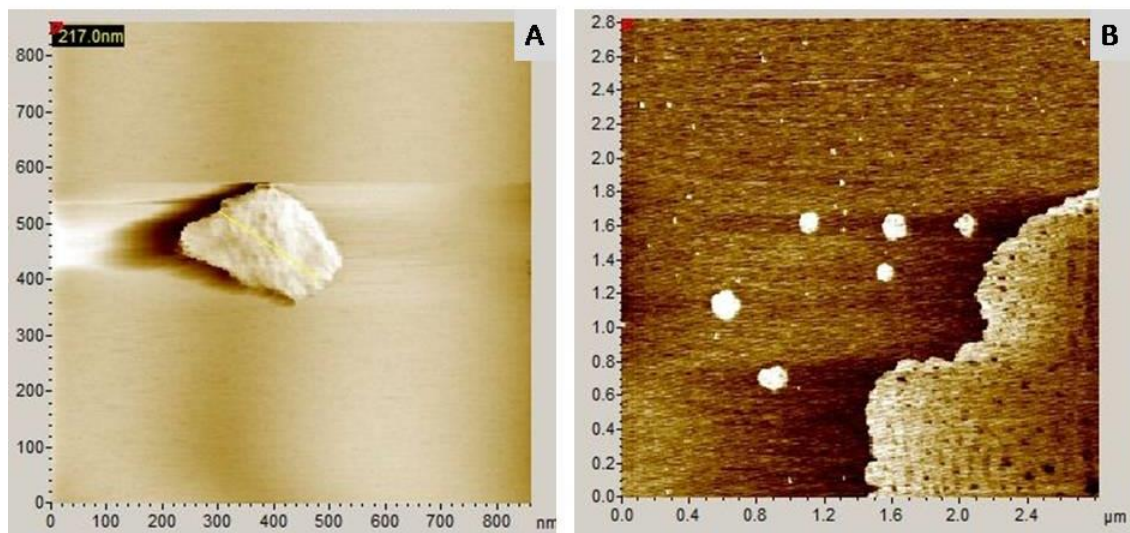


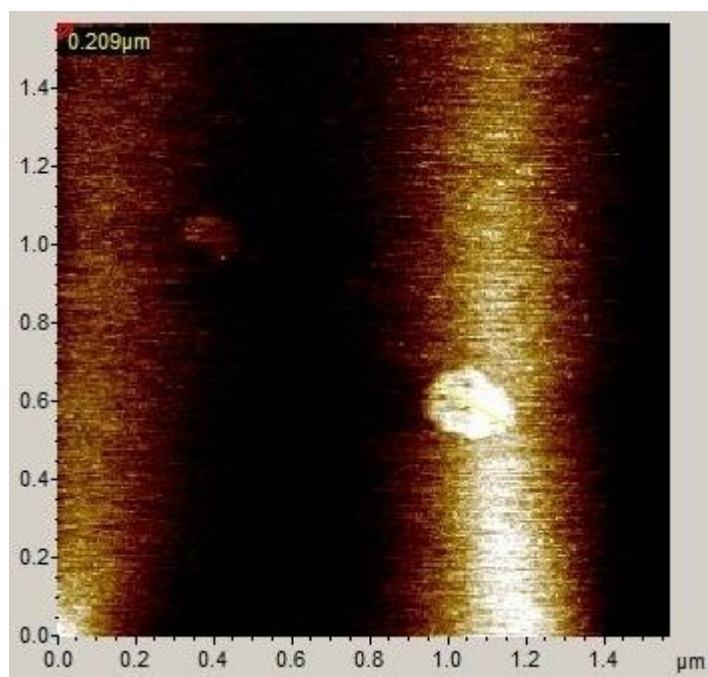
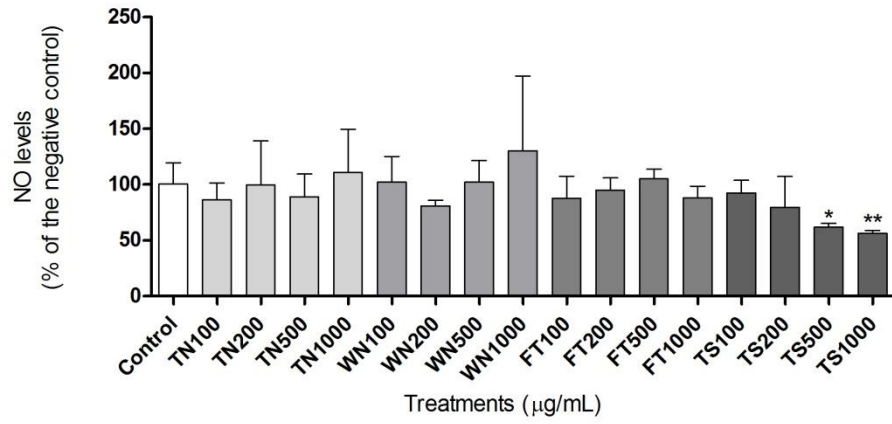
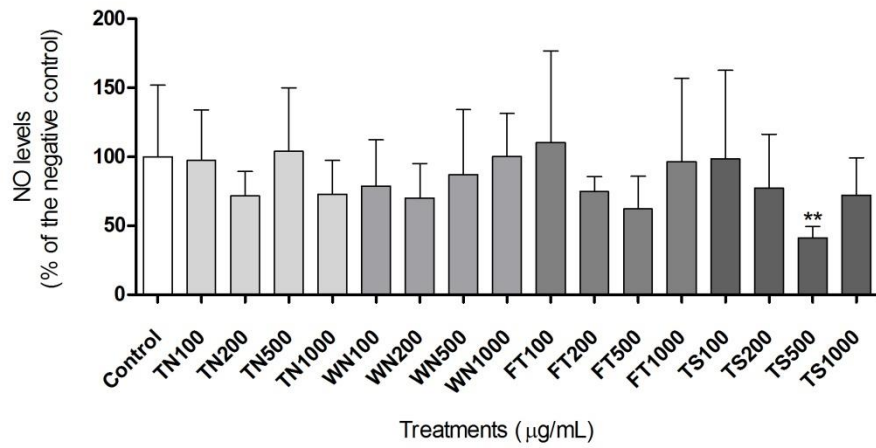
Fig. 2

Fig. 3

A



B



C

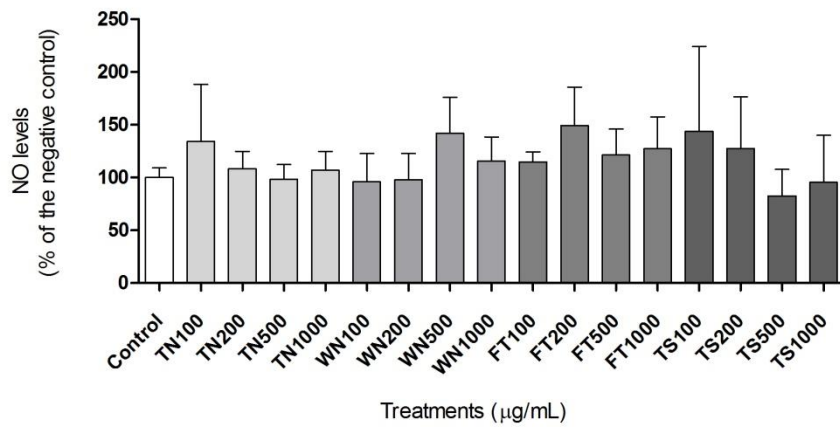
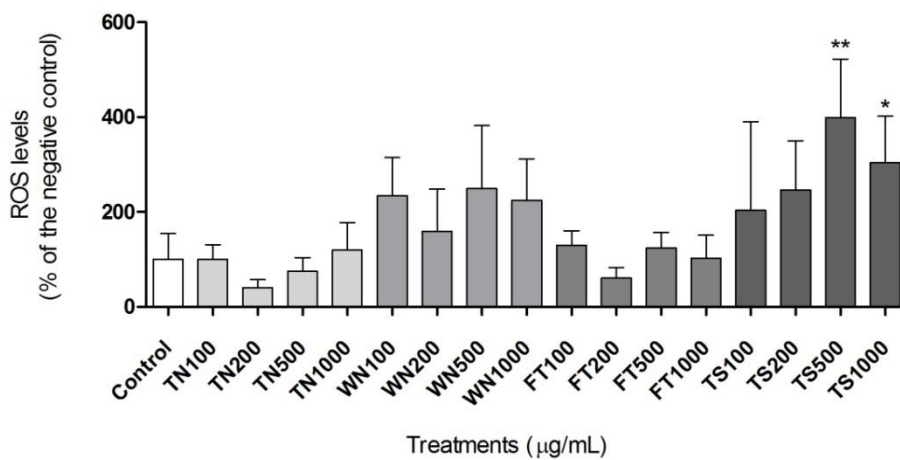
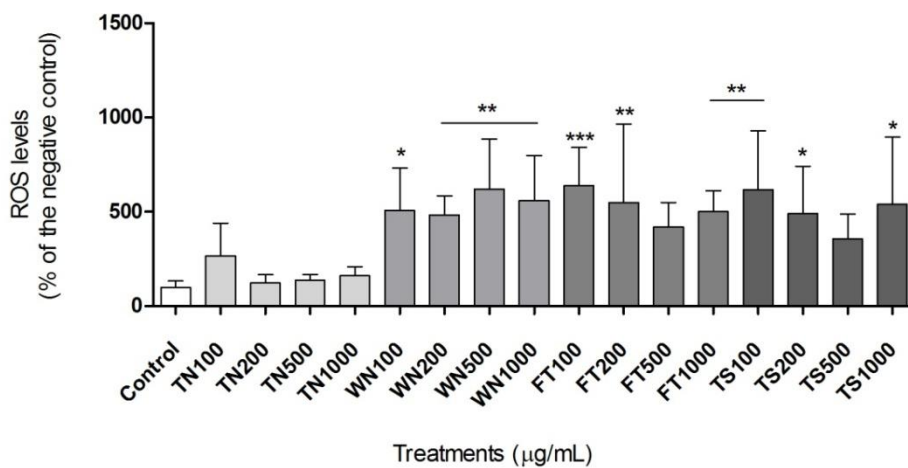


Fig. 4

A



B



C

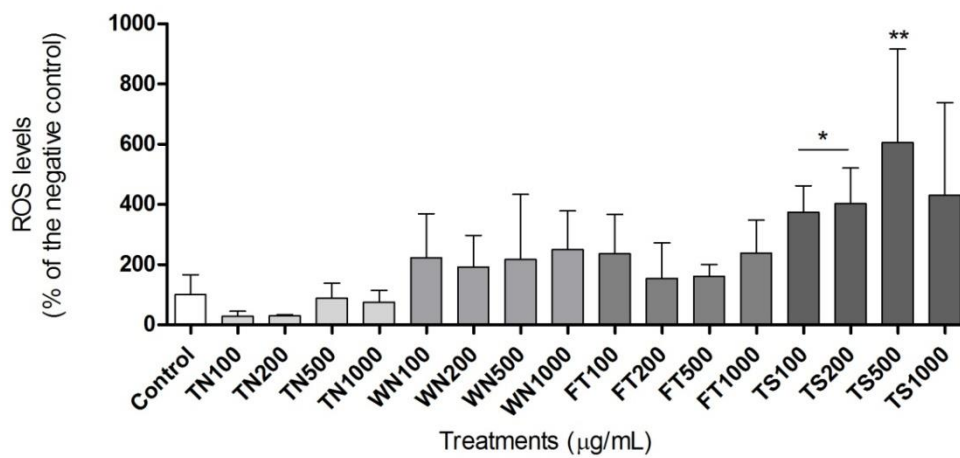
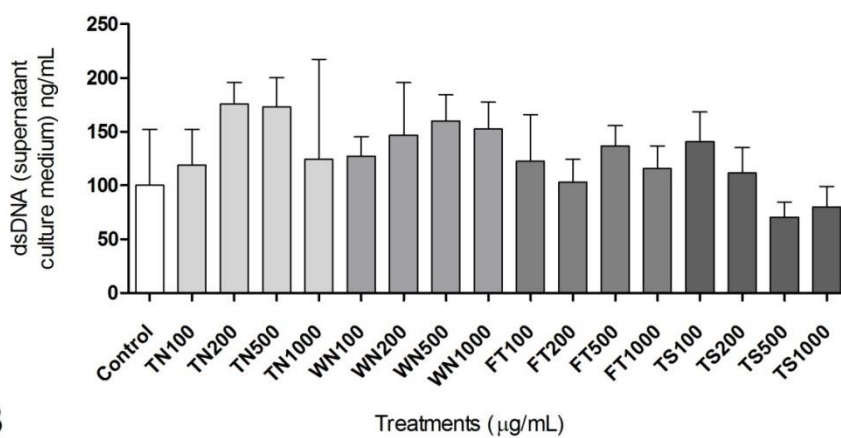
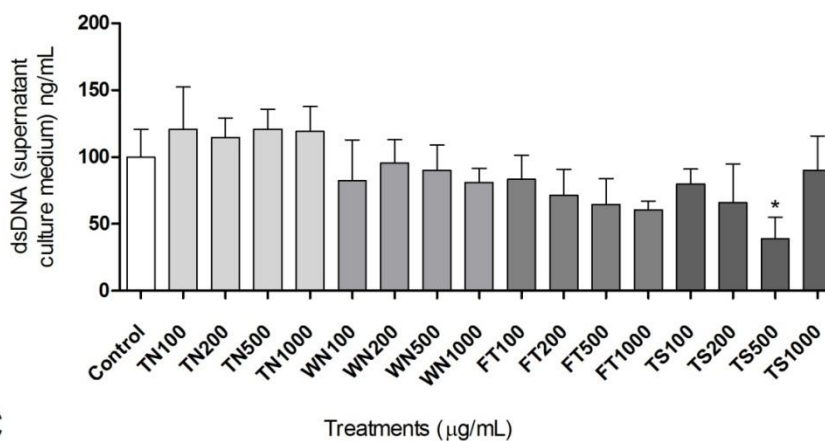


Fig. 5

A



B



C

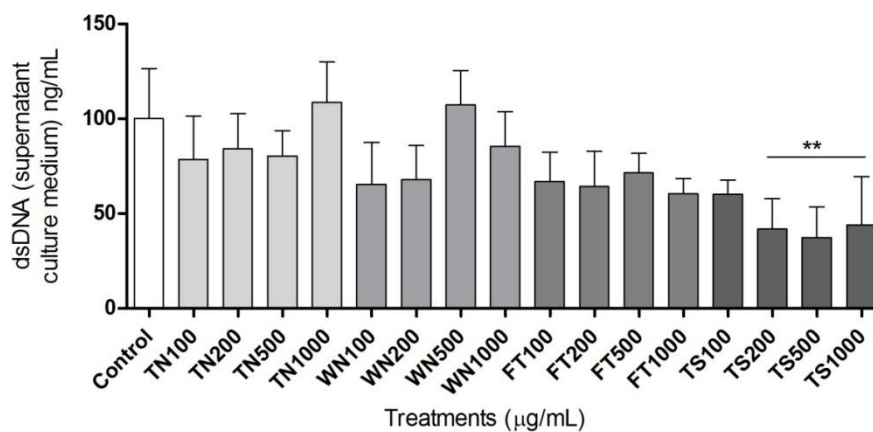
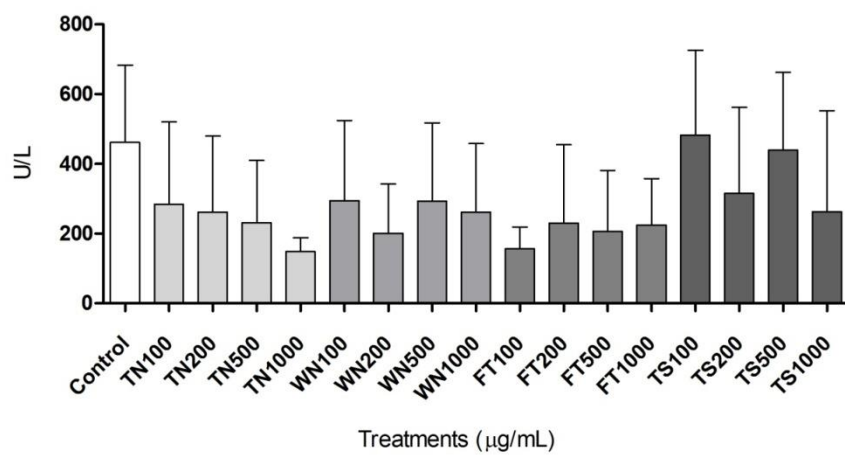
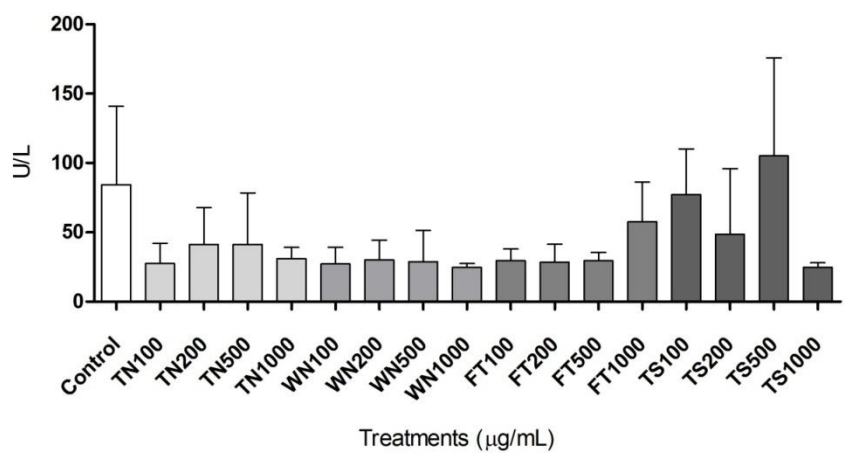


Fig. 6

A



B



6 DISCUSSÃO GERAL

A busca por alternativas para o tratamento das neoplasias é assunto abordado e estudado incansavelmente. A natureza vem a colaborar para estes possíveis tratamentos através de suas plantas e frutos, a exemplo disso, pode-se incluir o fruto tucumã do bioma Amazônia tem sido estudado quanto a sua potencial atividade antitumoral (CAVALCANTE, 1991; SOUZA FILHO et al., 2013). Do tucumã é extraído o óleo, o qual desempenha atividades de cura segundo a população de alguns municípios do Estado do Amazonas, onde é observado um menor índice de alguns tipos de câncer, entre eles, o de mama (SAGRILLO et al., 2015; INCA, 2017).

Quanto às alternativas no melhoramento dos tratamentos antineoplásicos, estuda-se a respeito da utilização de nanocarreadores. Estes desempenham papel de direcionamento ao tumor visando à diminuição dos efeitos colaterais gerados pela quimioterapia convencional (BORRAJO et al., 2016). O presente trabalho teve por objetivo estudar o óleo de tucumã da espécie (*Astrocaryum vulgare* MART) com o intuito de desenvolver uma NC para aplicação antitumoral em uma linhagem celular de adenocarcinoma de mama, utilizando células MCF-7.

Contudo, o desenvolvimento da NC com óleo de tucumã exigiu um estudo de toxicidade, sendo assim, este trabalho também teve como objetivo avaliar a segurança tanto do óleo em sua forma livre quanto as NT, primeiramente em células normais, as mononucleadas de sangue periférico seguida do estudo *in vivo*, em peixes (*R. quelen*).

Quanto aos estudos de caracterização do óleo, foram analisados teores de fitosteróis, carotenoides e composição de ácidos graxos. Foi evidenciada a presença de β -sitosterol e esqualeno. Os fitosteróis possuem origem vegetal, são esteróis e por isso, essenciais às membranas celulares animais e vegetais (PIMENTEL, FRANCKI e GOLLÜCKE, 2005). Evitam a absorção intestinal do colesterol e assim podem reduzir estes níveis (IKEDA et al., 1988; MAGUIRE et al., 2004). Também demonstram possuir propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (VILLASEÑOR et al., 2002).

Quanto à análise de carotenoides, o *all-trans*- β -caroteno apresentou-se como o majoritário. Este dado está de acordo com outros estudos, os quais ressaltam sua presença no fruto tucumã (FERREIRA et al., 2008; SAGRILLO et al., 2015). Após a caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído do tucumã, Ferreira e colaboradores (2008) concluíram que o fruto da espécie *Astrocaryum vulgare* apresentou em sua polpa elevada concentração de β -caroteno, bem como no mesocarpo e epicarpo.

Sabe-se que os carotenoides podem atuar como compostos quimiopreventivos (HAEGELE et al., 2000), por exemplo, o β -caroteno, α -caroteno, luteína, zeaxantina e licopeno (PARKER et al., 1999). O β -caroteno está presente em frutas e vegetais coloridos, possui ação antioxidante e atividade de pró-vitamina A (YEH e HU, 2003; ELLIOTT, 2005).

Quanto à vitamina A, entre suas funções no organismo estão o crescimento, diferenciação de tecidos, imunidade e desenvolvimento embrionário (OLSON e MACHLIN, 1991). Encontra-se apenas em alimentos de origem animal, sob as formas: retinol, retinil, retinal e ácido retinoico. Os vegetais fornecem pró-vitaminas A, como o α e o β -caroteno e a β -criptoxantina, que podem ser biologicamente transformadas em vitamina A (RIBAYAMERCADO, 2000). Assim, o β -caroteno é o mais ativo dos carotenóides pró-vitamínicos A sendo também, o mais distribuído nos alimentos (COMBS JUNIOR, 2002).

Em torno de 70% da vitamina A da dieta provém dos carotenoides que estão nas frutas e vegetais, em especial o β -caroteno. Aproximadamente 60% a 70% deste é absorvido na mucosa intestinal e convertido em retinol (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989; PARKER, 1999). Esta conversão também pode ocorrer em outros órgãos como o fígado, pulmões e rins (WANG, 1994). Neste sentido, o retinol é um composto derivado da vitamina A capaz de regular o crescimento e diferenciação celular através do controle da produção de EROs, diminuição da peroxidação lipídica da membrana celular (ESTERBAUER e ZOLLNER, 1989).

Assim, os fitosteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e carotenoides possuem elevada atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória. Podem atuar no organismo impedindo ou retardando o efeito nocivo dos RLs, e ainda, no controle do colesterol e prevenção de doenças cardíacas (LOMENICK, HUAN e CHEN, 2015).

Quanto a composição de ácidos graxos, em conformidade com a literatura (FERREIRA et al., 2008), os dois ácidos graxos majoritários encontrados no óleo de tucumã, são o oleico, da família ômega 9 (ω -9) (monoinsaturado) seguido do palmítico (saturado). Também foram encontrados, porém em menor concentração, ácido esteárico (saturado), linoleico, da família ω -6 (monoinsaturado) e α -linolênico (família ω -3).

As duas classes de ácidos poli-insaturados essenciais são o ômega 3 (ω -3) e o ômega 6 (ω -6). O ω -3 pode reduzir os níveis de colesterol e triglicerídeos, auxiliar na produção de mediadores inflamatórios e agregação plaquetária (CALDER, 2008). Os ω -3 atuam no núcleo, na regulação de genes envolvidos na lipogênese, conjuntamente com receptores nucleares e fatores de transcrição (SAMPATH e NTAMBI, 2005). Os ácidos graxos (AG) ω -3 e 6

apresentam efeito hipocolesterolêmico e diminuem a concentração da fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue (GARÓFOLO e PETRILLI, 2006).

Além disso, os AG das séries ω -3 e 6, são precursores da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, envolvidos em processos de coagulação e inflamação, respectivamente. Os ω -6 participam da via inflamatória e os ω -3 ativam a via anti-inflamatória. O ácido linoleico é convertido a araquidônico e o ácido alfa-linolênico, a eicosapentaenoico. O ácido araquidônico é o precursor das prostaglandinas E2 (PGE2), leucotrienos B4 (LTB4), os quais são importantes eicosanoides pró-inflamatórios, e a tromboxana A2 (TXA2), potente vasoconstritor e agregador plaquetário. Na outra via, o ácido eicosapentaenoico é convertido em prostaglandinas E3 (PGE3), leucotrieno B5 (LTB5) e a tromboxana A3 (TXA3), com ações potencialmente anti-inflamatórias e antitrombóticas. Neste sentido, a ingestão adequada de ω -3 e 6, auxiliam no equilíbrio necessário para o controle dos processos de coagulação e inflamação (MOZAFFARIAN et al., 2005).

Quanto ao ácido oleico, apesar de não ser considerado essencial, acredita-se que em dietas ricas neste, ocorra um aumento nos níveis de fração de colesterol lipoproteínas de alta densidade (HDL), desta forma reduzindo o LDL, podendo reduzir a incidência de doenças cardíacas (SAMPATH e NTAMBI, 2005).

Quanto à atividade antioxidante do óleo de tucumã, foram realizados dois ensaios, o DPPH e o ABTS, onde o óleo apresentou IC₅₀ de 8,59 μ g/mL e 2,99 μ mol trolox/mg respectivamente. O ensaio DPPH investiga a capacidade sequestradora de RLs que determinada substância possui, conhecido também como efeito *scavenger* (ALVES et al., 2010). Quanto ao segundo ensaio antioxidante, o ABTS, é um método de captura do cátion radical ABTS o qual consiste na capacidade antioxidante de equivalente Trolox, ou TEAC (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Em estudo realizado por Sagrillo e colaboradores (2015) foi analisada a atividade antioxidante do extrato da polpa e casca do tucumã da espécie *Astrocaryum aculeatum*, onde, as IC₅₀ foram de 11,24 e 8,98 μ g/mL respectivamente. Outro exemplo, é fruto buriti (*Mauritia flexuosa*), também uma palmeira nativa da floresta amazônica, que no estudo realizado por Kollen e colaboradores (2013) apresentou no ensaio DPPH, IC₅₀ de 12,28 mg/mL.

Os antioxidantes naturais protegem o organismo contra os RLs, podendo retardar o envelhecimento, doenças crônicas e inflamatórias. Suas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos compostos fenólicos, vitaminas, físterois e flavonoides presentes em sua matriz química. Desta forma, o consumo regular de frutas tem sido associado a menores taxas

de incidência de doenças como o câncer, por exemplo, (ZHENG e WANG, 2001; HUANG e PRIOR, 2005; GARZON et al., 2010).

No presente trabalho também foram realizados estudos de pré-formulação das NT e NB. Em um primeiro momento, o ensaio de inchamento do polímero foi realizado com o intuito de verificar se o polímero selecionado para composição da parede polimérica das NCs seria dissolvido pelos componentes do núcleo oleoso. Foi concluído que o PCL parece manter sua estabilidade após a adição do óleo de tucumã. Esta metodologia foi proposta por Guterres e colaboradores (1995) com a finalidade de determinar o inchamento do polímero pelos componentes do núcleo oleoso da NC, avaliando a adequabilidade das matérias-primas (polímeros e óleos) para a formulação. Então, quando as massas dos polímeros permanecem constantes em determinados intervalos de tempo, geralmente 90 dias, há uma indicação de que a integridade destes componentes está se mantendo.

Com o objetivo de propor uma metodologia otimizada para a formulação de NT, duas foram analisadas, a de Fessi e colaboradores (1989) e Venturini e colaboradores (2011). O que as diferencia são as composições de óleo e tensoativo Span 60[®], que na metodologia de Venturini e colaboradores (2011) apresenta-se em menor concentração. Em Fessi e colaboradores (1988), a concentração de Span 60[®] e óleo está em 7,6 e 30,8 mg/mL respectivamente. Enquanto que em Venturini e colaboradores (2011), estas concentrações são de 3,6 e 16 mg/mL respectivamente. Também foi realizado o estudo de estabilidade das formulações durante 30 dias em temperatura entre 2 e 8 °C, analisando parâmetros como pH, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta.

O pH de ambas formulações ficou por volta de 5,4 durante os trinta dias de análise. Segundo Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010), os valores de pH das suspensões de NCs ficam entre 3,0 e 7,5 quando são aplicados métodos de nanoprecipitação, emulsão-difusão ou camada por camada. No presente estudo o método utilizado para o desenvolvimento das NCs nas duas metodologias foi o de precipitação do polímero pré-formado.

Quanto ao tamanho das NCs, não houve alteração significativa em ambas formulações nos 30 dias. Apenas ressalta-se que a formulação Venturini e colaboradores (2011) obteve tamanho médio de partícula menor, em torno de 216 nm, enquanto que as de Fessi e colaboradores (1989), 241 nm. O tamanho reduzido pode ser explicado devido à diminuição na concentração do óleo em relação à de Fessi e colaboradores (1989) (VENTURINI et al., 2011). Os diâmetros médios de NCs preparadas a partir de polímeros pré-formados apresentam-se entre 250 e 500 (BENDER et al., 2012).

O potencial zeta fornece a carga de superfície que determina a estabilidade das partículas na suspensão. Este parâmetro depende principalmente da natureza química do polímero e dos agentes de estabilização (MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2010). Neste estudo, o polímero utilizado foi a PCL, o qual possui carga negativa. Venturini e colaboradores (2011) pesquisaram a influência da concentração de polímero em NCs de núcleo lipídico na cinética de liberação do éster etílico de indometacina utilizando a hidrólise interfacial pró-fármaco. Com o intuito de obter formulações otimizadas contendo exclusivamente NCs de núcleo lipídico, foram preparadas diferentes suspensões com diferentes proporções de Spam 60[®], óleo e polímero. Os pesquisadores concluíram que formulações baseadas neste novo tipo, NCs otimizadas, têm a vantagem de encapsular quantidades maiores de fármaco lipofílico.

As NPs poliméricas são formadas pela difusão do solvente orgânico na fase aquosa, seguida da evaporação do solvente (FESSI et al., 1989). Um emulsionante (ou surfactante) é indispensável para prevenir a coalescência dos coloides devido à interferência entre as fases orgânica e aquosa. Assim, um aumento na concentração de emulsionante leva ao aumento da estabilidade da formulação (VENTURINI et al., 2011).

Ao passo que as NT seriam expostas ao ambiente celular, preocupou-se em analisar um possível efeito corona quando estas interagissem com os meios de cultura das células. Sendo assim, o comportamento com os meios RPMI e DMEM tanto das NT quanto das NB foi avaliado durante 24 e 72 horas de exposição. Foi observado leve aumento do tamanho bem como IPD em ambas formulações e meios de cultura, confirmado pelo ensaio de MTT nas CMSP, onde houve um efeito levemente citotóxico nas mesmas concentrações onde ocorreu esta agregação.

Neste sentido, o efeito das proteínas sob as NCs podem influenciar no comportamento destas no ambiente celular. Por isso a importância deste ensaio, pois, logo após o contato de uma NP com um sistema biológico, por exemplo, sangue, células ou tecido, uma fina camada de proteínas solúveis é formada na superfície destas, denominando-se corona proteica (DEL PINO et al., 2014).

Quanto aos ensaios *in vitro*, de perfil preliminar de segurança e eficácia, as NT foram analisadas quanto: atividade hemolítica, toxicidade nas CMSP e efeito antiproliferativo nas células MCF-7. No ensaio de hemólise, todas as concentrações mostraram-se seguras quando em contato com os eritrócitos. Este teste é importante para análise da citotoxicidade nos eritrócitos, uma vez que as substâncias permeiam pela corrente sanguínea, para tanto, este

ensaio é fundamental em estudos de segurança farmacológica (PAPE, PFANNENBECKER e HOPE, 1987).

O ensaio MTT demonstrou que após 24 horas em contato com as NT que as concentrações de 100, 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$ diminuíram ligeiramente a viabilidade dos linfócitos e monócitos. Contudo, Kong e colaboradores (2009) classificaram a redução da viabilidade celular em categorias, sendo considerado pouco citotóxico quando está entre 60 a 90%. Esta redução de viabilidade celular pode ser explicada, pois nas mesmas concentrações deste ensaio, percebeu-se a formação de corona proteica, onde o tamanho e IPD das NT tiveram um aumento significativo. Sendo assim, as células podem perder seus nutrientes, ocasionar mudanças na absorção com impacto na resposta celular, como por exemplo, citotoxicidade (HU et al., 2011; MONOPOLI et al., 2011; LESNIAK et al., 2012; LEE et al., 2015).

O ensaio de determinação de dsDNA no meio extracelular, não revelou citotoxicidade em nenhuma concentração, tanto das NT quanto do TL. Quanto as EROs detectadas no ensaio DCFH-DA, apenas o TL (200 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou aumento. O β -caroteno presente no óleo de tucumã, pode prevenir danos às células impedindo a produção de EROs (Bestwick e Milne, 1999). Quanto aos níveis de ON, aumentaram em todas as concentrações de NT e TL (500 $\mu\text{g/mL}$). Segundo Le Roux e colaboradores (2017), macrófagos após 24 horas de exposição à NPs lipídicas também elevaram os níveis de ON. Neste sentido, NPs superiores a 100 nm podem ser internalizadas em células precursoras de macrófagos, aumentando os níveis de ON (YU et al. 2012).

Como já mencionado, a eficácia antitumoral do óleo de tucumã e das NT contra as células MCF-7 foi avaliada através do ensaio MTT durante 72 horas de tratamento. A IC_{50} das NT foi de 50 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a TL 130 $\mu\text{g/mL}$. A ação do óleo de tucumã quando nanoencapsulado é potencializada devido às propriedades físico-químicas da NC, que devido ao menor tamanho, aumentam a permeabilidade pela membrana e retenção celular. Portanto, o óleo é liberado gradualmente e sua estabilidade é mantida, apresentando efeito antiproliferativo quando comparado ao TL, que apenas o mantém em concentrações mais elevadas. Existem evidências de que o β -sitosterol apresenta ação antitumoral contra o câncer de próstata, cólon e mama, segundo estudos realizados por Awad (2007). O β -caroteno pode regular a expressão de genes responsáveis pela proliferação e diferenciação celular e apoptose de células tumorais (KUCUK, 2002).

Conforme já discutido, o óleo deste estudo em sua caracterização apresentou o β -sitosterol, neste sentido, em estudo conduzido por Berges e colaboradores (1995), 200 pacientes foram tratados com 20 mg de β -sitosterol três vezes ao dia, demonstrando efeito

significativo na redução da hiperplasia de próstata benigna. A ingestão de β -sitosterol por vegetarianos, homens e mulheres de países asiáticos, pode possuir ação na diminuição da incidência do câncer de próstata, colon e mama (AWAD e FINK, 2000; LOMENICK et al., 2015).

Corroborando, este fitosterol também desempenhou inibição da proliferação de células de câncer de mama dependentes de estrogênio em camundongos ovariectomizados tratados com 9,8 g/kg de β -sitosterol. Além disso, teve efeito citotóxico em células leucêmicas após 72 horas de tratamento na concentração de 32 μ M, diminuindo a viabilidade celular em 33%, e ainda, em células de câncer de mama com 50% de diminuição da viabilidade na concentração de 16 μ M (AWAD et al., 2007). O esqualeno também compõe o óleo de tucumã e há indícios de que ele possa inibir o câncer de pulmão e tumor de pele em roedores, podendo-se dizer que ele possui um efeito protetor quando administrado antes e durante a terapia antitumoral, pois pode realizar modulação da atividade carcinogênica e também efeito antioxidante (CAYUELA e GARCÍA, 2018).

Além destes, o β -caroteno é o constituinte majoritário deste óleo. Este pode ser considerado um antitumoral devido ao seu poder antioxidante independente do seu papel precursor da vitamina A (NISHINO et al., 2002). Os retinoides têm a capacidade de regular a expressão gênica através de diferentes receptores celulares, os quais são fundamentais na indução da proliferação e diferenciação celular e ainda, apoptose de células tumorais (KUCUK, 2002). Existem dois principais receptores específicos dos retinoides: RAR (*Retinoid Acid Receptors*), o qual é específico do ácido retinoico; e o RXR (*Retinoid X Receptors*), específico dos retinoides. Além disso, os retinoides podem ligar-se diretamente a oncogenes exercendo papel anticarcinogênico (GONG, MARISIDDAIAH e RUBIN, 2013).

Baseando-se nos resultados obtidos *in vitro*, para uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade, ensaios *in vivo* foram realizados em um modelo alternativo, os peixes *Rhamdia quelen*, conhecidos popularmente como jundiás. Quanto ao índice de sobrevivência, todos os peixes se mantiveram vivos até o término dos tratamentos, não evidenciando sinais de toxicidade aguda. Quanto às análises nos órgãos, foi observada significativa redução nos níveis de NO nas brânquias no tratamento TS nas concentrações de 500 e 1000 μ g/mL. Igualmente ocorreu diminuição significativa nos níveis de ON no fígado com o tratamento TS na concentração de 500 μ g/mL. No cérebro não houve aumento de ON. As EROs também aumentaram com o tratamento TS nos três órgãos analisados. Brânquias (500 e 1000 μ g/mL), fígado (100, 200 e 1000 μ g/mL) e cérebro (100, 200 e 500 μ g/mL). Além disso, os níveis de EROs aumentam significativamente no fígado em todas as

concentrações de NB. E ainda, aumentam no fígado nos tratamentos com TL nas concentrações de 100, 200 e 1000 µg/mL.

Os níveis de EROs podem ser aumentados em resposta a certas condições bióticas ou abióticas e sinalizar a ativação de vias de morte celular ou autofagia. Como são produzidas e eliminadas em diferentes compartimentos celulares, qualquer estímulo estranho à célula pode aumentar a produção de EROs (ESPOSTI, 2002). Nesse sentido, existe a possibilidade de influência dos constituintes das NCs, os quais podem ter atuado sinergicamente, pois a permeabilidade da bicamada lipídica é desestabilizada por surfactantes não-iônicos. Por exemplo, as partes hidrofílicas e lipofílicas podem interagir com grupos polares das caudas lipofílicas da bicamada lipídica, resultando em ruptura da membrana plasmática (PARTEARROYO et al., 1990).

Os surfactantes Span 60[®] e Tween 80[®] (constituintes do grupo TS) são agentes emulsificantes que permeiam com facilidade as membranas. A nível celular, a intensa utilização de surfactantes em formulações com subsequente descarte em sistemas aquáticos requer que eles sejam biodegradáveis (STEBER et al., 1995).

Um ponto importante em destacar, é que as brânquias e o fígado são os principais órgãos-alvo para xenobióticos em peixes. No fígado, ocorrem distúrbios no metabolismo de lipídios e carboidratos, comprometendo indiretamente a função de outros órgãos (SHIOGIRI et al., 2012). Assim, respostas metabólicas e enzimáticas atuam como mecanismos de proteção contra a absorção de substâncias tóxicas, mas se essas condições ambientais persistirem, danos aos tecidos (particularmente brânquias) podem comprometer o metabolismo geral, incluindo vias envolvidas no reparo do DNA, crescimento e reprodução.

O óleo de tucumã quando nanoencapsulado não alterou os parâmetros de citotoxicidade, porém o TL aumentou a produção de EROs. Devido às características do óleo, tais como dificuldade na solubilidade e fotossensibilidade (BORA et al., 2001), as NT parecem ser uma alternativa porque possuem um sistema de liberação controlada dos compostos ativos, proteção contra fotodegradação, oxidação e aumento de solubilidade, considerando sua possível aplicabilidade. Neste contexto, o fruto de tucumã contém altas concentrações de pró-vitamina A, β-caroteno, 52.000/100 gramas, valor comparável apenas à polpa de *Mauritia flexuosa* (buriti). Além disso, possui ômega 3, 6 e 9, sendo um excelente hidratante, matéria-prima para loções corporais, por exemplo (MORAES e GUTJAHR, 2009; SANTOS et al., 2015).

Desta forma, mais estudos ainda são necessários para elucidação dos mecanismos antiproliferativos bem como de toxicidade das NT, visando aprimorar a discussão dos

resultados obtidos até o momento. Principalmente direcionar para os ensaios de atividade antitumoral, pois as NT demonstraram um promissor efeito antiproliferativo na linhagem celular utilizada, as MCF-7 de adenocarcinoma de mama. Podendo futuramente contribuir como uma possível alternativa no tratamento deste câncer tão prevalente entre as mulheres de todo o mundo.

7 CONCLUSÃO

- Quanto à caracterização da matriz química do óleo de tucumã (*A. vulgare*), foram encontrados:
 - Fitosteróis: esqualeno e β -sitosterol);
 - Carotenoides: *all-trans*- β -caroteno;
 - Ácidos graxos majoritários: oleico, palmítico e esteárico.

- Quanto à atividade antioxidante do óleo de tucumã (*A. vulgare*):
 - Possui atividade antioxidante evidenciada nos dois métodos analisados.

- Quanto aos estudos de pré-formulação:
 - Tanto as NT quanto NB mostraram-se estáveis quando aplicada a metodologia de Venturini e colaboradores (2011), e por esta razão foi escolhida para os ensaios biológicos deste estudo;
 - As NCs como veículo para o óleo de tucumã mostraram-se adequadas, pois apresentaram boa solubilidade e estabilidade;
 - As NCs apresentaram características físico-químicas adequadas, como tamanho de partícula, IPD, potencial zeta e pH.

- Quanto aos ensaios de segurança *in vitro*:
 - O óleo de tucumã (*A. vulgare*) não demonstrou citotoxicidade em sua forma livre e nanoencapsulada.

- Quanto aos ensaios de segurança *in vivo*:
 - As NT não foram tóxicas aos peixes *Rhamdia quelen* tendo em vista os parâmetros analisados.

- Quanto aos ensaios de eficácia antitumoral *in vitro*:
 - As NT possuem potencial antiproliferativo contra células de adenocarcinoma de mama (MCF-7);
 - A atividade antitumoral da NT pode estar relacionada à presença de β -sitosterol, esqualeno (fitoesteróis), ácido *all-trans*- β -caroteno, oleico e capacidade antioxidante, bem como melhor permeabilidade e retenção na célula tumoral.

- Este estudo é o primeiro a relatar os potenciais biológicos de uma nanocápsula de óleo de tucumã dessa espécie.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliação da expressão dos genes: *BAX*, *BCL2*, *E-caderina*, *SIRT1*, *ER*, *ER α* e *ER β* frente aos tratamentos com o óleo livre e nanoencapsulado.

9 REFERÊNCIAS

- ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. Textbook of Cancer Epidemiology. 2nd ed. **Oxford University Press**, 2008.
- AFSHARI, M.; DERAKHSHANDEH, K.; HOSSEINZADEH, L. Characterisation, cytotoxicity and apoptosis studies of methotrexate-loaded PLGA and PLGA423 PEG nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v.31, p. 239–245, 2014.
- ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHRAF, G.M.; KAMAL, M.A.; ANSARI, S.A.; DAMANHOURI, G.A.; ABUZENADAH, A.M.; CHAUDHARY, A.G.; SHEIKH I.A. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. **Anticancer Research**, v.32(7), p.2999–3005, 2012.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P.; MARCUS, V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33(10), p.2202-2210, 2010.
- AMENDOLA, L.C.B.; VIEIRA, R.A. Contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51(4), p.325-330, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019. <https://www.cancer.org/> acesso em 20 de julho de 2019.
- AMORATI, R.; FOTI, M.C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.10835–10847, 2013.
- AWAD, A.B.; CHINNAM, M.; FINK, C.S.; BRADFORD, P.G. β -Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**, v.14, p.747–754, 2007.
- AWAD, A.B.; FINK, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v.130(9), p.2127-2130, 2000.
- AZIZ, K.; NOWSHEEN, S.; PANTELIAS, G.; ILIAKIS, G.; GORGOLIS, V.G.; GEORGAKILAS, A.G. Targeting DNA damage and repair embracing the pharmacological for successful cancer therapy. **Pharmacological Therapy**, v.133(3), p.334-350, 2012.
- BARROS, A.C.S.D. Bases moleculares para a prevenção do câncer de mama. In: ANTUNES RCP; Perdicaris AAM. **Prevenção do Câncer**. Barueri, São Paulo: Manole, p.255–277, 2010.
- BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ, L. M.; ABDALLA, D. S. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly- ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v.426, p.271–279, 2012.
- BERGES, R.R.; WINDELER, J.; TRAMPISCH, H.J.; SENGE, T. Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. **Beta-sitosterol Study Group. Lancet**, v.17, p.1529-1532, 1995.
- BESTWICK, C.S.; MILNE, L. Effects of L-carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1474, p.47-55, 1999.

- BORA, P.S.; NARAIN, N.; ROCHA, R.V.M.; MONTEIRO, A.C.O.; MOREIRA, R.A. Characterization of the oil and protein fractions of tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) fruit. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v.3(2), p.111-116, 2001.
- BORRAJO, E.; ABELLAN-POSE, R.; SOTO, A.; GARCIA-FUENTES, G.; CSABA, N.; ALONSO, J.M.; VIDAL, A. Docetaxel-loaded polyglutamic acid-PEG nanocapsules for the treatment of metastatic câncer. **Journal of Controlled Release**, v.238, p.263–271, 2016.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223–253, 2004.
- CALDER, P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.79, p.101-108, 2008.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5.ed. Belém: Edições CEJUP/Museu Paraense Emílio Goeldi, 1991. 279pp. (Coleção Adolfo Ducke).
- CAYUELA, J.A.; GARCÍA, J.F. Nondestructive measurement of squalene in olive oil by near infrared spectroscopy. **Food Science and Technology**, v.88,p.103-108, 2018.
- CHAJÈS, V.; ROMIEU I. **Nutrition and breast cancer**. Maturitas, p: 7-11, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24215727?&report=abstract>. Acesso em: 24/04/2016.
- CHAVES, J.M.; PECHNIK, E. Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Revista Virtual de Quím**, v.16(5), p. 184-191, 1947.
- CLEMENT, C.R.; LLERAS, P.E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Revista Brasileira de Agrociência**,v. 9(1-2), p.67-71, 2005.
- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal know ledge and plant utilization in Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brasil).**Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p.159-175, 2009.
- COMBS JUNIOR, G.F. Vitaminas. In: Mahan, L.K. & Escott-Stump, S. (eds.). **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. São Paulo, Roca, p. 65-105, 2002.
- COSTANTINI, D. Stress Oxidativo e Hormesis em Ecologia Evolutiva e Fisiologia: um Casamento entre Abordagens Mecanica e Evolutiva. **Springer-Verlag, Berlim Heidelberg**, 2014 .
- DE CÁSSIA, S.S.; ANDRADE, R.; OLIVEIRA, L.N., SOUSA, D.P. A review on anti-inflammatory activity of phenyl propanoids found in essential oils. **Molecules**, v. 19, p.1459–1480, 2014.
- DEL PINO, P.; PELAZ, Q.; ZHANG, P.; MAFFRE, G.U.; NIENHAUS, W.J. Proteína corona formação em torno de nanopartículas - do passado para o futuro. **Mater. Horiz.**,v.1, p.301–313, 2014.

DE SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v.16, p.2233–2252, 2011.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E.B.; SILVA, A.M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a systematic review of *in vitro* data. **European Journal of Pharmacology and Biopharmaceutics**, v.87, p.1–18, 2014.

DORAI, T.; AGGARWAL, B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer Letters**, v,215(2),p.129-40,2004.

DROBNE, D. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. **Arh Hig Rada Toksiko**, v.58, p.471–478, 2007.

DURÁN, N; AZEVEDO, M.M. **Rede de pesquisa em nanobiotecnologia**. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano20.htm>.

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P. C. “Nanotecnologia”. São Paulo, **ArtLiber**: p.1-201, 2006.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse actions and challenges in monitoring safety, **Frontiers Pharmacology**, v.4(177), p.1-10, 2014.

ELLIOTT, R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. **Biochemical and Biophys Acta.**, v.1740(2), p.147-54, 2005.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C.V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.438(64), p.129–137, 2012.

ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. **Free Radical Biology & Medicine**, v.7, p.199-203,1989.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**. v. 26, p. 335-340, 2002.

FAN, A.M.; ALEXEEFF, G.; KHAN, E. **Toxicology and risk assessment**. CRC Press, Boca Raton, Taylor & Francis Group, 1.ed. 2015.

FERNANDES, M.F.M.; FILGUEIRAS, C.A.L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química Nova**, v.31(8),p.2201-2213, 2008.

FERREIRA, E.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, A.S.; SILVEIRA, C.S. Physicochemical characterization of the fruit and oil extracted from tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.4, p. 427-433,2008.

FESSI, H.; PUISIEUX, J.P.; DEVISSAGUET, N. AMMOURY, S. BENITA, Nanocapsules formation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutical**, v.55, R1–R4, 1989.

FREITA, V.S.; LOPES, M.A.; MEIRELES, J.R.C.; REIS, L.; CERQUEIRA, E.M.M. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, v.29,n.2,p.189-199, 2005.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A.S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**, v.19, p.611-621, 2006.

GARZON, G. A.; NARVÁEZ, C. E.; RIEDL, K. M.; SCHWARTZ, S. J. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. **Food Chemistry**, v.122, p. 980–986.2010.

GHELFI, A.; RIBAS, J.L.C.; GUILOSKI, I.C.; BETTIM, F.L.; PIANCINI, L.D.S.; CESTARI, M.M.; PEREIRA, A.J.; SASSAKI, G.L.; SILVA, H.C.; ASSIS, D.E. Avaliação de biomarcadores bioquímicos, genéticos e hematológicos em um bagre comercial *Rhamdia quelen* exposto ao diclofenaco. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.96, p.49–54, 2016.

GOKSOYR, A.; ANDERSON, T.; BUHLER, D.R.; STEGEMAN, J.J.; WILLIAMS, D.E.; FORLIN, L. Immunochemical cross-reactivity (3-naphthoflavone - inducible cytochrome P450 in liver microsomes from different fish species and rat. **Fish Physiology**, v.9, p. 1-13, 1991.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Telostei, pimododidae). **Ciencia Rural**, v.30, p.179-185, 2000.

GOMES, M.C.B. et al. Prevalência da mutação BRCA 1 e BRAC 2 em pacientes com câncer de mama em uma população do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v.8(27),p.24-28, 2011.

GOMIERO, L.M.; SOUZA, U.P.; BRAGA, F.M. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios da unidade de Santa Virgínia, parque estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropia**, v.7, p.127-133, 2007.

GONG, X.; MARISIDDAIAH, R.; LEWIS, P. β -Carotene regulates expression of β -carotene 15,150-monoxygenase in human alveolar epithelial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.539, p.230–238, 2013.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v.9(12), p.767–776, 2007.

GOTTESMAN, M.M.; PASTAN, Y. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual Review Biochemistry**, v.62, p.385-427, 1993.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J.P.; F. PUISIEUX, F. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac. I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.13, p.57–63, 1995.

HADDAD, C.F. Trastuzumab no câncer de mama. **FEMINA**, v.38(32), 2010.

HAEGELE, A.D. et al. Plasma xanthophylls carotenoids correlate inverse ly with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.9(4), p.421-5, 2000.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal Neurochemical**, n.59, p.1.609-23, 1994.

HANSEL, W.; ENRIGHT, F.; LEUSCHNER, C. Destruction of breast cancers and their metastases by lytic peptide conjugates in vitro and *in vivo*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.260-262,p.83–189,2007.

HARTWIG, F.P. et al. Oncogenic somatic events in tissue-specific stem cells: A role in cancer recurrence. **Ageing Research Reviews**, v.13,p.100–106, 2014.

HERNANDEZ, E.M. Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. **Functional Dietary Lipids**, v.2,p.69–101, 2016.

HIGUCHI, L.; FEIDEN, A.; MALUF, M.; DALLAGNOL, J.; ZAMINHAN, M.; BOSCOLO, W. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta com diferentes níveis protéicos e energéticos. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, p.70-75, 2011.

HILLEGASS, J.M.; SHUKLA, A.; LATHROP, S.A.; MACPHERSON, M.B.; FUKAGAWA, N.K.; MOSSMAN, B.T. Assessing nanotoxicity in cells *in vitro*. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v.2, p. 219–231, 2010.

HU, W.; PENG, C.; LV, M.; LI, X.; ZHANG, Y.; CHEN, N., et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. **ACS Nano**, v.5, p.3693–3700, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841–1858,2005.

IKEDA, I.; TANAKA, K.; SUGANO, M.;VAHOUNY, G.V.;GALLO, L.L. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. **Journal of Lipid Research**, v.29, p.1573-1582, 1988.

INCA, Instiuto Nacional do Câncer, 2014. <https://www.inca.gov.br/> Acesso em 23 de setembro de 2015.

INCA, Instiuto Nacional do Câncer, 2015. <https://www.inca.gov.br/> Acesso em 23 de setembro de 2015.

INCA, Instiuto Nacional do Câncer, 2016. <https://www.inca.gov.br/> Acesso em 02 novembro de 2017.

INCA, Instiuto Nacional do Câncer, 2018. <https://www.inca.gov.br/> Acesso em 19 de fevereiro de 2018.

HEATH, J.R.; DAVIS, M.E. Nanotechnology and Cancer. **Annual Review of Medicine**, v.59,p.251-265, 2008.

JAMES, R.H.; PHELPS, M.P.; HOOD, M.D.L. NanoSystems Biology. **Molecular Imaging and Biology**, v.5(5), p.312–325, 2003.

JIA, X.; LUA, Y.; TIANB, H.; MENG, X.; WEIA, M.; CHOD, W.C. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.114, p.108800, 2019.

KONG, B.; SEOG, J.H.; GRAHAM, L.M.; LEE, S.B. Experimental considerations on the 464 cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v.6, p.929–941, 2011.

KONG, N.; JIANG, T.; ZHOU, Z.; FU, J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells *in vitro*. **Dental materials**, v.25, p.1371–1375, 2009.

KOOLEN, H.H.F.; SILVA, F.M.A.; GOZZO, F.G.; SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.51(2), p.467-473, 2013.

KRONENBERG, J. MINDES, J.S. JACOBSON, J.S. The future of complementary and alternative medicine for cancer. **Cancer Investigation**, v.23(5), p.420–426, 2005.

KSHIRASAGAR, N.A.; BODHE, P.V.; KOTWANI, R.N. Targeted drug delivery in visceral leishmaniasis. **Journal of Pharmaceutical Research**, v.21, p.21–24, 1997.

KUCUK, O. Cancer chemoprevention. **Cancer Metastasis Review**, v.21(3-4), p.189-97, 2002.

LEAL, J.H.S.; CUBERO, D.; GIGLIO, A.D. Hormonioterapia paliativa em câncer de mama: aspectos práticos e revisão da literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v.8(4), p.338-43, 2010.

LEE, J. et al. Reduced drug accumulation and multi drug resistance in human breast cancer cells without associated P glycoprotein or MRP over expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.65, p.513-26, 1997.

LEE, Y.K.; CHOI, E.J.; WEBSTER, T.J.; KIM, S.H.; KHANG, D.. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p.97–112, 2015.

LEITE, F.M.C.; BUBACH, S.; AMORIM, M.H.C.; DE CASTRO, D.S.; PRIMO, C.C. Mulheres com Diagnóstico de Câncer de Mama em Tratamento com Tamoxifeno: Perfil Sociodemográfico e Clínico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.57(1), p.15-21, 2010.

LESNIAK, A.; FENAROLI, F.; MONOPOLI, M.R.; ABERG, C.; DAWSON, K.A.; SALVATI, A. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. **ACS Nano**, v.6, p.5845–5857, 2012.

LE ROUX, G.; MOCHE, H.; NIETO, A.; BENOIT, J.; NESSLANY, F.; LAGARCE, F. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules. **Toxicology in vitro**, v.41, p.189-199, 2017.

LI, Y.; JIN, M.; SHAO, S.; HUANG, W.; YANG, F.; CHEN, W.; et al., Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically relevant 4T1 mouse breast cancer model. **BMC Cancer**, v.14, p.329, 2014.

LIU, C.; WU, C.; PETROSSIAN, K.; HUANG, T.; TSENG, L.; CHEN, S. Treatment for the endocrine resistant breast cancer: Current options and future perspectives. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.172, p.166–175, 2017.

LOMENICK, B.; SHI, H.; HUANG, J.; CHEN, C. Identification and characterization of b-sitosterol target proteins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, p.4976–4979, 2015.

MAGUIRE, L.S.; O'SULLIVAN, S.M.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.55(3), p.171-178, 2004.

MELA, M.; GUILOSKI, I.C.; DORIA, H.B.; IRABITTO, I.S.; DA SILVA, C.A.; MARASCHI, A.C.; PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A.; RANDI, M.A.F.; RIBEIRO, C.A.O.; DE ASSIS, H.C.S. O risco de exposição ao cobre à base de água a um peixe-gato neotropical de água doce cultivado (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.88, p.108-116, 2013.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v.266, p.66-71, 1994.

MONOPOLI, M.P.; WALCZYK, D.; CAMPBELL, A.; ELIA, G., LYNCH, I.; BOMBELLI, F.B., et al. Physical–chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. **Journal of American Chemical Society**, v.133, p.2525–2534, 2011.

MONTEIRO M.V.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; PALHA, M.DC.; BRAGA, R.R.; SCHWANKE, K.; RODRIGUES, S.T.; LAMEIRA, O.A. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, Eastern Amazonia, Brazil. **Acta Amazônica**, v.41(2), p.233-242, 2011.

MORAES, L.R.B.; GUTJAHR, E. **Química de Oleaginosas: valorização da biodiversidade amazônica**. Brasília, DF: GTZ, 2009, 83p.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.385, p.113–142, 2010.

MOZAFFARIAN, D.; ASCHERIO, A.; HU, F.B.; STAMPFER, M.J; WILLETT, W.C.; SISCOVICK, D.S.; ET AL. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. **Circulation**, v.11(2), p.157-64, 2005.

NAKATA, M.; MYODA, T.; WAKITA, Y.; SATO, T.; TANAHASHI, I.; TOEDA, K.; FUJIMORI, T.; NISHIZAWA, M. Volatile components of essential oil from cultivated *Myrica gale* var. *tomentosa* and its antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Oleo Science**, v.62, p.755–762, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (USA). Recommended Dietary Allowances.10. ed. Washington DC: **National Academy Press**, p.78-92, 1989.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75(3), p.311–335, 2012.

NISHINO H, MURAKOSHI M, LI T, TAKEMURA M, KUCHIDE M, KANAZAWA M, et al. Carotenoids in cancer chemoprevention. **Cancer Metastasis Review**, v.21(3-4), p.257-64, 2002.

OLIVEIRA, V.M.; ALDRIGHI, J.M.; RINALDI, J.F. Quimioprevenção do câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.52(6), p.453-9, 2006.

OLSON, J. A. In: MACHLIN, L. J., **Handbook of Vitamins** ed.2ª ed, New York: Marcel Dekker, 1991.

Organização Mundial da Saúde, 2017. <https://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/> Acesso em 02 de novembro de 2017.

PAPE W.; PFANNENBECKER, U.Y.; HOPE, U. Validation of the red blood cell test as an in vitro assay for therapy discreening of irritation potential of surfactants. **Molecular Toxicology**, v.1, p.525-536, 1987.

PARAZZINI, F. et al. Epidemiology of breast cancer in young women. In: BIGLIA, N.; PECCATORI, F. A. Breast cancer, fertility preservation and reproduction. **New York: Springer Berlin Heidelberg**, p.1-9, 2015.

PARKER, R.S.; SWANSON, J.E.; YOU, C.S.; EDWARDS, A.J.; HUANG, T. Bioavailability of carotenoids in human subjects. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58(1),p.155-62, 1999.

PARKIN, D.M.; BRAY, F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v.24,p.11-25, 2006.

PARTEARROYO, M.A.; OSTOLAZA, H.; GONI, F.M.; BARBERA-GUILLEM, E.; Surfactant induced cell toxicity and cell lysis: a study using B16 melanoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v.40, p.1323–1328, 1990.

PATEL, S.; GOGNA, P. Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. **Industrial Crops and Products**, v.76,p.1148–1163, 2015.

PEREIRA, L.S.; RIBAS, J.L.C.; VICARI, S.B.; SILVA, J.; STIVAL, A.P.; BALDAN, F.X.; VALDEZ, D.; GRASSI, M.D.; CESTARI, M.M.; DE ASSIS, H.C.S. Efeitos de concentrações ecologicamente relevantes de cádmio em um peixe de água doce. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.130, p.29–36, 2016.

PIMENTEL, A.G.M. Cultivo de plantas medicinais na Amazônia. Belém: FCAP-**Serviço de documentação e informação**, p.114, 1994.

- PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Ed. Varela, 2005. 95 p.
- POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **Journal of Clinical Investigation**, v.117(3), p.155-3163, 2007.
- PRESEGUÉ-BOSCH, L.; VAQUERO, A. The dual role of sirtuins in cancer. **Genes & Cancer**, v.2(6), p.648-662, 2011.
- QUINTAS, V.; PRADA-LÓPEZ, I.; DONOS, N.; SUÁREZ-QUINTANILLA, D.; TOMÁS, I. Antiplaque effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: a randomised clinical trial. **PLoS One**, v.10, p.117-177, 2015.
- RIBAYA-MERCADO, J.D. et al. Bioconversion of plant carotenoids to vitamin A in Filipino school-aged children varies inversely with vitamin A status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p.455-465, 2000.
- RIGGS, B.L.; HARTMANN, L.C. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. **New England Journal of Medicine**, v.348(7), p.618-29, 2003.
- ROCHA, T.T.; TAVARES-MARTINS, A.C.C.; LUCAS, F.C.A.; MARTINS, R.C.C. Potencial terapêutico e composição química do óleo de bicho do tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) utilizado na medicina popular. **Scientia Plena**, v.10(11), p.1-10, 2014.
- ROESSNER, A.; KUESTER, D.; MALFERTHEINER, P.; SCHNEIDER, STOCK, R. Oxidative stress in ulcerative colitis associated carcinogenesis. **Pathology Research Practice**, v.204(7), p.511-524, 2008.
- RYAN, G.M.; KAMINSKAS, L.M.; PORTER, C.J.H. Nano-chemotherapeutics: Maximising lymphatic drug exposure to improve the treatment of lymph-metastatic cancers. **Journal Controlled Release**, v.193, p.241-256, 2014.
- SAGRILLO, M.R.; GARCIA, L.F.M.; SOUZA FILHO, O.C.; DUARTE, M.M.F.; RIBEIRO, E.E.; CADONÁ, F.C.; CRUZ, I.B.M. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v.173, p.741-748, 2015.
- SAHOO, S.K; PARVEEN, S, M. S, J.J; PANDA, M.S. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.3, p.20- 31, 2006.
- SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v.25, p.317-4°, 2005.
- SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SANTOS, M.F.G.; MAMEDE, R.V.S.; RUFINO, M.S.M.; BRITO, E.S.; ALVES, R.E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. **Antioxidants**, v.4, p.591-602, 2015.

SARTORI, J.; FRASSON, A.L. Mecanismos epigenéticos na carcinogênese mamária – o papel das sirtuínas. **Perspectiva**, v.39, n.145, p.19-28,2015.

SCHAFFAZICK, S.R; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, p.726-737, 2003.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal**, v.43, supl., p.S85-S94, 2002.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: CIFOR, Imazon,2005.

SHIOGIRI, N.S.; PAULINO, M.G.; CARRASCHI, S.P.; BARALDI, F.G.; DA CRUZ, C.; FERNANDES, M.N. A exposição aguda de um herbicida à base de glifosato afeta as brânquias e o fígado do peixe neotropical, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental of Toxicology and Pharmacology**, v.34(2), p.388-396, 2012.

SOTIRIOU, C.; PHIL, D.; PUZSTAI, L. Gene-expression Signatures in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**,v.360,p.790-800, 2009.

SOUZA FILHO, O.C.; SAGRILLO, M.R.; GARCIA, L.F.M.; MACHADO, A.K.; CADONA, F.; RIBEIRO, E.E.; DUARTE, M.M.F.; MOREL, A.F.; CRUZ, I.B.M. The In Vitro Genotoxic Effect of Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian Fruit Rich in Carotenoids. **Journal of Medicine Food**, v.16(11), p.1013–1021, 2013.

STEBER, J.; GUHL, W.; STELTER, N.; SCHRODER, FR. Alkyl polyglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. **Tenside Surfactants Detergents**, v.32(6),p.515-521, 1995.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S.K. Drug delivery systems: an updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.2, p.2–11, 2012.

VENKITARAMAN, A.R.Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**,v.108,p.171-82, 2002.

VENTURINI, C.G.; JÄGERB, E.; OLIVEIRA, C.P.; BERNARDIC, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.375,p.200–208, 2011.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell 514 interactions. **Small**, v.6, p.12–21, 2010.

VILLACHICA, H. **Frutales y hortalizas promisorias de La Amazonía**: tratado de cooperación amazonica. Lima: Secretaria Pro-Tempore, Tratado de Cooperacion Amazonica, 1996. 367p.

VILLASEÑOR, M.; ANGELADA, J.; CANLAS, A.P.; ECHEGOYEN, D. Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside. **Phytotherapy Research**, v.6(5), p.417-21, 2002.

WANG, X.D. Review: absorption and metabolism of β - carotene. **Journal of the American College of Nutrition**,v.13, n.4, p.314-325, 1994.

WAUTHOZ, N.; BASTIAT,G.; MOYSAN,E.; CIESLAK, A.; KONDO, K.; ZANDECKI, M.; et al. Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.1, p. 1237-1245, 2015.

WILLIS, M.S.; WIANS, F.H JR. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. **Clinica Chimica Acta**,v.57-83, p.330 (1-2), 2003.

YEH, S.L.; HU, M.L. Oxidized beta-carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549. **Food Chemical Toxicology**, v.41(12),p.1677-84, 2003.

YOU, J.S.; JONES, P.A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin. **Cancer Cell**, v.22(1),p.9-20, 2012.

YU, S.S.; LAU, C.M.; THOMAS, S.N.; JEROME, W.G.; MARON, D.J.; DICKERSON, J.H.; HUBBELL, J.A.; GIORGIO, T.D. Size and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages. **International Journal of Nanomedicine**, v.7,p.799-813, 2012.

ZHANG, M.G.; LEE, J.Y.; GALLO, R.A.; TAO, W.; TSE, D.; DODDAPANENI, R.; PELAEZ, D. Therapeutic targeting of oncogenic transcription factors by natural products in eye cancer. **Pharmacological Research**, v.129,p.365-374, 2018.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5165–5170,2001.

ANEXO A: CARTA DE ACEITE DO MANUSCRITO I

Natural Product Research

Decision Letter (GNPL-2019-1050.R3)

From: marcello.nicoletti@uniroma1.it
To: sagrillorm18@gmail.com
CC:
Subject: Natural Product Research - Decision on Manuscript ID GNPL-2019-1050.R3
Body: 22-Jul-2019

Dear Dr Sagrillo:

Ref: Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of Tucumã oil nanocapsules in breast adenocarcinoma cells (MCF-7)

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in Natural Product Research. We are pleased to accept your paper in its current form which will be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting in due course. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

You will then receive instructions for transfer of copyright, and proofs for checking from the publisher's Central Article Tracking System (CATS).


Thank you for your contribution to Natural Product Research, and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
 Professor Nicoletti
 marcello.nicoletti@uniroma1.it

Manuscripts with Decisions

| ACTION | STATUS | ID | TITLE | SUBMITTED | DECISIONED |
|--------|---|-------------------|--|-------------|-------------|
| | EO: Bianco, Amandodoriano EO: Venditti, Alessandro | GNPL-2019-1050.R3 | Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of Tucumã oil nanocapsules in breast adenocarcinoma cells (MCF-7) | 10-Jul-2019 | 22-Jul-2019 |
| | <ul style="list-style-type: none"> Accept (22-Jul-2019) view decision letter | | | | |
| | | | View Submission | | |

ANEXO B: SUBMISSÃO DO MANUSCRITO II

 **Naunyn-Schmiedeberg's Editorial Office** <em@editorialmanager.com>
Para: Kátia Nascimento 23 de jul às 08:45

Re: "Evaluation of the in vivo safety of tucumã oil nanocapsules in experimental model of silver catfish *Rhamdia quelen*"
Full author list: Kátia Nascimento; Matheus Dellaméa Baldissera, Carine de Freitas Souza; Gerson Fernandes de Brum; Andriara Prates Ramos; Roberta Cogo Rieffel; Lauren Pappis; Walter Paixão de Sousa Filho; André Gundel; Alencar Kolinski Machado; Aline Ferreira Ourique; Bernardo Baldisserotto; Michele Sagnillo; José Edson Paz da Silva

Dear Ms Kátia Nascimento,

We have received the submission entitled: "Evaluation of the in vivo safety of tucumã oil nanocapsules in experimental model of silver catfish *Rhamdia quelen*" for possible publication in Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. Michele Sagnillo who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology