



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOTENOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

BRENDA MARTINS GABÍNIO

**AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE NANOEMULSÕES CONTENDO R-(-)-
CARVONA**

**JOÃO PESSOA
2019**

BRENDA MARTINS GABÍNIO

**AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE NANOEMULSÕES CONTENDO R-(-)-
CARVONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia aplicada a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo - UFPB

Coorientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira - UEPB

**JOÃO PESSOA
2019**

G113a Gabínio, Brennda Martins.

AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE NANOEMULSÕES CONTENDO
R-(-)- CARVONA / Brennda Martins Gabínio. - João
Pessoa, 2019.
64 f. : il.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Nanobiotecnologia. 2. Monoterpeno. 3.
Anticancerígeno. I. Oliveira, Elquio Eleamen. II.
Título.

UFPB/BC

BRENNDA MARTINS GABÍNIO

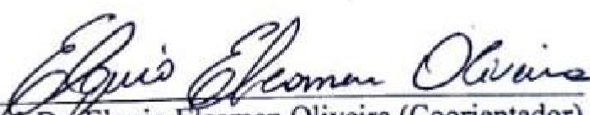
AVALIAÇÃO ANTICANCERÍGENA DE NANOEMULSÕES CONTENDO R-(-)-
CARVONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

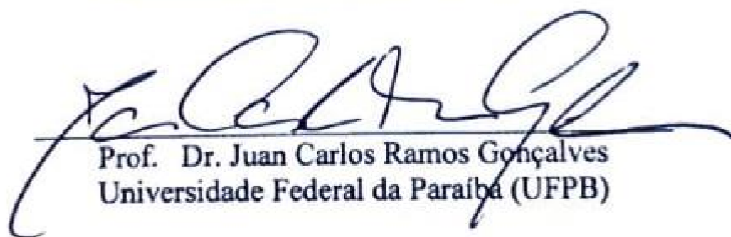
Área de concentração: Biotecnologia aplicada a saúde.

Avaliada em 29 de novembro de 2019

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Coorientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)


Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A todos os professores, pela dedicação, companheirismo e amizade e a todos os pós-graduandos que continuam resistindo ao desmonte da educação brasileira, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Demétrius Antônio Machado de Araújo, e coorientador, Elquio Eleamen Oliveira, por terem me aceitado e por todo o conhecimento em mim depositado, dedicação e compreensão.

A Prof.^a Dra. Bruna Braga Dantas, pelo apoio durante todo o desenvolvimento de minha pesquisa.

Ao Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, por disponibilizar o Zetasizer para as análises caracterização dos sistemas nanoparticulados.

Ao doutorando, Rafael Limongi de Souza, mestranda, Isabela Motta Felício, e alunos de iniciação científica, Lucas Evangelista de Lima Terceiro, Matheus Fabião de Lima e Patrik Saul Zarpellon Barbosa, pelo auxílio nas análises de citotoxicidade, caracterização do sistema e por toda dedicação.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPB, que contribuíram ao longo de vinte e quatro meses, por meio das disciplinas e debates, para o meu desenvolvimento enquanto aluna e crescimento enquanto profissional.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, por todo conhecimento compartilhado e companheirismo.

Aos colegas de disciplinas pelos momentos de amizade e apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

“No mundo nanométrico, algumas forças que são importantes para o mundo macroscópico são minimizadas. Como, por exemplo, o movimento Browniano é mais significativo que a gravidade (ZORZI et al., 2015).”

RESUMO

Caracterizada por um distúrbio hiperproliferativo, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo. Onde, o câncer de mama mostra-se como o mais comum e letal entre a população feminina em que mesmo após o tratamento, muitos pacientes apresentam deficiências no funcionamento físico e cognitivo, efeitos colaterais que, muitas vezes, estão relacionados as formulações administradas durante o tratamento. Mostrando que as terapias atuais combinam o tratamento com um alto grau de incerteza. A carvona é um monoterpeneo naturalmente encontrado em diversos óleos essenciais que em estudos recentes causou indução de apoptose, inibição da migração e parada do ciclo celular em células tumorais apresentando pouca ou nenhuma toxicidade em células normais, entretanto, caracteriza-se volátil, apresentando baixa solubilidade em água e biocompatibilidade inadequada na forma de óleo nativo necessitando, portanto, de um transportador para atingir eficientemente as células cancerígenas. Dentre os sistemas de entrega, estão as nanoemulsões que são emulsões de tamanho submicrônico sendo sistemas utilizados para entrega sistêmica de agentes biologicamente ativos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial anticancerígeno *in vitro* de R-(-)-Carvona livre e nanoencapsulada sobre cultura de células de câncer de mama. As nanoemulsões foram produzidas nas concentrações de 5mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 37,5 mg/mL e 50 mg/mL utilizando o método de emulsificação ultrassônica e caracterizadas quanto aos seus aspectos físico-químicos, pela determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta, além da obtenção da curva de calibração e valores de pH e condutividade. Foram realizados ainda testes de citotoxicidade *in vitro* nas linhagens de fibroblasto (L929) e glândula mamária (4T1) mensurando a viabilidade celular por meio do ensaio de redução do MTT e realizamos o ensaio de cicatrização de feridas observadas nos tempos de 0h, 24h e 72h. Os resultados encontrados revelam nanopartículas com tamanho médio variando entre 133nm a 183nm, não proporcional a quantidade de fármaco utilizado, potencial zeta médio de -36,4mV e índice de polidispersão inferior a 0,240. A toxicidade do veículo foi próximo ao grupo controle e mostrou valores acima de 100% induzindo uma possível proliferação. As emulsões analisadas foram citotóxicas para a linhagem de câncer de mama, onde o nanossistema apresentou uma boa atividade e eficiência na potencialização dos efeitos citotóxicos quando comparados com a R-CV livre. Os resultados de migração demonstram uma rápida migração no grupo controle para ambas as linhagens testadas com permanência do potencial de migração com o fármaco livre e alteração na adesão célula-matriz em células cancerígenas. Portanto, alcançamos uma formulação satisfatória com efeito anticancerígeno significativo em células de câncer de mama em um curto período de tempo, o que representa uma formulação promissora para auxiliar aos tratamentos convencionais empregados para esta doença.

Palavras-chaves: Nanobiotecnologia. Monoterpeneo. Anticancerígeno.

ABSTRACT

Characterized by a hyperproliferative disorder, cancer remains one of the leading causes of death worldwide. Where, breast cancer proves to be the most common and lethal among the female population in which even after treatment, many patients have deficiencies in physical and cognitive functioning, side effects that are often related to formulations administered during treatment. Showing that current therapies combine treatment with a high degree of uncertainty. Carvone is a monoterpene naturally found in several essential oils that in recent studies caused induction of apoptosis, inhibition of migration and arrest of the cell cycle in tumor cells presenting little or no toxicity in normal cells, however, it is characterized as volatile, presenting low solubility in water and inadequate biocompatibility in the form of native oil, therefore needing a transporter to efficiently reach cancer cells. Among the delivery systems, there are nanoemulsions that are emulsions of submicron size and systems used for systemic delivery of biologically active agents. Thus, the present study aimed to evaluate the in vitro anti-cancer potential of R - (-) - free and nanoencapsulated carvone on breast cancer cell culture. The nanoemulsions were produced in concentrations of 5mg / mL, 12.5 mg / mL, 25 mg / mL, 37.5 mg / mL and 50 mg / mL by the ultrasonic emulsification method and characterized by of their physical-chemical aspects, determining the particle size, polydispersity index and zeta potential, in addition to obtaining the calibration curve and the pH and conductivity values. In vitro cytotoxicity tests were also performed on the fibroblast (L929) and mammary gland (4T1) lines, measuring cell viability using the MTT reduction test and we performed the wound healing test observed at 0h, 24h and 72h. The results found show nanoparticles with average size varying between 133nm and 183nm, not proportional to the amount of drug used, average zeta potential of -36.4mV and polydispersion index less than 0.240. Vehicle toxicity was the next control group and showed values above 100%, inducing possible proliferation. The emulsions analyzed were cytotoxic for the breast cancer lineage, where the nanosystem shows good activity and potential for potentiation of cytotoxic effects when compared with a free R-CV. The results shown a fast migration in the control group, with the permanence of the migration potential with the free drug and alteration in the adhesion of the matrix cell in cancer cells. Therefore, we achieved satisfactory formulation with a significant anticancer effect on breast cancer cells in a short period of time, showing represents a promising formulation to assist the conventional treatments used for this disease.

Keywords: Nanobiotechnology. Monoterpene. Anticancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Características em comum de células cancerosas.	16
Figura 2 –	Incidência dos dez principais tipos de câncer estimados por sexo nos Estados Unidos.	17
Figura 3 –	Estrutura química da R- e S- Carvona.	21
Figura 4 –	Representação de modificação superficial de nanopartículas (a) e conjugação de ligantes específicos para câncer (b).	22
Figura 5 –	Representação de uma nanoemulsão óleo/água.	23
Figura 6 –	Características específicas das nanoemulsões como sistema de administração de drogas.	24
Figura 7 –	Microfotografia da linhagem L929, em microscópio óptico invertido com distância focal de 35mm.	29
Figura 8 –	Microfotografia da linhagem 4T1, em microscópio óptico invertido com distância focal de 35mm.	30
Figura 9 –	Nanoemulsões contendo 5 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; 37,5 mg/mL e 50 mg/mL de R-Carvona.	33
Figura 10 –	Curva de calibração da R-Carvona, onde o eixo X representa a concentração das diluições e o eixo y o valor de absorbância, $\pm$ desvio padrão	36
Figura 11 –	Foto de uma placa de 96 poços (KASVI) após ensaio de MTT.	37
Figura 12 –	Efeito da adição do filme selante de placas na viabilidade em células L929 e 4T1 $\pm$ erro padrão em 72h. Dados de um experimento, realizado em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.	38
Figura 13 –	Efeito citotóxico dos compostos livres em células L929 $\pm$ erro padrão em 24h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.	39
Figura 14 –	Efeito citotóxico da R-Carvona livre em células L929 $\pm$ erro padrão em 24h e 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 em relação ao controle.	40

Figura 15 – Efeito citotóxico da R-Carvona livre em células L929 $\pm$ erro padrão em 40 24h e 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Figura 16 – Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células L929 $\pm$ erro 43 padrão em 24h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulções (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

Figura 17 – Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células L929 $\pm$ erro 44 padrão em 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulções (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

Figura 18 – Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células 4T1 $\pm$ erro 45 padrão em 24h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulções (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

Figura 19 – Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células 4T1 $\pm$ erro 46 padrão em 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a

nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulções (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

Figura 20 – Efeito da R-Carvona livre e nanoencapsulada na migração celular pelo 49 processo de cicatrização de feridas em L929. Controle: ausência de carvona no tratamento; DL1,2mM: tratamento com droga livre em concentração de 1,2mM; DL0,6mM de carvona: tratamento com droga livre em concentração de 0,6mM de carvona; NE1,2mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concentração de 1,2mM de carvona e NE0,6mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concentração de 0,6mM. Imagens representativas das triplicadas.

Figura 21 – Efeito da R-Carvona livre e nanoencapsulada na migração celular pelo 50 processo de cicatrização de feridas em 4T1. Controle: ausência de carvona no tratamento; DL1,2mM: tratamento com droga livre em concentração de 1,2mM; DL0,6mM de carvona: tratamento com droga livre em concentração de 0,6mM de carvona; NE1,2mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concentração de 1,2mM de carvona e NE0,6mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concentração de 0,6mM. Imagens representativas das triplicadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Caracterização do sistema nanoparticulado	34
Tabela 2	– Valores de condutividade para as formulações contendo R-Carvona	35
Tabela 3	– Valores de pH para as formulações contendo R-Carvona	35
Tabela 4	– Ordenação não métrica de dados brutos de absorbância em 570nm em células 4T1 em 72h. Realizado em triplicata onde $0 = x \leq 1$; $1 = x \geq 1 \leq 1.2$; $2 = x \geq 1.2 \leq 1.3$; $3 = x \geq 1.3 \leq 1.4$; $4 = x \geq 1.4 \leq 1.5$.	38
Tabela 5	– Valores de IC50 (mM) obtidos pelo ensaio de MTT, após incubação das células normais ou cancerígenas com R-Carvona por 24 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média de três experimentos realizados em triplicada e foram obtidos usando curva de regressão não linear.	41
Tabela 6	– Valores de IC50 (mM) obtidos pelo ensaio de MTT, após incubação das células normais ou cancerígenas com as nanoemulsões (NE) por 24 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média, com erro médio em $\pm 3,4$, de três experimentos realizados em triplicada e foram obtidos usando curva de regressão não linear.	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
IC50	Concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo
L-929	Fibroblasto murino
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
R-CV	R-Carvona
SBF	Soro bovino fetal
4T1	Adenocarcinoma mamário
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Câncer	16
2.1.1	<i>Câncer de mama</i>	17
2.1.1.1	<i>Terapias convencionais do tratamento de câncer de mama</i>	18
2.2	Óleos essenciais	19
2.2.1	<i>Terpenos</i>	20
2.2.1.1	<i>Monoterpenos</i>	20
2.3	Nanobiotecnologia como sistema de entrega de drogas	21
2.3.1	<i>Nanoemulsões</i>	22
2.4	Citotoxicidade	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Desenvolvimento das nanoemulsões contendo R-(-)-Carvona	27
4.2	Caracterização físico-química das nanopartículas	27
4.2.1	<i>Determinação do tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão</i>	27
4.2.2	<i>Determinação da condutividade das nanoemulsões contendo carvona</i>	27
4.2.3	<i>Determinação do pH das nanoemulsões contendo carvona</i>	28
4.3	Obtenção da curva de calibração	28
4.4	Determinação da eficiência de encapsulação das nanoemulsões de carvona	28
4.5	Modelos biológicos experimentais <i>in vitro</i>	28
4.5.1	<i>Cultivo celular</i>	28
4.5.2	<i>Viabilidade celular</i>	30
4.5.2.1	<i>Redução do MTT</i>	30
4.5.3	<i>Ensaio de migração celular</i>	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1	Nanoemulsões contendo R-(-)-Carvona	33
5.2	Caracterização físico-química das nanopartículas	33

5.2.1	<i>Tamanho de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão</i>	33
5.2.2	<i>pH e Condutividade</i>	35
5.3	Curva de calibração	36
5.4	Modelos biológicos experimentais <i>in vitro</i>	37
5.4.1	<i>Avaliação do efeito citotóxico da R-Carvona livre</i>	37
5.4.2	<i>Avaliação do efeito citotóxico da R-Carvona nanoencapsulada</i>	41
5.4.3	<i>Ensaio de cicatrização de feridas</i>	48
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa, impulsionada por modificações no DNA, como alterações epigenéticas, mutações e rearranjos cromossômicos que resultam na ativação de genes promotores de crescimento, supressão de genes inibidores de crescimento e/ou alteração em genes de estabilidade ou de manutenção. Caracteriza-se por um distúrbio hiperproliferativo que envolve modificações celulares a nível morfológico, desregulação das vias de morte celular, potencial proliferativo ilimitado, invasão e metástase (IENGAR, 2018; PROVENZANO et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer continua sendo a principal causa de morte no mundo. As projeções são ainda mais preocupantes pois estimam que as mortes causadas por câncer devem subir para 17 milhões no ano de 2030 (HUCZYŃSKI, 2012; GAO et al., 2014; INCA, 2018).

O câncer de mama é um dos cânceres mais comuns e letais entre as mulheres no mundo, classificado como a segunda causa de mortes relacionadas ao câncer na estatística anual, perdendo apenas para o câncer de pulmão. Cerca de 1,3 milhões de mulheres o desenvolvem a cada ano (SARKAR et al., 2016; AGHAPOUR et al., 2018; BAI et al., 2018; MOO et al., 2018).

Após o tratamento, muitos pacientes ainda experimentam de deficiências no funcionamento físico e cognitivo, além da reincidência em poucos anos apresentando alta mortalidade a longo prazo. Nos últimos 15 anos, a mortalidade flutuou entre 41,3% e 49,5%, independentemente da radiação pós-mastectomia, mostrando que as terapias atuais combinam o tratamento com um alto grau de incerteza (BAI et al., 2018; CHANG et al., 2019).

Embora diversas modalidades de tratamento como a imunoterapia, fototerapia e terapia gênica estejam disponíveis, a cirurgia, radiação e/ou quimioterapia são as opções terapêuticas mais utilizada no tratamento da maioria dos cânceres. Mesmo muitos desses tratamentos sendo efetivos na remoção e no ataque as células malignas, essas intervenções afetam também células saudáveis, apresentando diversos efeitos colaterais que, muitas vezes, estão associados as formulações, devido à distribuição não específica, alta toxicidade, concentrações inadequadas de fármacos nos tumores ou células cancerígenas e desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos (DANTAS et al., 2014; GAO et al., 2014; AGHAPOUR et al., 2018).

Os medicamentos utilizados para o tratamento da maioria dos cânceres são aqueles que interferem nas vias de sinalização celular, incluindo sinalização de fatores de

crescimento, ciclo celular, metástase, angiogênese, apoptose, inflamação e resistência a múltiplos fármacos. Diversos estudos vêm sugerindo e demonstrando que componentes químicos presentes em plantas podem mediar ou modular diversos desses alvos terapêuticos (AGGARWAL et al., 2006; MA & WANG, 2009; KUTTAN et al., 2011).

A quimioprevenção do câncer por moléculas de origem natural, em especial as que estão presentes em alimentos vegetais e plantas medicinais, mostra-se promissora. Os produtos naturais têm sido utilizados em medicamentos há milhares de anos e vêm desempenhado papel importante como agentes quimioterápicos. Pesquisadores estão continuamente em busca de terapias alternativas que possam agir seletivamente em células tumorais com efeitos colaterais mínimos em tecidos normais (RAPHAEL & KUTTAN, 2003; FORMARIZ et al., 2005; KUTTAN et al., 2011; HUCZYŃSKI, 2012; GAO et al., 2014; AMALRAJ et al., 2017; AGHAPOUR et al., 2018).

Os terpenos são metabólicos secundários de origem vegetal formados a partir de unidades de isopreno com cinco carbonos e representam uma classe de produtos naturais onipresentes em nossa dieta e por isso são considerados relativamente não-tóxicos para os seres humanos. Essas moléculas podem atuar como antioxidantes, estimular o sistema imunológico, inibir ações hormonais e vias metabólicas associadas ao desenvolvimento do câncer. Vários fitoquímicos podem impossibilitar o desenvolvimento de tumores, enquanto fármacos livres (ZHENG & KENNEY & LAM, 1992; CRAIG, 1999; AKIHISA, YASUKAWA & TOKUDA, 2003; PADUCH et al., 2016).

A carvona é um monoterpreno naturalmente encontrado em muitos óleos essenciais, sendo mais abundante em óleos de sementes de *Carum carvi* e na *Mentha spicata*. É bastante explorada pela indústria de alimentos e aromas (HAYES, STAVANJA & LAWRENCE, 2006; DE CARVALHO & DA FONSECA, 2006; MORCIA et al., 2016). Em estudos recentes, a carvona causou indução de apoptose, inibição da migração e parada do ciclo celular em células tumorais apresentando pouca ou nenhuma toxicidade em células normais (PATEL & THAKKAR, 2014; MONTERO-VILLEGAS et al., 2018). Entretanto, pela característica de um óleo essencial, é volátil, apresenta baixa solubilidade em água e biocompatibilidade inadequada na forma de óleo nativo necessitando, portanto, de um transportador para atingir eficientemente as células cancerígenas (TUBTIMSRI et al., 2018).

A nanotecnologia tem sido utilizada para desenvolver sistemas de entrega de fármacos direcionados que podem carrear com segurança drogas terapêuticas melhorando a vetorização, absorção e cinética de liberação, podendo aumentar o tempo de ação do fármaco e como consequência favorecer o seu efeito clínico, aumentando a estabilidade do fármaco e

colaborando na diminuição dos efeitos colaterais. Além disso, os nanossistemas podem ter sua superfície alterada de modo a direcionar o nanocarreador especificamente para células cancerosas, com mecanismo de ação baseado nas moléculas expressas na superfície celular do tumor (SALTÃO & VEIGA, 2001; FORMARIZ et al., 2005; GAO et al., 2014; VIEIRA, 2016; GONG & CHEN, 2016; AGHAPOUR et al., 2018).

Dentre os sistemas de entrega, estão as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). Um nanocarreador de drogas possui um diâmetro compreendido entre 10nm a 1000nm (SCHAFFAZICK et al., 2003; VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009; SHAH, BHALODIA & SHELAT, 2010; GONG & CHEN, 2016; AGHAPOUR et al., 2018).

A indústria da nanotecnologia, em 2013, alcançou US\$1,6 trilhões, tendo a nanobiotecnologia como setor mais expressivo e este devendo ultrapassar a marca de US\$125 bilhões, em 2024, no mercado global, mostrando a tendência para a veiculação de produtos em escala nanométrica bem como o impacto econômico dessa tecnologia (DE MENEZES ALENCAR, BOCHNER & DIAS, 2014; RESEARCH & MARKETS, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial anticancerígeno *in vitro* de R-(-)-Carvona livre e nanoencapsulada sobre cultura de células de câncer de mama.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer caracteriza-se por um grande problema de saúde pública mundial. É a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento celular desordenado além da presença das características mostradas na **Figura 1** (DANTAS et al., 2014; REDDY, ODHAV & BHOOLA, 2003; INCA, 2019).

Figura 1 – Características em comum de células cancerosas.



Fonte: HANAHAN (2019, com adaptações).

Atribui-se carcinoma, quando é iniciado em tecidos epiteliais, ou sarcoma, caso sua origem seja em tecidos conjuntivos. O processo de transformação de uma célula saudável em uma célula cancerígena é chamado de carcinogênese e, geralmente, ocorre lentamente, onde uma célula cancerosa pode levar anos para tornar-se um tumor perceptível (INCA, 2019).

As origens das malignizações celulares são múltiplas, podendo ser provocada pela predisposição genética, dieta e fatores ambientais. A sua causa está relacionada à manutenção dos sinais de proliferação, desregulando assim o processo homeostático, garantidos em células

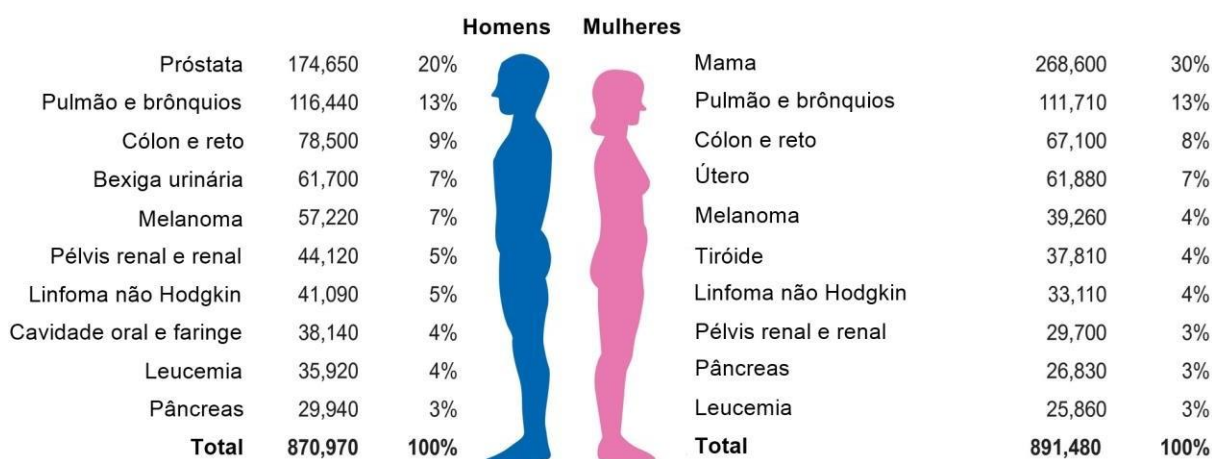
normais (REDDY, ODHAV & BHOOLA, 2003; HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; WANG, et al., 2012).

2.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais prevalente entre a população feminina americana, 70% das mortes ocorrem em mulheres de países de média e baixa renda, tendo a incidência de 115.000 casos por ano na América Latina. No Brasil há cerca de 50.000 novos casos por ano, onde é doença mais comum depois do câncer de pele não melanoma, apresentando o percentual de 29%. Na população masculina representa 1% dos casos totais da doença (LEE et al., 2012; BLUMEN, FITCH & POLKUS, 2016; BRAY et al., 2018; INCA, 2019).

Na **Figura 2**, podemos observar os cânceres que se espera diagnosticar em homens e mulheres para o ano de 2019. Próstata, pulmão e câncer colorretal representando 42% de todos os casos esperados em homens. Os três tipos mais comuns, para as mulheres, são câncer de mama, pulmão e colo e reto, representando 50% de todos os novos diagnósticos, onde, sozinho, o câncer de mama é responsável por 30% (SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2019).

Figura 2 – Incidência dos dez principais tipos de câncer estimados por sexo nos Estados Unidos, 2019.



Fonte: SIEGEL, MILLER & JEMAL (2019, com adaptações).

Este tipo de câncer pode se apresentar por massa axilar palpável, assimetria mamária, eritema cutâneo, inversão mamilar e secreção mamilar. Mais de 50% dos casos são diagnosticados por mamografia e apenas um terço por massa mamária palpável. Na histologia, o tipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo representando 62,5% dos casos,

em média, seguido por carcinoma lobular invasivo. O tipo luminal é o tipo molecular mais comum no Brasil (DILLON et al., 2014; MORROW et al., 2014; CAUGHRAN et al., 2018; SIMON et al., 2019).

A idade média para o diagnóstico em mulheres é de 54 anos, para os tipos mais comuns, apresentando uma taxa de sobrevida de aproximadamente 5 anos, para os casos detectados em estágio I (SIMON et al., 2019).

No Brasil, normalmente, há uma detecção tardia da doença, que reforçam as questões sobre o modelo de financiamento da oncologia no país, dificultando o acesso a novas tecnologias e até mesmo aos medicamentos demandando uma melhora necessária no suporte a esta doença (DUVA et al, 2019; MEDEIROS, THULER & BERGMANN, 2019).

2.1.1.1 Terapias convencionais do tratamento de câncer de mama

Há muitos avanços para o tratamento desta patologia, porém a eficácia do tratamento está diretamente relacionada a fase a qual o paciente se encontra. Para o câncer de mama o tratamento pode ser dividido em tratamento local e sistêmico. Nos estágios iniciais, recomenda-se a retirada apenas do tumor ou mastectomia parcial ou total com posterior tratamento complementar, podendo ser a radioterapia. No estágio III, para tumores maiores que 5cm, mas ainda localizados, a quimioterapia é normalmente empregada com posterior cirurgia. No quarto estágio, já em fase metastática é fundamental buscar o equilíbrio entre o controle da doença e a possibilidade da melhoria da qualidade de vida, uma vez que este estágio é responsável por quase 41.000 mortes por ano e em sua maioria grande parte dos cânceres encontrados neste estágio não apresentam possibilidade cirúrgica (MARIOTTO et al., 2017; MARTIN et al., 2017; INCA, 2019).

A recorrência do câncer nestes pacientes é um problema angustiante, ao experimentarem preocupações persistentes sobre o tratamento e a sobrevida. A maioria dos sobreviventes sofrem com os efeitos latentes ou a longo prazo referentes a forma de tratamento empregada. Os mais comuns são linfedema, fadiga, neuropatia, cardiotoxicidade, disfunção cognitiva e infertilidade, além de problemas de saúde mental. Isto dar-se devido aos quimioterápicos, que em sua maioria, agem tanto em células normais quanto tumorais causando uma toxicidade sistêmica e diversos efeitos adversos (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2004; GEGECHKORI, HAINES & LIN, 2017; LOGAN et al., 2019; STAŇKOVÁ et al., 2019; TAUBER et al., 2019).

Podemos encontrar diversas terapias alternativas para o tratamento do câncer que surgiram nos últimos anos, a imunoterapia e a terapia gênica mostram-se promissoras, porém a complexidade torna-se um fator limitante para sua aplicação. Há ainda a fototerapia, como tratamento alternativo, porém atualmente aplicada apenas para pacientes com câncer de pulmão (FERREIRA et al., 2018; ABBOTT & USTOYEV, 2019; KINOSHITA et al., 2019; MIRZA & KARIM, 2019).

Convencionalmente, as modalidades terapêuticas empregadas para o câncer de mama, são ineficazes para os estágios mais avançados da doença. Além disso, os efeitos indesejáveis são principalmente causados pela formulação e farmacocinética das drogas, dependendo de uma liberação controlada e alvo específica para uma abordagem mais segura e eficiente (FENG, 2004; PENG et al, 2008; DHANKHAR et al, 2010).

2.2 Óleos essenciais

O Brasil, considerado como um dos 17 países megadiversos do planeta, possui 25% da flora mundial. E esta riqueza é uma fonte de substâncias bioativas, podendo demonstrar uma ação terapêutica contra doenças, através da extração de óleos essenciais obtidos da flora nativa. Junto com esta diversidade o país apresenta amplo conhecimento acumulado pela população que faz uso dos recursos locais para tratamentos caseiros (MONTANARI & BOLZANI, 2001; CASTILHO, MURATA & PARDI, 2007; BARREIRO & BOLZANI, 2009; MAIA & ANDRADE, 2009; SCARANO, GUIMARÃES & DA SILVA 2012).

A utilização dos produtos naturais tem sido amplamente empregada e se mostrado capaz de controlar processo moleculares, podendo atuar na inibição da proliferação e nas vias de sinalização celular (NEERGHEEN, et al., 2010).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas estão relacionados a fatores ambientais oriundos de processos ecológicos, como defesa, interações com membros de mesma ou outras espécies do mesmo reino e até atração de polinizadores (KAUR, KAPOOR & KAUR, 2011; BODAS, et al., 2012).

Os óleos essenciais são explorados a mais de 3.000 anos pela humanidade. Caracterizam-se por líquidos voláteis possuindo aroma forte e característico, normalmente agradável. São amplamente utilizados na perfumaria e cosméticos, mostrando bastante significativa a sua atuação também na indústria alimentícia. Em geral sua composição é um equilíbrio entre diversos compostos os quais, em sua maioria, são monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados, sendo o primeiro responsável por 90% da constituição

química de um óleo essencial (KNOBLOCK et al., 2003; KUMAR, et al., 2008; BADAWY; ABDELGALEIL, 2014; RAVINDRA & KULKARNI, 2015; WORSFOLD et al, 2019).

Na indústria farmacêutica brasileira, podemos encontrar alguns óleos essenciais empregados como medicamentos, o Acheflan®, anti-inflamatório, oriundo da *Cordia verbenácea*, além do óleo do cravo (*Syzygium aromaticum*), amplamente utilizado nos tratamentos odontológicos como antisséptico (VICTORIA et al., 2012). Diversas atividades farmacológicas têm sido descritas como: antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (VANDEBROEK et al., 2004; WATTANAPITAYAKUL et al., 2005; KOCH, et al., 2008; SALAZAR et al., 2011; BOSTANCIOĞLU et al., 2012; DIAO et al., 2014; DO ROSÁRIO MARTINS et al., 2014).

2.2.1 Terpenos

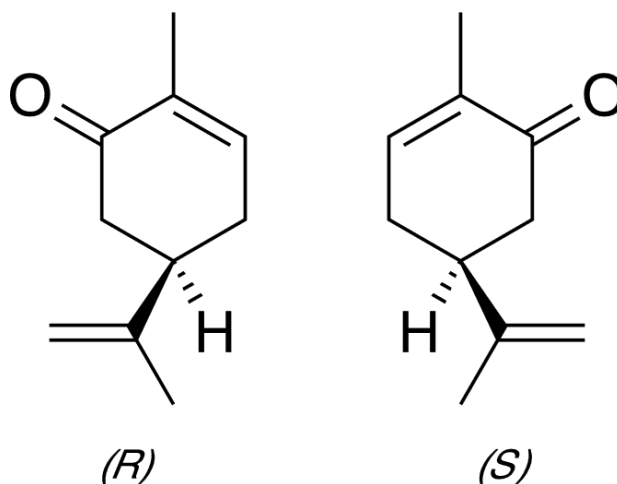
São constituintes majoritários dos óleos essenciais. Podem ser quimicamente definidos como alcenos naturais, por apresentar uma ligação dupla carbono-carbono sendo um hidrocarboneto insaturado. São constituídas por unidades básicas de isoprenos e normalmente contém de 10 a 30 átomos de carbono. Estes podem apresentar diferentes funções químicas, quando contém um oxigênio, tais como: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos. Estes compostos também podem ser produzidos por animais e micro-organismos, além das plantas (VIEGAS JÚNIOR, 2003; PADUCH et al., 2007; CORREIA et al., 2008; MCMURRY, 2011; DVORA & KOFFAS, 2013; LUTFI & ROQUE, 2014; DE MARTINO et al., 2015).

2.2.1.1 Carvona

É uma cetona terpenóide líquida e oleosa encontrada em diversos óleos essenciais. É o monoterpeno mais abundante em óleos de sementes de *Carum carvi* e na *Mentha spicata*. É bastante explorada pela indústria de alimentos e aromas, devido a sua acentuada volatilidade conferindo importância para os produtos naturais (KNOBLOCK et al., 2003; HAYES, STAVANJA & LAWRENCE, 2006; DE CARVALHO & DA FONSECA, 2006; FARKAS & MOHÁCSI-FARKAS, 2014; MORCIA et al., 2016). Em estudos recentes, a carvona causou indução de apoptose, inibição da migração e parada do ciclo celular em células tumorais apresentando pouca ou nenhuma toxicidade em células normais (PATEL & THAKKAR, 2014; MONTERO-VILLEGAS et al., 2018). Entretanto, pela característica de um óleo

essencial, é volátil, apresenta baixa solubilidade em água e biocompatibilidade inadequada na forma de óleo nativo necessitando, portanto, de um transportador para atingir eficientemente as células cancerígenas (TUBTIMSRI et al., 2018).

Figura 3 – Estrutura química da R- e S- Carvona



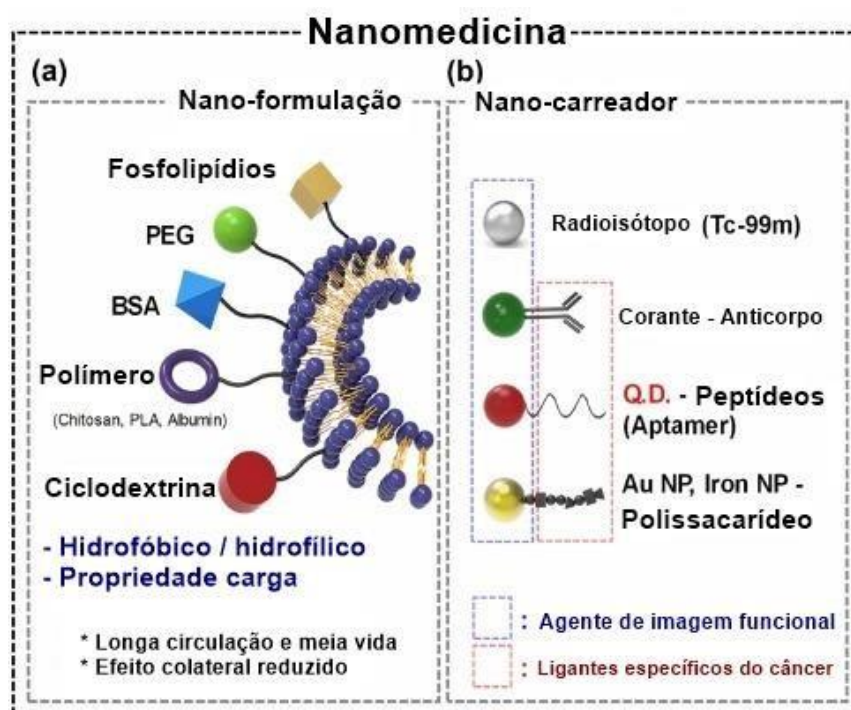
Adicionalmente, apesar da quiralidade desta molécula influenciar em diferentes desencadeamentos de respostas nos sistemas biológicos, evidências, principalmente anticâncer de mama por meio de veiculação nanoestruturada, não existem até o presente momento. Teve-se como opção de escolha para o desenvolvimento do trabalho a R-Carvona já avaliada em estudos anteriores onde mostra-se não tóxicas em linhagens normais (GONÇALVES, 2008).

2.3 Nanoemulsões como sistema de entrega de drogas

A nanobiotecnologia tem sido utilizada para desenvolver sistemas de entrega de fármacos direcionados que podem carrear com segurança drogas terapêuticas melhorando a vetorização, absorção e cinética de liberação, podendo aumentar o tempo de ação do fármaco e como consequência favorecer o seu efeito clínico, aumentando a estabilidade do fármaco e colaborando na diminuição dos efeitos colaterais. Além disso, as nanopartículas podem ter sua superfície alterada, como mostrado na **Figura 4**, de modo a direcionar o nanocarreador especificamente para células cancerosas, com mecanismo de ação baseado nas moléculas expressas na superfície celular do tumor (SALTÃO & VEIGA, 2001; FORMARIZ et al., 2005; GAO et al., 2014; VIEIRA, 2016; GONG & CHEN, 2016; AGHAPOUR et al., 2018; MIRZA & KARIM, 2019).

Dentre os sistemas de entrega, estão as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas). Um nanocarreador de drogas possui um diâmetro compreendido entre 10nm a 1000nm. As nanoemulsões são emulsões de tamanho submicrônico e são os sistemas nanoparticulados mais utilizados devido sua simplicidade metodológica e baixo custo visando a entrega sistêmica de agentes biologicamente ativos (SCHAFFAZICK et al., 2003; VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009; SHAH, BHALODIA & SHELAT, 2010; GONG & CHEN, 2016; AGHAPOUR et al., 2018).

Figura 4 – Representação de modificação superficial de nanopartículas (a) e conjugação de ligantes específicos para câncer (b).



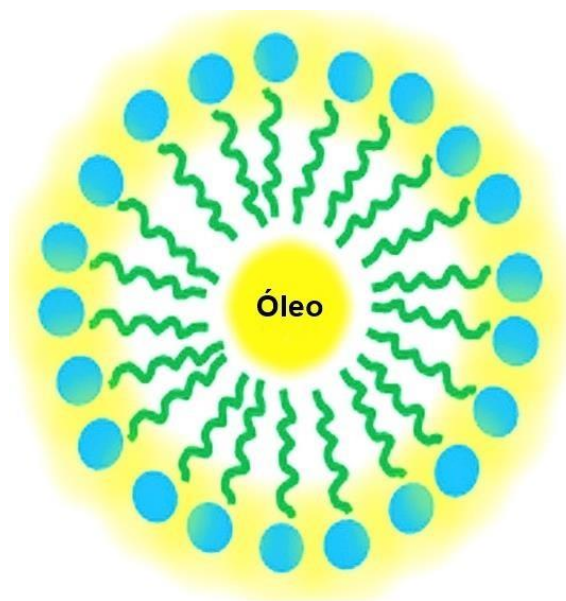
Fonte: PAVITRA et al. (2019, com adaptações)

2.3.1 Nanoemulsões

Consistem em sistemas heterogêneos, isotrópico, termodinamicamente estável no qual dois líquidos imiscíveis (água e óleo) são misturados para formar uma fase única estabilizada por meio de surfactantes, como mostra a **Figura 5**. Possuem partículas de tamanho variável de 20-200 nm. As nanoemulsões (NEs) mostram-se como uma grande promessa para o futuro de cosméticos, diagnósticos, terapias medicamentosas e biotecnologias. São consideradas como sistemas de administração de drogas que se concentram na regulação da dinâmica in vivo (absorção, distribuição, biodisponibilidade, metabolismo) prevendo a melhora na

segurança da entrega de fármacos e eficácia. Atualmente o uso de NEs em medicamentos comerciais é limitado, porém avanços vêm sendo notados neste campo, principalmente como nanocarreadores objetivando a entrega de fármacos com baixa solubilidade em água (SHAH, BHALODIA & SHELAT, 2010; HÖRMANN & ZIMMER, 2016).

Figura 5 – Representação de uma nanoemulsão óleo/água.



Fonte: HARWANSI, DESHMUKH & RAHMAN (2019, com adaptações)

Superando a baixa solubilidade em água, ZHAO (2008), demonstrou a capacidade de nanoestruturação da Queliensisina A, um bioativo natural direcionado para o tratamento anticâncer, aplicando a metodologia onde foi utilizado triglicerídeos de cadeia média, os quais foram dissolvidos o ativo, além de óleo de soja e vitamina E. Quando testada a formulação apresentou uma IC50 no mínimo três vezes mais potente quando comparada com o fármaco livre.

Estudos demonstram, também, uma formulação alternativa de Docetaxel possuindo a mesma eficiência anticancerígena com menor toxicidade que a formulação padrão, onde utiliza-se etanol e Tween 80. As nanoemulsões utilizadas em teste *in vivo* em ratos a fim de investigar o acúmulo do corante no cérebro, mostrou que devido à flexibilidade das gotículas de óleo, quando comparado com outros nanotransportadores, conseguiram mais eficientemente superar a barreira sanguínea cerebral. Ainda, visando a necessidade frequente de colesterol para construção de membranas celulares, devido a velocidade de crescimento de células tumorais, demonstrou-se uma absorção suficiente de 1,12-dicarba-closo-

dodecaborano-1-carboxilato de colesteril para a terapia do câncer com o mínimo de absorção em células de glioma de rato (LI et al., 2011; WEN et al., 2011; SHAWER et al., 2002).

O que mostra a versatilidade de seu uso, maleabilidade e compatibilidade, podendo ser facilmente direcionada para o tratamento de diversos tipos de câncer, como o câncer de mama.

Figura 6 – Características específicas das nanoemulsões como sistema de administração de drogas.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

2.4 Citotoxicidade

Múltiplos ensaios que envolvem a biologia celular e entre outros aspectos a avaliação da viabilidade celular devem ser essenciais. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* vêm crescendo ao longo dos anos como procedimento de triagem para avaliar agentes terapêuticos, incluindo drogas anticâncer, reduzindo a experimentação em animais e possibilitando uma avaliação ampla em um curto tempo (CINGI, et al., 1991; DE SOUZA, 2019; ELISABETSKY & SHANLEY, 1994; GLOECKNER, JONULEIT & LEMKE, 2001; SUGGITT & BIBBY, 2005).

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, possui um programa de triagem capaz de testar 10.000 novas substâncias por ano. Os testes são realizados em duas etapas, onde na primeira é realizado um “screening” que testa a substância em 60 linhagens celulares distintas em uma única concentração. Na segunda etapa seleciona as drogas com IC50 significativos e é realizado uma avaliação com cinco concentrações diferentes do mesmo

composto. Através deste instituto surgiram algumas importantes drogas com efeito anticancerígeno que são atualmente utilizadas na terapia contra esta doença, tais como: paclitaxel (*Taxus brevifolia* Nutt.), camptotecina (*Camptotheca acuminata* Decne) e podofilotoxina/etoposídeo (semi-sintético obtido da *Podophyllum peltatum* L.) (DE SOUZA, 2019; YOUNES, VARELLA & SUFFREDINI, 2007).

Vale atentar-se para o fato de que nem sempre os efeitos tóxicos causam morte celular imediata, as células podem sofrer alterações metabólicas e/ou modificações no ciclo celular sem que seja percebido redução da viabilidade independente de tempo (FRESHNEY, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação do potencial anticancerígeno *in vitro* da R-(-)-Carvona enquanto fármaco livre e nanoencapsulado sobre cultura de células de câncer de mama

3.1.1 Objetivos específicos

- Produzir nanoemulsões contendo 5 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; 37,5 mg/mL e 50 mg/mL de R-CV;
- Caracterizar o sistema nanotecnológico quanto a: tamanho de partícula; potencial Zeta e eficiência de encapsulação;
- Verificar a toxicidade do veículo;
- Avaliar o potencial citotóxico da R-CV livre e nanoencapsulada nas linhagens L929 e 4T1;
- Determinar o valor da IC50;
- Verificar a migração celular sob influência da R-CV livre e nanoencapsulada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenvolvimento das nanoemulsões contendo R-CV

A preparação das nanoemulsões foi realizada pelo o método de alta energia, utilizando a emulsificação ultrassônica. A fase oleosa foi constituída por diferentes concentrações de R-(-)-Carvona (Sigma-Aldrich, USA) e miglyol 812 totalizando 5% (0,5g) da formulação, 0,12g de Span80 e 0,12g de Tween80 e a fase aquosa foi constituída por 9,3g de água ultrapura. As emulsões foram realizadas no Sonicador (Ultrassônico Ultronique ; Mod : QR500) em 4 ciclos de 1 minuto, intercalados por 1 minuto no banho de ultrassom (Eco-Sonics). As formulações foram obtidas nas concentrações de 5 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 37,5 mg/mL e 50 mg/mL, além da branca onde não continha o fármaco, no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa-PB.

4.2 Caracterização físico-química das gotículas

4.2.1 Determinação do tamanho de gotículas, potencial zeta e índice de polidispersão

A determinação do tamanho das gotículas, distribuição e índice de polidispersão foram obtidas no equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern), do Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, utilizando a técnica de espalhamento de luz dinâmica. As emulsões foram diluídas em água deionizada (1:1000 v/v). A análise foi realizada em triplicata possuindo o ângulo de dispersão de 90° a 25°C. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

O potencial zeta foi avaliado visando responder a probabilidade de aglutinação a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas com KCL 0,1mM e adicionadas em células eletroforética onde um potencial de $\pm$ 150mV foi aplicado. Todas as medições foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão de leituras em triplicata.

4.2.2 Determinação da condutividade das nanoemulsões contendo R-CV

Foi determinada à temperatura ambiente ($25\pm 3^\circ\text{C}$) utilizando-se condutivímetro (Gehaka, CG1800) inserindo o eletrodo diretamente nas amostras. O teste foi realizado em triplicata.

4.2.3 Determinação do pH das nanoemulsões contendo R-CV

Foi determinada à temperatura ambiente ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$) utilizando-se o phmetro (QUIMIS, Q400AS) inserindo o eletrodo diretamente nas amostras. O teste foi realizado em triplicata.

4.3 Obtenção da curva de calibração

Uma solução estoque contendo 220 $\mu\text{g/mL}$ de R-CV em metanol foi preparada e a partir desta, diferentes diluições foram realizadas, nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$; 2 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific ; Mod : Genesys) (LSVM-UEPB), no comprimento de onda 254 nm (valor obtido por varredura). A equação da curva e o valor do r^2 foram obtidos utilizando o software Microsoft Excel 2016®.

4.4 Determinação da eficiência de encapsulação das nanoemulsões de R-CV

A quantidade de R-CV incorporada nas nanoemulsões foi determinada utilizando-se a equação da reta da curva de calibração, após a leituras das diferentes formulações em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific; Mod.: Genesys) (LSVM-UEPB), no comprimento de onda 254 nm, diluídas em metanol.

4.5 Modelos biológicos experimentais *in vitro*

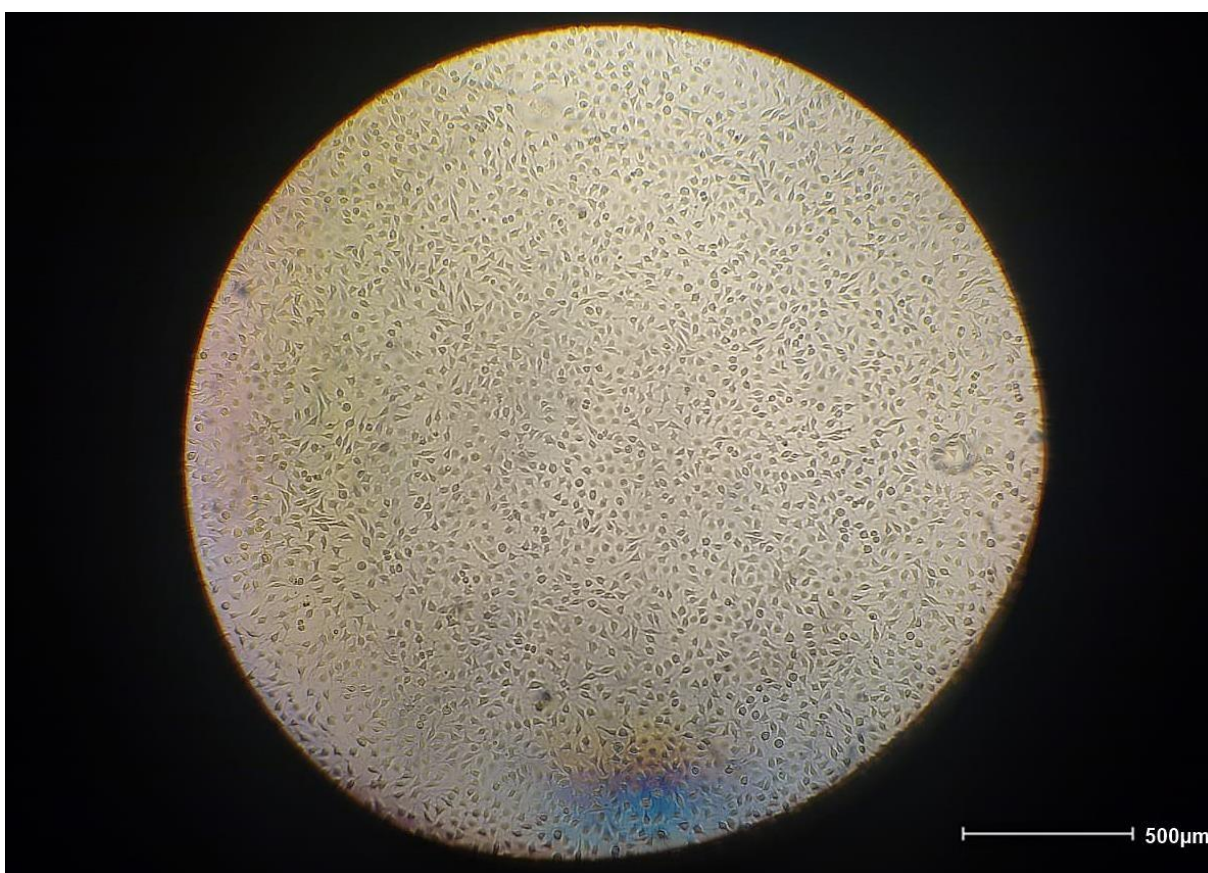
4.5.1 Cultivo celular

Foram utilizadas as linhagens L929, fibroblasto normal da espécie *Mus musculus*, do Banco de Células do Rio de Janeiro (código: 0188) e a linhagem 4T1, glândula mamária da espécie *Mus musculus*, esta linhagem é um modelo animal para o câncer de mama humano em estágio IV e foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (código: 0022). Utilizou-se Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - HiMedia™) com adição de 1,5g de bicarbonato de sódio (Synth), 4,5g de glicose d-anidra (Neon), 0,5846g de l-glutamina (Synth), 0,11004g de piruvato para a linhagem de fibroblasto e o Meio Essencial Mínimo (MEM - HiMedia™) com adição de 2,2g de bicarbonato de sódio (Synth) para a linhagem de mama. Os meios foram suplementados com soro bovino fetal (10%, SBF - Cripton) e

acrescido 1% de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina – LAC. Ref. BR30110-01) o cultivo realizado em frascos estéreis (25cm² - KASVI) mantendo em estufa de células a uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ e 37°C. O crescimento celular foi monitorado, diariamente, em microscópio óptico invertido (TAIMIN, XS201, BR). A troca do meio de cultura foi efetuada a cada dois dias realizando subculturas ou armazenamento após atingirem 90% de confluência. Cultivo realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

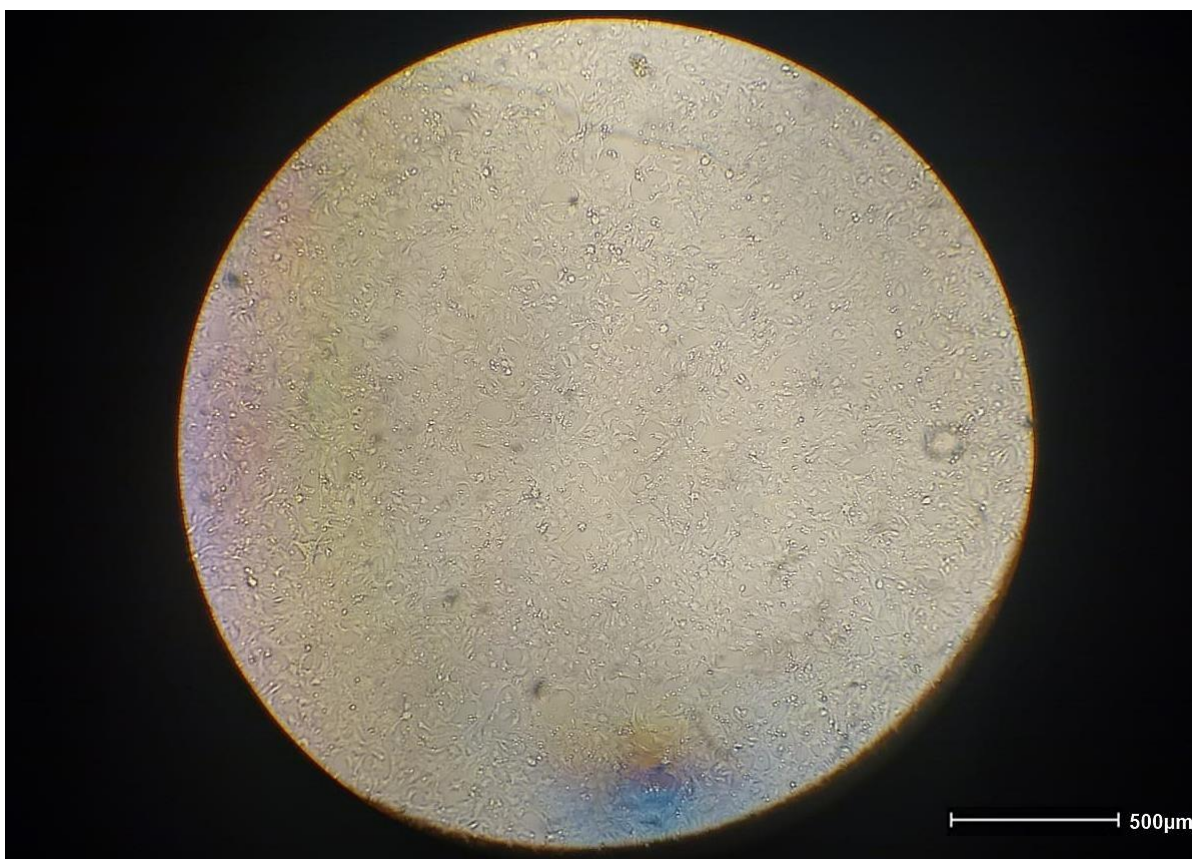
Todos os procedimentos para o cultivo celular foram executados em capela de fluxo laminar (PACHANE, BR) seguindo os protocolos para assegurar a ausência de contaminação para as culturas e materiais. Antes da execução dos experimentos, as células foram contadas utilizando um hemocitômetro corando-as com o reagente Azul de Tripán (1% em PBS) o qual penetra nas células cuja membrana encontra-se danificada corando de azul as células inviáveis. Os experimentos foram realizados quando as células, em análise, atingiram uma viabilidade superior a 95%.

Figura 7 – Microfotografia da linhagem L929, em microscópio óptico invertido com distância focal de 35mm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Figura 8 – Microfotografia da linhagem 4T1, em microscópio óptico invertido com distância focal de 35mm.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

4.5.2 Viabilidade celular

4.5.2.1 Redução do MTT

O MTT (brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]) é um ensaio colorimétrico utilizado para mensurar de forma indireta a citotoxicidade, a proliferação ou viabilidade celular. O MTT permite avaliar a capacidade metabólica das células que conferem a conversão do sal de tetrazólio, amarelo e solúvel em água, em cristais de formazan, púrpuras e insolúveis em água, cuja quantidade é mensurada por absorbância em leitor de microplacas (BIOTEK; El800), no comprimento de onda de 570 nm, mensurando assim a viabilidade celular. Esta reação de redução é intermediada pelo produto das desidrogenases mitocondriais (NADH e NADPH) e por algumas enzimas lisossomais. O valor da absorbância do formazan guarda proporção com o número de células viáveis. Algumas adaptações foram realizadas devido a natureza volátil dos compostos testados enquanto fármacos livres.

Metodologia de experimentação

Utilizou-se uma adaptação do método de Monsmann (1983), em que, uma concentração de 3×10^5 , as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, utilizando-se o meio de cultura conforme a especificidade de cada célula. As substâncias livres e nanoencapsuladas foram adicionadas em concentrações de 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, 5mM e 10mM. Utilizamos 200µl de célula em meio por poço. Ainda, foram testados em placa o controle negativo, sendo apenas o veículo, o controle positivo, 5-fluororacil e o branco, sendo composto apenas pelo solvente. Após a adição do tratamento, as células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 24h ou 72h. Posteriormente retirou-se 110µl do sobrenadante com adição subsequente de 10µl de MTT. Após decorrido 3 horas e meia, foi adicionado 100µl de SDS para solubilizar os cristais formados, onde manteve-se sob agitação *overnight*. Os dados foram normalizados em relação ao grupo não tratado (controle – apenas o meio) e os valores foram expressos em porcentagem da absorbância, após subtração do valor referente ao branco.

Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de bonferrone no software GraphPad Prism 5, sendo considerado significativo quando houvesse diferença inferior a $p < 0,05$.

4.5.3 Ensaio de cicatrização de feridas

Este ensaio é utilizado para estudar a migração direcional de células *in vitro*. Por este método podemos observar a migração celular durante o processo de cicatrização de feridas *in vivo*. Após o cultivo celular em placas de 6 poços (KASVI) e com o estabelecimento de 100% de confluência foi realizado duas ranhuras verticais paralelas na monocamada celular (LECOMTE et al., 2011; FUJISAWA et al., 2012; POULIOT et al., 2013). As imagens foram obtidas pelo microscópio invertido (ZEISS; HAL100), nos tempos de 00h, 24h e 72h durante o processo de migração celular. As imagens foram comparadas a fim de quantificar a taxa de migração celular sendo observado também a interação célula-matriz e célula-célula.

Metodologia de experimentação

As células foram plaqueadas em uma concentração de 10^6 por poço em placas de 6 poços utilizando-se o meio de cultura conforme a especificidade de cada célula, aguardando o tempo de aderência após tripsinização (24h). Antes da adição do tratamento foram realizadas as ranhuras verticais, com a ponta de uma ponteira de 10µL, rompendo a monocamada celular

permitindo a visualização macroscópica de uma ranhura, logo após retirou-se todo o meio e o poço foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS). As substâncias livres ou nanoencapsuladas, solubilizadas em meio correspondente foram suplementadas com 1% de SBF para suprir as necessidades de suplementação sem que houvesse proliferação celular, foram adicionadas, em volume final de 2mL, em 2 concentrações sendo 0,625mM e 1,25mM, concentrações abaixo do IC50, para que pudesse ser observado migração e não morte celular. Utilizou-se a ausência de tratamento como controle padrão, onde as células foram mantidas nas condições de cultivo. Após a adição do tratamento, as células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. A taxa de migração celular foi aferida por fotografias obtidas pelo microscópio invertido. Os dados foram quantificados no programa analisador de imagens ImageJ[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Nanoemulsões contendo R-(-)-Carvona

As nanoemulsões foram produzidas com sucesso de acordo com a metodologia descrita, onde foram obtidos 10mL da formulação final que continha um aspecto leitoso e de cor branca em todas as formulações.

Figura 9 – Nanoemulsões contendo 5 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; 37,5 mg/mL e 50 mg/mL de R-Carvona.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Na **figura 9** podemos observar uma característica clássica de sistema nanoparticulados, estes sistemas apresentam uma colocação branca e/ou transparente, homogênea a olho nú (SHAH, BHALODIA & SHELAT, 2010).

5.2 Caracterização físico-química das gotículas

5.2.1 Tamanho de gotícula, potencial zeta e índice de polidispersão

O tamanho dos sistemas nanoparticulados tornam-se importantes de acordo com o direcionamento selecionado para a sua aplicação, os menores vasos do corpo humano possuem um tamanho variando entre 5 e 10µm, a utilização de um sistema de vetorização intravenoso deve-se levar em consideração esta característica, uma vez que este vetor irá interagir não só com o alvo específico, mas também com outras moléculas, principalmente do sistema imune.

Tabela 1 - Caracterização do sistema nanoparticulado $\pm$ desvio padrão

Quantidade de fármaco (mg/mL)	Tamanho (d.nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de Polidispersão
Sem bioativo (Veículo)	143,1 $\pm$ 0,68	-29 $\pm$ 0,71	0,178
5	149 $\pm$ 102,8	-32,6 $\pm$ 5,75	0,209
12,5	183,8 $\pm$ 80,68	-35,2 $\pm$ 3,87	0,164
25	133,5 $\pm$ 45,47	-35,8 $\pm$ 7,05	0,074
37,5	182,4 $\pm$ 120	-43,2 $\pm$ 7,51	0,237
50	134,2 $\pm$ 67,65	-42,6 $\pm$ 8,54	0,183

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

A produção de nanossistemas com tamanhos abaixo de 200nm fez-se possível devido a técnica empregada, onde as moléculas de óleo se dispersaram mais formando nanoemulsões de aglomerados lipofílicos menores. Podemos observar também que não há uma relação entre a quantidade do óleo encapsulado com o tamanho de partícula, diretamente.

O potencial zeta refere-se ao potencial de superfície presente nas gotículas de nanoemulsões, sendo medido pela diferença com o potencial presente no meio, podendo ser utilizado água ou uma solução de KCL para o estabelecimento de seu valor. Este potencial pode ser influenciado por mudanças na interface com o meio dispersante variando assim de acordo com a forma administração (SCHAFFAZICK et al. 2003).

Estes resultados demonstram-se bastante importantes devido ao alto valor do potencial zeta, indicando que as gotículas dos nanossistemas possuem uma forte repulsão, dessa forma apresentando pouca tendência a aglutinação, característica bastante comum em nanoemulsões. Onde observamos que as forças de repulsão são suficientes para manter a estabilidade das emulsões impedindo sua coalescência (ROLAND et al., 2003).

A presença dos valores negativos neste potencial pode ser devido a presença do tensoativo não iônico utilizado, resultantes da adsorção de íons hidroxilas na interface óleo/água oriundos das ligações de hidrogênio da água interagindo com os agrupamentos químicos presentes no Tween80 (LIU et al., 2006).

Na **Tabela 1** podemos observar características de tamanho, potencial zeta e o índice de polidispersão das suspensões coloidais preparadas na presença ou ausência do bioativo com quantidades distintas. O diâmetro médio das nanoemulsões variou entre 133nm a 183nm, não relacionando-se com a quantidade de composto utilizado. Observando o índice de polidispersão, que nos informa sobre a homogeneidade na distribuição dos tamanhos, foi

inferior a 0,3 para todas as concentrações testadas, indicando a formação de sistemas monodispersos (NEMEN & LEMOS-SENNA, 2011).

5.2.2 pH e Condutividade

A obtenção dos valores de pH são fundamentais para o acompanhamento da estabilidade dos sistemas nanoparticulados, uma vez que as alterações críticas neste parâmetro podem indicar a presença de reações químicas, que por sua vez, iriam interferir e afetar a qualidade do produto final. Da mesma forma a condutividade elétrica mostra-se importante, fornecendo informações sobre a passagem de corrente elétrica, presente no sistema, sendo assim considerando, também, um indicativo para a avaliação da estabilidade dos nanossistemas (ANVISA, 2004; MASMOUDI et al., 2005; BERNARDI et al., 2011).

Tabela 2 – Valores de condutividade para as formulações contendo R-Carvona $\pm$ erro padrão

Quantidade de fármaco (mg/mL)	5	12,5	25	37,5	50
$\mu\text{S/cm}$	$0,78 \pm 0,003$	$0,74 \pm 0,003$	$0,70 \pm 0,005$	$0,76 \pm 0,003$	$0,84 \pm 0,000$

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

Tabela 3 – Valores de pH para as formulações contendo R-Carvona $\pm$ erro padrão

Quantidade de fármaco (mg/mL)	5	12,5	25	37,5	50
pH	$5,54 \pm 0,003$	$5,04 \pm 0,002$	$4,94 \pm 0,003$	$5,07 \pm 0,012$	$5,43 \pm 0,005$

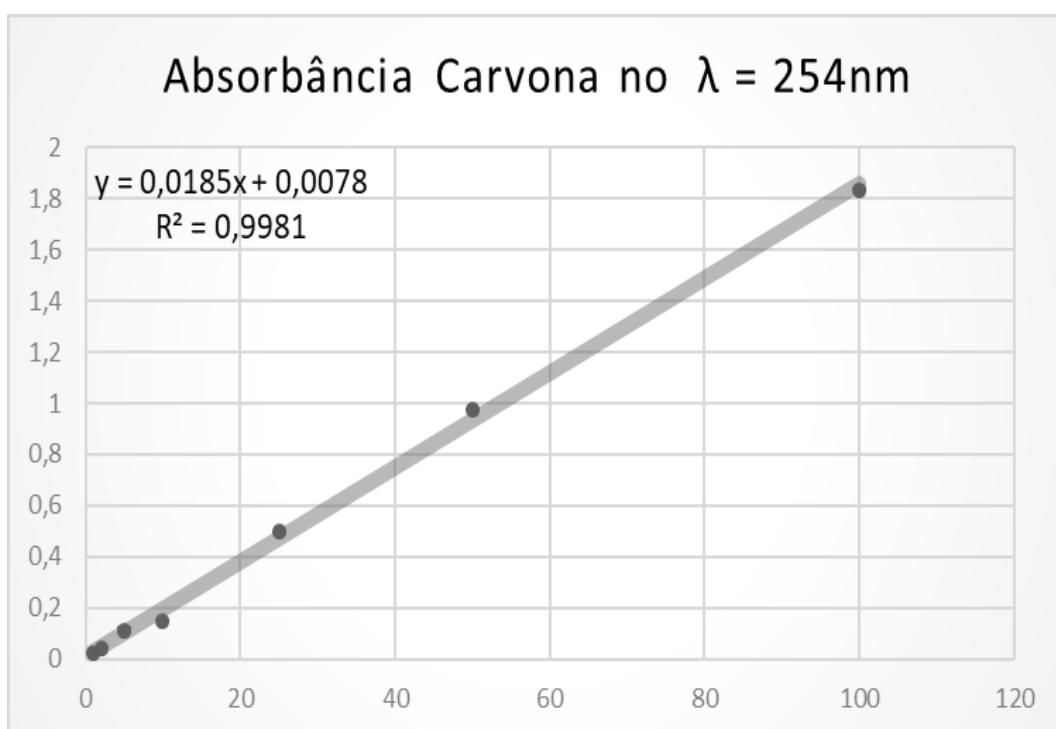
Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

Informamos aqui estes valores referentes as leituras no primeiro dia de formulação. Com homogeneidade nos resultados. Onde, posteriormente pode ser passível de comparação, tanto com emulsões futuras quanto com valores referidos em literatura, a fim de produzir informações para uma melhor caracterização de nanoemulsões, uma vez que é provável a ocorrência de hidrólise nos componentes presentes, principalmente, devido à natureza de óleo essencial, como demonstrado em estudos anteriores (MORAIS, 2006; SANTOS, 2006).

5.3 Curva de calibração

Foi realizada a curva de calibração objetivando a obtenção da equação do gráfico, onde, por meio deste, seria determinado os valores referentes a eficiência de encapsulação, buscando otimizar a metodologia de formulação e a concentração ideal para obter melhor encapsulamento. Os resultados mostraram uma eficiência superior a 93% para todas as concentrações testadas, comprovando a alta encapsulação do composto pelo sistema nanoparticulado no método empregado.

Figura 10 – Curva de calibração da R-Carvona, onde o eixo X representa a concentração das diluições e o eixo y o valor de absorbância, $\pm$ desvio padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

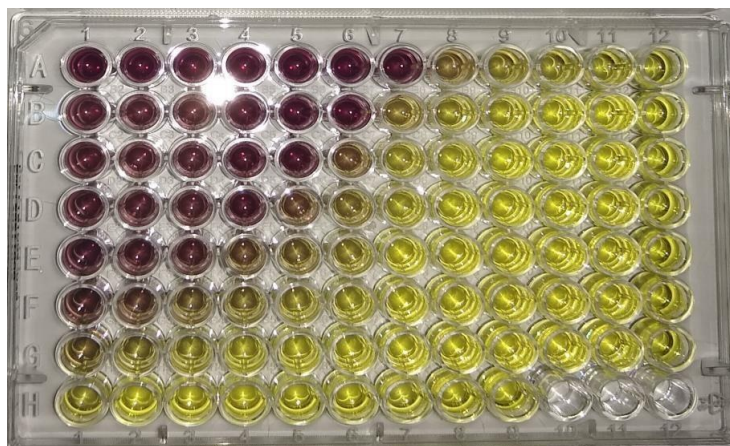
Na indústria, é observada uma dificuldade associada a inclusão de princípios ativos lipofílicos em matrizes alimentares, sendo um dos principais problemas enfrentados pelos fabricantes relativos ao desenvolvimento de alimentos. A veiculação de algumas moléculas testadas, em literatura, com esta finalidade mostrou-se promissora. Utiliza-se a eficiência de encapsulação como um padrão de qualidade para estes nanossistemas (FARHANG, 2007; WEISS et al., 2008; TRIPLETT & RATHAMN, 2009).

5.4 Modelos biológicos experimentais *in vitro*

5.4.1 Avaliação do efeito citotóxico da *R*-Carvona livre

A característica já conhecida de volatilidade dos monoterpenos dificultou a execução das experimentações *in vitro*. Além de características intrínsecas, como a baixa solubilidade em água e biocompatibilidade inadequada enquanto óleo (TUBTIMSRI et al., 2018). Podemos observar na figura abaixo o padrão de volatilidade dependendo da concentração a qual foi administrada como tratamento em cada poço, “contaminando” assim os poços adjacentes de modo a formar um padrão diagonal inviabilizando as células dos poços vizinhos. Tornando inviável a realização de um experimento em triplicata para mais de uma concentração em mesma placa.

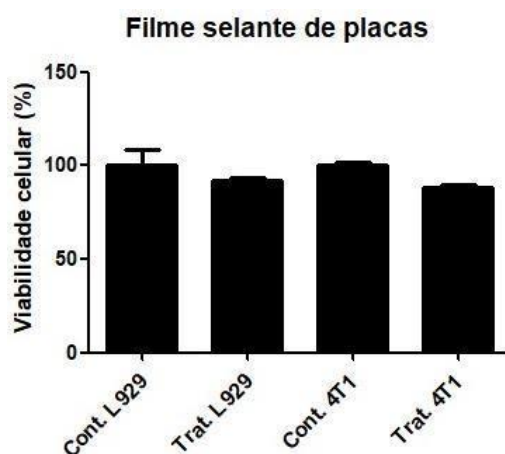
Figura 11 – Foto de uma placa de 96 poços (KASVI) após ensaio de MTT.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

A fim de minimizar este efeito, utilizamos um filme selante de placas para manter os poços selados durante o desenvolvimento dos experimentos, uma modificação no modelo padrão proposto por Mosmann, 1983. Objetivando avaliar a influência do filme selante, foi avaliado a viabilidade das células na presença e ausência do selador de placas para observar se haveria redução significativa da viabilidade celular, uma vez que a disponibilização de CO₂ e umidade, estabelecidos como padrões, pudessem sofrer alterações.

Figura 12 - Efeito da adição do filme selante de placas na viabilidade em células L929 e 4T1 $\pm$ erro padrão em 72h. Dados de um experimento, realizado em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



Observa-se que não houve redução significativa na viabilidade celular pela presença do selador de placas, onde, pela conclusão dos resultados, foi utilizada na realização dos testes subsequentes.

É notório uma redução, não significativa, nos valores, quando comparados com o controle, utilizamos então a ordenação não métrica para verificar a aparição destes valores, muitas vezes tidos como *outliers* estatísticos. A ordenação faz uso do ‘rank’ das distâncias para construir a distância em um ensaio utilizando placas 96 poços, podemos observar o “efeito de borda” que pode ser oriundo do gradiente termodinâmico em incubação, onde observamos que há uma variação entre os resultados não provenientes da técnica empregada.

Tabela 4 – Ordenação não métrica de dados brutos de absorbância em 570nm em células 4T1 em 72h. Realizado em triplicata onde 0 = $x \leq 1$; 1 = $x \geq 1 \leq 1.2$; 2 = $x \geq 1.2 \leq 1.3$; 3 = $x \geq 1.3 \leq 1.4$; 4 = $x \geq 1.4 \leq 1.5$.

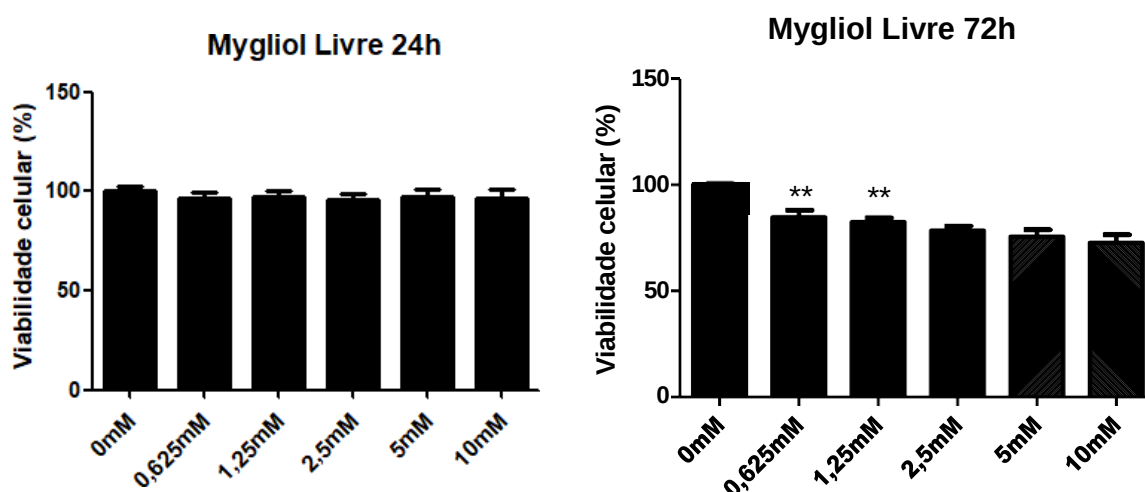
4T1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4
B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3
C	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
D	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
H	4	1	1	0	0	0						B

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

Os ésteres de glicerol purificados com cadeia de ácidos graxos, são amplamente explorados, tanto pela indústria farmacêutica quanto pela indústria de cosméticos. Os óleos de origem

vegetais são, normalmente, estáveis, de odor agradável e cor clara. O Miglyol ® 812 atua como um ingrediente ativo ou carreador inerte de viscosidade relativamente baixa quando comparada com outros óleos vegetais, bastante utilizado com o dispersante de fármaco. Embora diversos estudos tenham sido feitos utilizando o mesmo para fins de veiculação, testamos a viabilidade celular na presença deste composto em diferentes concentrações para assegurarmos de que a possível toxicidade não era advinda dele (SHESKEY et al., 2006; SASOL, 2009).

Figura 13 - Efeito citotóxico dos compostos livres em células normais (L929) $\pm$ erro padrão em 24h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



Onde, observamos que após 24h de tratamento não houve nenhuma redução significativa nos valores de viabilidade celular, para nenhuma das concentrações testadas, demonstrando que a toxicidade oriunda nos resultados posteriores se refere a ação do princípio ativo e não o óleo principal o qual o composto encontrou-se emulsificado.

Percebemos ainda que mesmo com a presença de diferença significativa, após o tratamento em 72h, o limiar de IC₅₀ não é mensurável, mesmo apresentando uma redução significativa que pode ser atribuída a sua característica oleosa e não compatibilidade biológica enquanto óleo nativo.

Posteriormente, avaliamos o efeito citotóxico da R-CV livre empregando linhagens cancerígenas e não cancerígenas, utilizando-se do ensaio de redução do MTT, que visa avaliar a atividade metabólica inferindo, assim, a viabilidade celular.

Figura 14 - Efeito citotóxico da R-Carvona livre em células L929 $\pm$ erro padrão em 24h e 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.

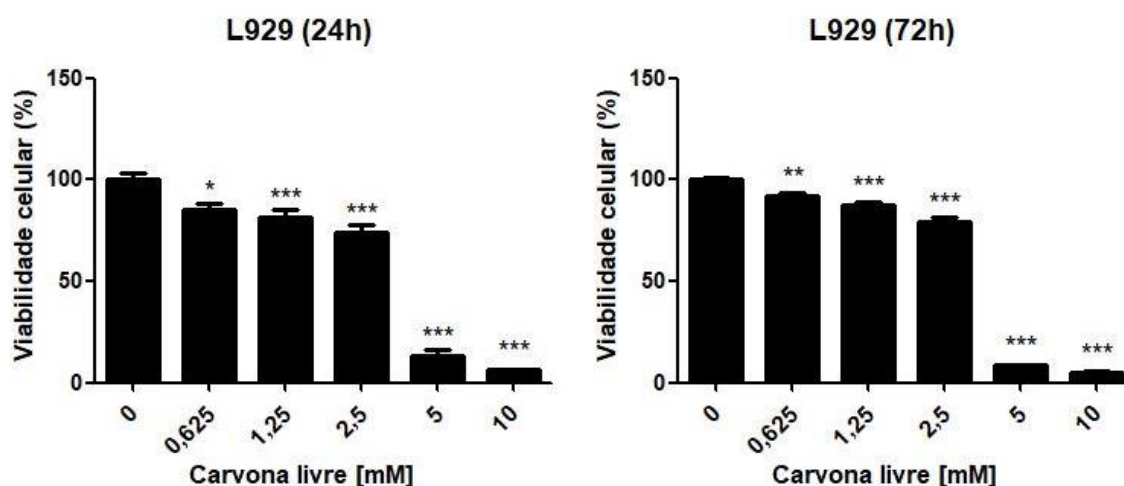
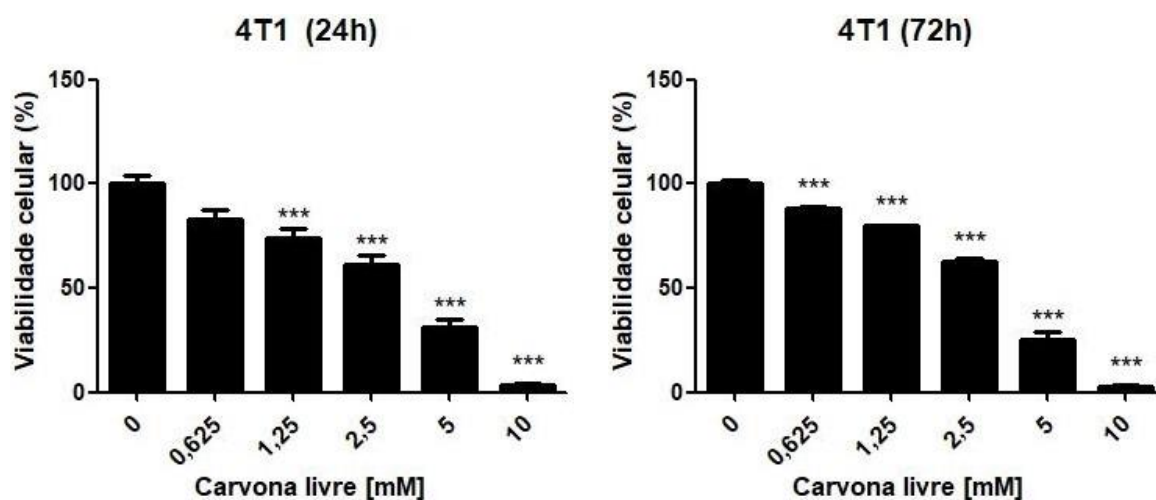


Figura 15 - Efeito citotóxico da R-Carvona livre em células L929 $\pm$ erro padrão em 24h e 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle.



A princípio, avaliamos o efeito citotóxico da R-CV livre na linhagem não cancerígena, L-929, por um período de 24h e 72h. As **Figuras 14 e 15** mostram a representação gráfica da viabilidade celular pela concentração utilizada, em milimolar.

Em 24h já na menor concentração testada, 0,625mM de R-CV livre, há a redução da viabilidade celular demonstrando uma tendência dose-dependente para atuação da redução significativa da viabilidade, onde o IC₅₀ foi de 3,106mM e nota-se que posterior a esta concentração há uma queda brusca na viabilidade chegando a quase 0 na maior concentração,

10mM de carvona livre. Após 72h de experimento, os resultados tendem a manter o mesmo perfil apresentado em 24h, com o IC50 bem próximo (mostrado na **tabela 5**) o que nos adiciona que em 24h a molécula já tem seu efeito significativo total na linhagem testada.

Partindo para as linhagens cancerígenas, os resultados mostram com nitidez um efeito dependente se dose, onde quanto maior a concentração testada maior o efeito significativo na redução a viabilidade celular. Após 24h de experimentação em 4T1, a R-CV livre, apresenta redução significativa da viabilidade celular após a segunda concentração testada, 1,25mM, onde após 72h já na mínima concentração testada observamos seu efeito significativo.

Tabela 5 – Valores de IC50 (mM) obtidos pelo ensaio de MTT, após incubação das células normais ou cancerígenas com R-Carvona por 24 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média de três experimentos realizados em triplicada e foram obtidos usando curva de regressão não linear, $\pm$ erro padrão.

Linhagem Composto	24h		72h	
	L929	4T1	L929	4T1
R-Carvona Livre	3,106mM $\pm$ 1,1639	2,789mM $\pm$ 1,254	3,224mM $\pm$ 1,3	2,889mM $\pm$ 1,586

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

Ao obtermos os valores referentes a concentração mínima capaz de expressar 50% do efeito máximo da molécula testada em sua forma livre, podemos observar que os valores para as células cancerígenas já se mostram menores quando comparados com os valores referentes a linhagem normal, porém com uma baixa distância nos valores.

5.4.2 Avaliação do efeito citotóxico da R-CV nanoencapsulada

A atividade citotóxica das diferentes nanoemulsões contendo R-CV foi avaliada e os dados de IC50 tanto para as células normais (L-929) quanto as cancerígenas (4T1), foram expressos na **Tabela 6**, para o período de 24h e 72h.

Tabela 6 – Valores de IC50 (mM) obtidos pelo ensaio de MTT, após incubação das células normais ou cancerígenas com as nanoemulsões (NE) por 24 horas e 72 horas. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão, de três experimentos realizados em triplicada e foram obtidos usando curva de regressão não linear.

Linhagem NE(mg/mL)	24h		72h	
	L929	4T1	L929	4T1
5	1,697mM $\pm$ 1,153	1,661mM $\pm$ 1,000	1,709mM $\pm$ 0,998	1,489mM $\pm$ 1,212
12,5	~2,296mM	1,482mM $\pm$ 1,095	1,630mM $\pm$ 1,122	1,712mM $\pm$ 1,010
25	~ 2.329mM	2,285mM $\pm$ 1,135	1,641mM $\pm$ 1,077	1,149mM $\pm$ 1,200
37,5	2,634mM $\pm$ 0,985	2,104mM $\pm$ 1,055	2,315mM $\pm$ 1,160	3,302mM $\pm$ 1,180
50	1,537mM $\pm$ 1,134	2,050mM $\pm$ 1,200	1,610mM $\pm$ 1,140	2,995mM $\pm$ 1,120

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

Os valores de IC50 para as nanoemulsões com diferentes concentrações de R-Carvona incorporada, percebemos uma redução significativa no IC50 de 4T1 em 72h quando comparado com o de L929 nos mesmos padrões. Não notamos padrões de IC50 referentes ao tempo de tratamento. A linhagem 4T1 foi mais sensível a nanoemulsão contendo 125mg de R-CV, em 24h e a com 250mg, em 72h, porém busca-se o equilíbrio entre toxicidades de forma a manter uma seletividade tóxica para as células cancerígenas elegendo as formulações com 50mg e 250mg como as mais promissoras.

Figura 16 - Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células L929 $\pm$ erro padrão em 24h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulções (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

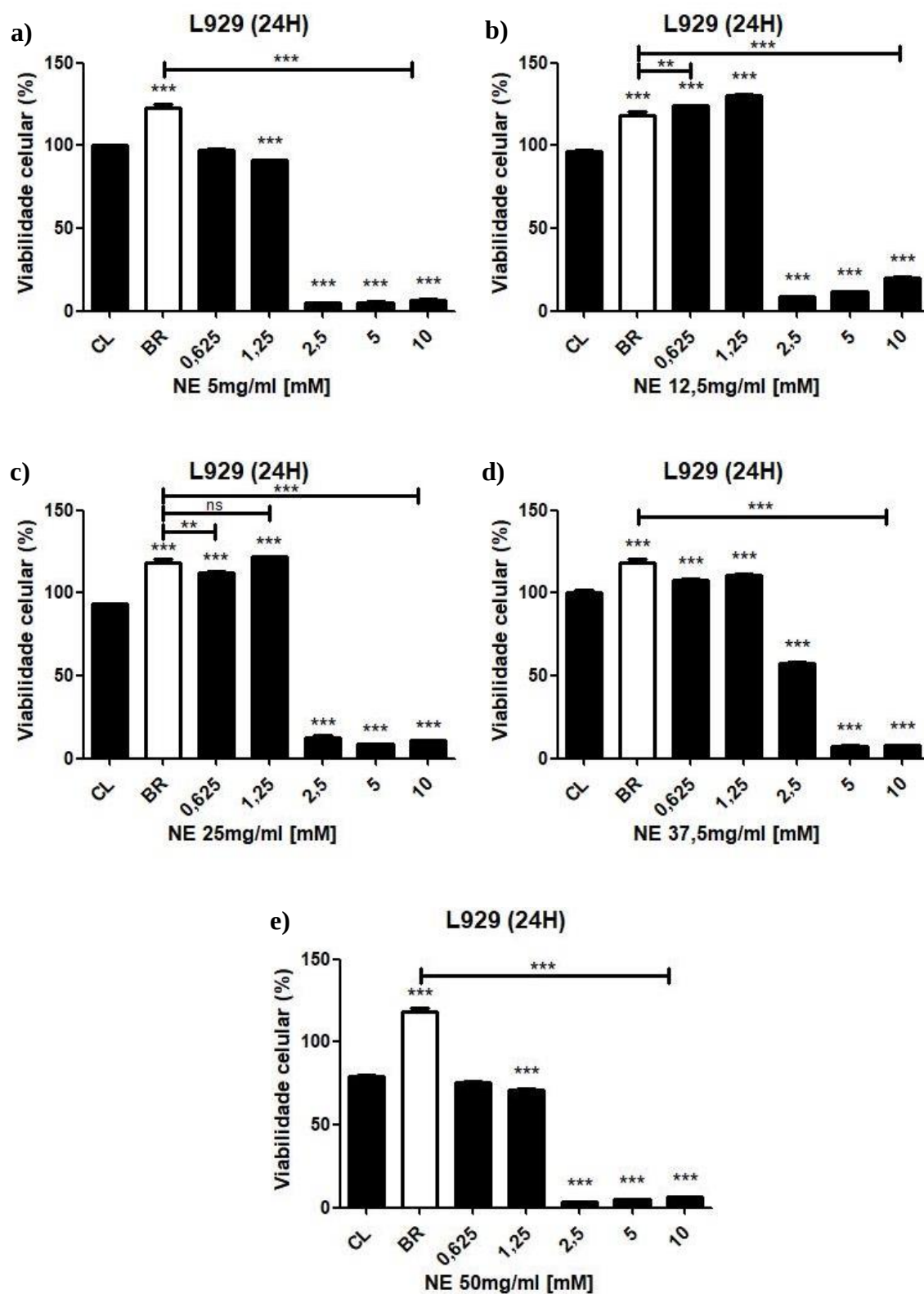


Figura 17 - Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células L929 $\pm$ erro padrão em 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulsões (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

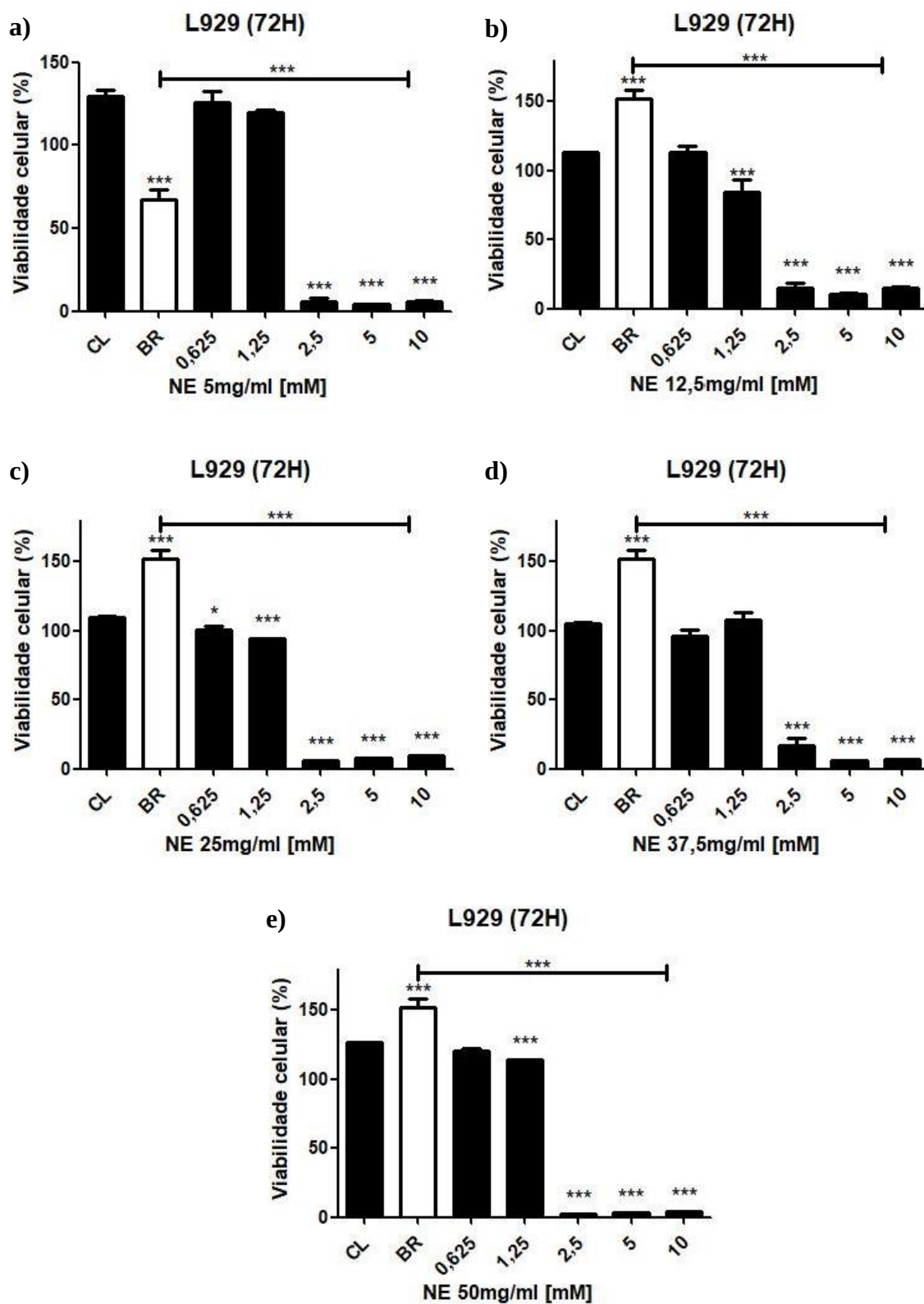


Figura 18 - Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células 4T1 $\pm$ erro padrão em 24h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulsões (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.

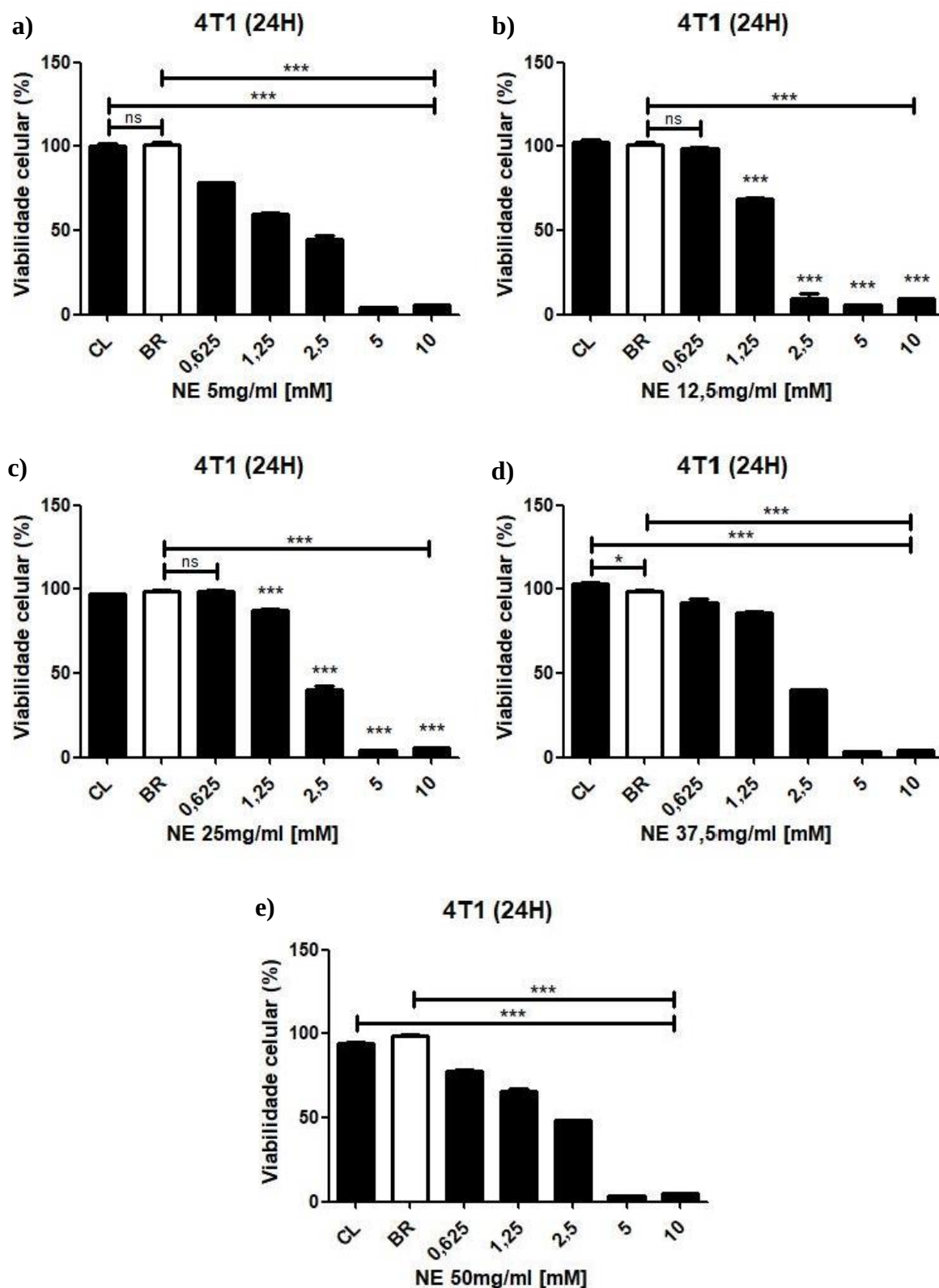
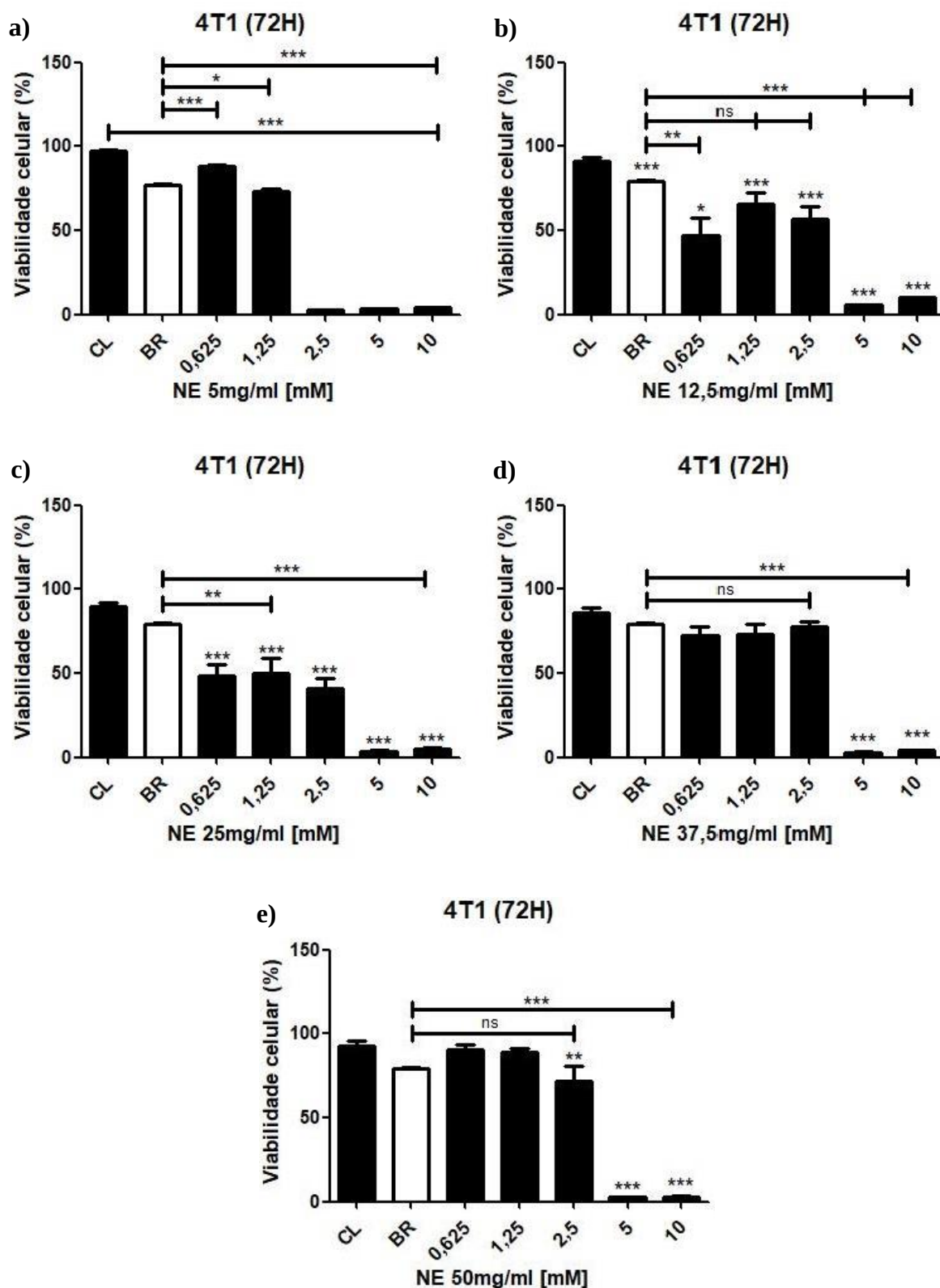


Figura 19 - Efeito citotóxico da R-Carvona nanoemulsionada em células 4T1 $\pm$ erro padrão em 72h. Dados de três experimentos independentes, realizados em triplicata e analisados por ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao controle. Controle (CL) onde houve ausência do tratamento, Branco (BR) relativo a nanoformulação com ausência da R-Carvona. Nanoemulsões (NE) contendo 5 mg/mL (a); 12,5 mg/mL (b); 25 mg/mL (c); 37,5 mg/mL (d) e 50 mg/mL (e) de R-Carvona.



Em L-929, podemos observar um aumento significativo, indicando proliferação pelo aumento na conversão do MTT resultando em um maior valor de absorbância, para todos os dados referentes ao Branco (BR), onde houve adição apenas do veículo nanoestruturado sem a presença da molécula em teste, o que mostra que mesmo testada no mesmo volume da maior concentração utilizada, 10mM, o nanocarreador não demonstra presença de citotoxicidade celular. Por meio destes dados também é possível notar um efeito significativo da presença de R-CV nanoveiculada na redução da viabilidade celular.

Observando as diferentes formulações testadas, a nanoemulsão (NE) contendo 5mg/mL de carvona, após 24h apresenta uma redução bastante significativa quando comparada com o grupo controle, o qual não tem a presença do veículo nem da molécula testada e com ausência do selante de placas, mostrando um caimento acentuado a partir da concentração de 2,5mM, um perfil que se repete para as demais formulações.

Após 72 horas de tratamento, **Figura 17**, os resultados mantêm o mesmo perfil, com uma leve potencialização do efeito citotóxico, mostrando ainda diferenças significativas do controle (CL) e do BR em relação as concentrações testadas.

Onde, posteriormente, foi possível, ao compararmos o IC50 dos resultados, determinarmos a formulação mais adequada para prosseguir com os testes subsequentes.

Quando partimos para os resultados em células cancerígenas, **Figura18 e 19**, percebemos que na maioria dos dados a presença do nanocarreador, apenas, não apresenta toxicidade significativa atribuindo o efeito citotóxico às formulações contendo o bioativo, após 24h. Em 72h há uma pequena redução na viabilidade o que pode ser atribuído a presença dos agentes emulsificantes devido a estabilidade no meio o qual a emulsão foi diluída.

Após 24 horas, o perfil nas células cancerígenas tende a ser próximo aos resultados expressados em células normais, porém com um efeito potencializado, mais significativo, apresentado nas concentrações de 5 e 10mM. Quando partimos para os resultados em 72 horas observamos uma variação distinta nos gráficos, onde na primeira formulação testada, a NE com 5 mg/mL vemos que partindo de 2,5mM já demonstra um efeito quase máximo na redução da viabilidade celular, na segunda formulação testada de NE 12,5mg/mL vimos redução significativa em todas as concentrações testadas, incluindo na do veiculador. Partindo para as formulações com 25mg/mL os resultados tendem se apresentarem da mesma forma que na maioria das concentrações da R-CV, nas NE que continham 37,5 e 50mg/mL notamos que não houve diferença significativa entre o BR as três primeiras concentrações da nanoemulsão testada, mas houve uma diferença significativa de todas as concentrações testadas quando comparadas com controle.

5.4.3 Ensaio de cicatrização de feridas

O ensaio de cicatrização de feridas é utilizada para observar a migração celular coletiva ou individual em duas dimensões. Aqui, notamos uma área livre de células criada na monocamada confluyente por exclusão física onde podemos observar a migração. Constatamos que as células permanecem em contato durante o movimento unidirecional. Este modo de migração é conhecido como migração em folhas por manter suas junções intercelulares. Este modo de migração ocorre em diversos processos, como exemplo na metástase do câncer (LECOMTE et al., 2011; FUJISAWA et al., 2012; POULIOT et al., 2013)

Constatamos uma rápida migração no grupo controle de ambas as linhagens e uma permanência do potencial de migração para o tratamento com as drogas livres, porém ao tratar com a nanoemulsão com 50mg de carvona, mesmo na maior concentração, a celular normal (L929) manteve o potencial migratório chegando a 97,6%, em média, na concentração de 0,6mM. Já em 4T1, ao tratar as células com as nanoemulsões, em concentrações inferiores ao IC50, as mesmas, sofreram interferência na adesão célula-matriz, impossibilitando mensurar os valores de migração.

Figura 20 - Efeito da R-Carvona livre e nanoencapsulada na migração celular pelo processo de cicatrização de feridas em L929. Controle: ausência de carvona no tratamento; DL1,2mM: tratamento com droga livre em concentração de 1,2mM; DL0,6mM de carvona: tratamento com droga livre em concentração de 0,6mM de carvona; NE1,2mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concentração de 1,2mM de carvona e NE0,6mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concetração de 0,6mM. Imagens representativas das triplicadas.

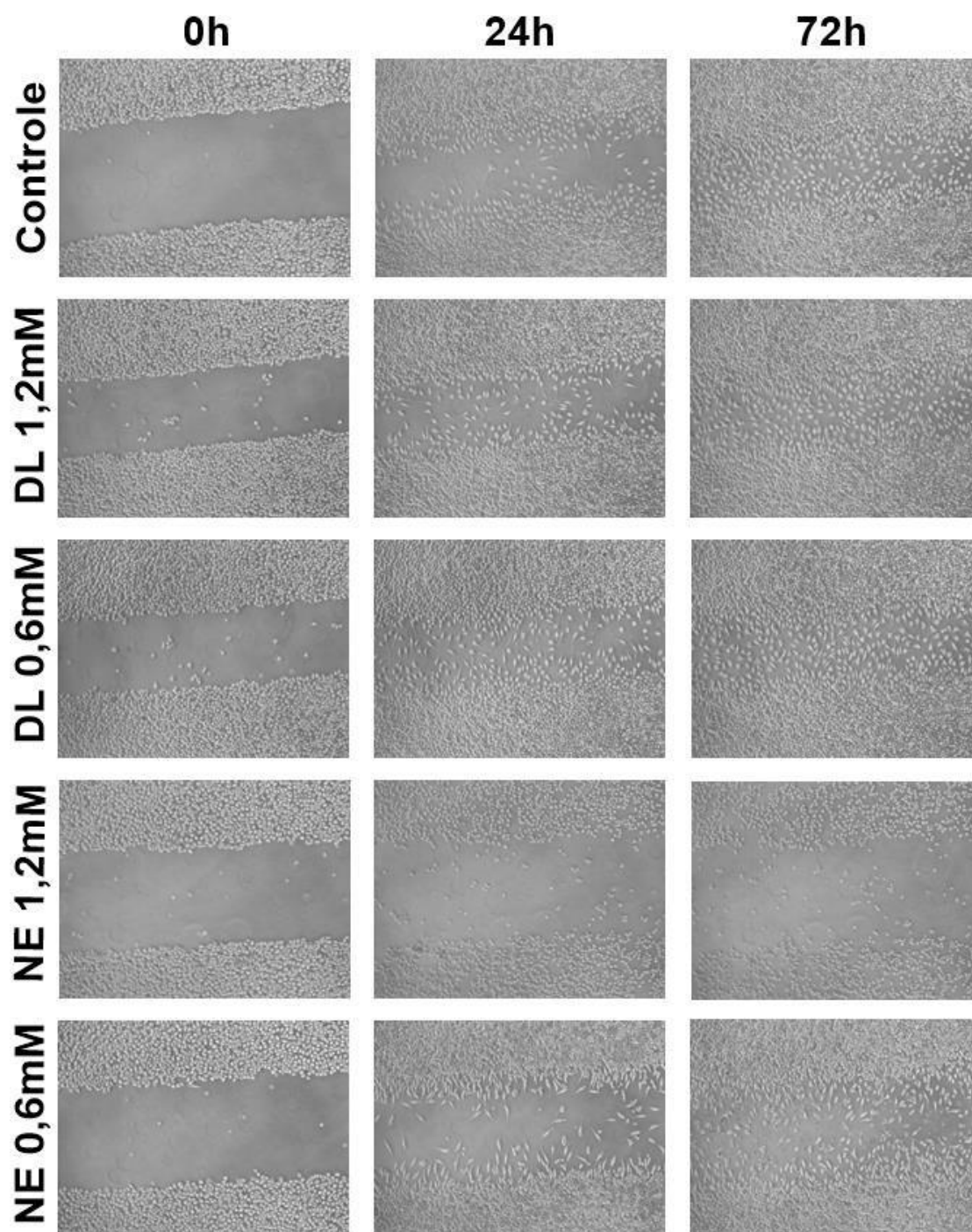
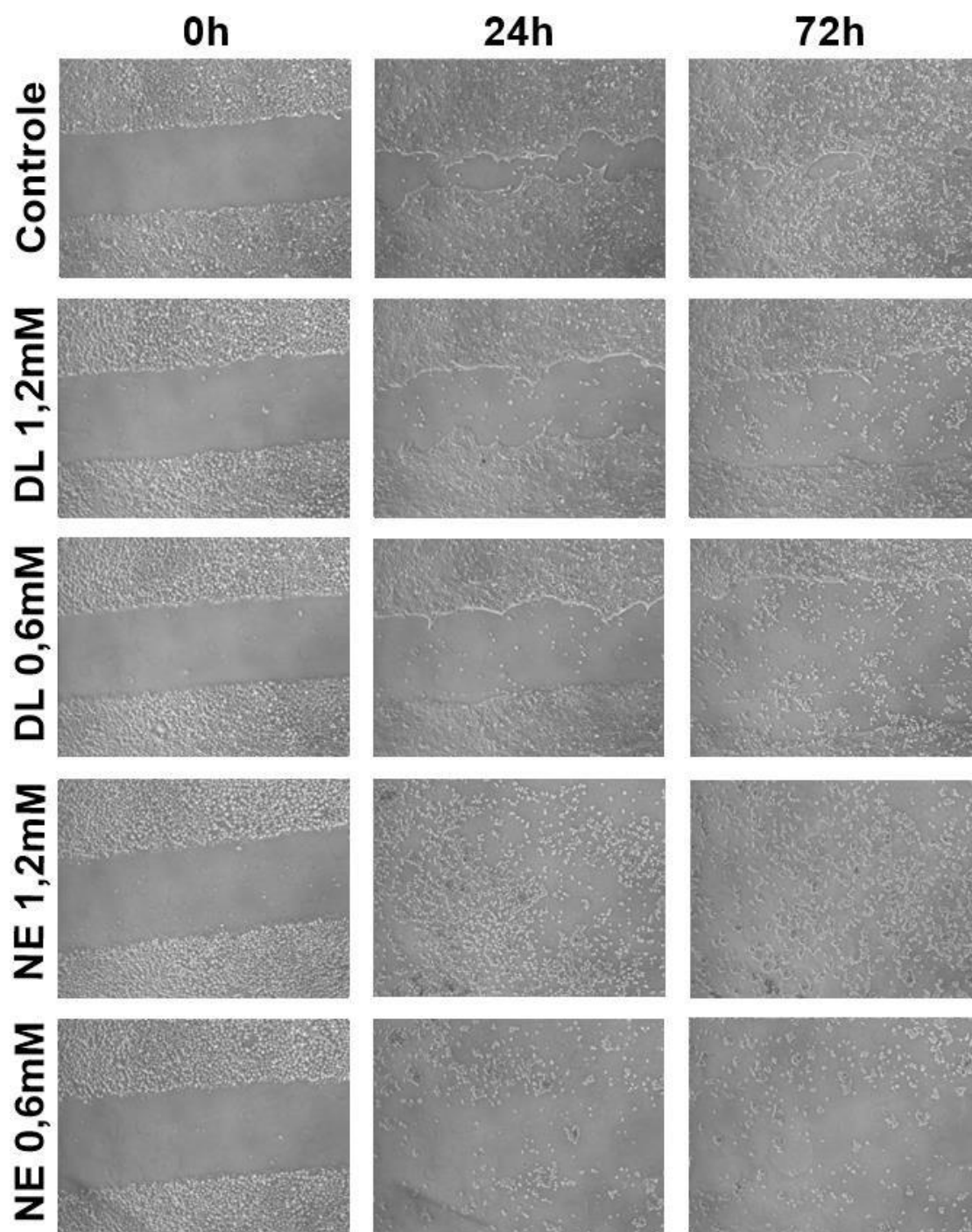


Figura 21 - Efeito da R-Carvona livre e nanoencapsulada na migração celular pelo processo de cicatrização de feridas em 4T1. Controle: ausência de carvona no tratamento; DL1,2mM: tratamento com droga livre em concentração de 1,2mM; DL0,6mM de carvona: tratamento com droga livre em concentração de 0,6mM de carvona; NE1,2mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concentração de 1,2mM de carvona e NE0,6mM: tratamento com droga nanoencapsulada em concetração de 0,6mM. Imagens representativas das triplicadas.



6 CONCLUSÕES

As nanoemulsões contendo R-Carvona foram desenvolvidas com sucesso através do método utilizado, a emulsificação ultrassônica, onde obtivemos 10mL de cada formulação nas concentrações de 5 mg/mL; 12,5 mg/mL; 25 mg/mL; 37,5 mg/mL e 50 mg/mL.

Os sistemas nanoparticulados apresentaram boa caracterização físico-química, com o tamanho variando de 133nm a 183nm não proporcional a quantidade de fármaco utilizado, potencial zeta médio de -36,4mV e índice de polidispersão inferior a 0,240.

A toxicidade do veículo mostrou-se variável, próximo ao grupo controle e por diversas vezes mostrando valores acima do mesmo induzindo uma possível proliferação.

As emulsões analisadas foram citotóxicas para a linhagem de câncer de mama. Os resultados aqui apresentados demonstram que os sistemas nanoencapsulados apresentam uma boa atividade e eficiência na potencialização dos efeitos citotóxicos quando comparados com a R-CV livre.

Os valores do IC₅₀ foram obtidos e comparados para o fármaco livre e nanoencapsulado onde na linhagem de câncer de mama obtivemos uma redução de 2,889mM para 1,489mM na menor concentração da nanoemulsão onde continha 5mg/mL.

Os resultados de migração demonstram uma rápida migração no grupo controle para ambas as linhagens testadas com permanência do potencial de migração ao testar o fármaco livre. Com os nanossistemas a linhagem normal manteve suas condições semelhantes ao grupo controle com o potencial migratório acima de 90%, porém na linhagem cancerígena constatou-se interferência na adesão célula-matriz.

Assim, as nanoemulsões contendo o óleo essencial (R-Carvona), podem ser considerados aptos para estudos *in vivo* visando os tratamentos para o câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, M. & USTOYEV, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. In: **Seminars in oncology nursing**. WB Saunders, 2019. p. 150923.
- AGGARWAL, B. B. et al. From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 10, n. 1, p. 87-118, 2006.
- AGHAPOUR, F. et al. Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor growth in MCF-7 breast cancer cell lines. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 500, n. 4, p. 860-865, 2018.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H. Potentially cancer chemopreventive and anti-inflammatory terpenoids from natural sources. In: **Studies in natural products chemistry**. Elsevier, 2003. p. 73-126.
- AMALRAJ, A. et al. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives—A review. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 2, p. 205-233, 2017.
- BADAWY, M. EI; ABDELGALEIL, S. A. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776-782, 2014.
- BAI, X. et al. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. **Cancer treatment reviews**, v. 69, p. 152-163, 2018.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BERNARDI, D. S. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BHAT, M. A. et al. Carvone Schiff base of isoniazid as a novel antitumor agent: nanoemulsion development and pharmacokinetic evaluation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 203, p. 111-119, 2015.
- BLUMEN, H.; FITCH, K.; POLKUS, V. Comparison of treatment costs for breast cancer, by tumor stage and type of service. **American health & drug benefits**, v. 9, n. 1, p. 23, 2016.
- BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1-4, p. 78- 93, 2012.
- BOSTANCIOĞLU, R. B. et al. Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2002-2008,

2012.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria Nº 451, de 19 de setembro de 1997. Disponível em http://www.pqsys.com.br/links/p_451_1.htm. Acesso 08/02/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2030**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2018

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CARNEIRO, M. et al. Microscopy features of mice cancer models induced by tumor cell transplantation and chemical agents. **Microscopy: science, technology, applications and education. Badajoz: Formatex Research Center**, p. 946-952, 2010.

CASTILHO, A. R.; MURATA, R. M.; PARDI, V. Produtos Naturais em Odontologia. **Revista Saúde-UNG-Ser**, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2007.

CAUGHRAN, J. et al. The Effect of the 2009 USPSTF breast cancer screening recommendations on breast cancer in Michigan: A longitudinal study. **The breast journal**, v. 24, n. 5, p. 730-737, 2018.

CHANG, L. et al. Breast cancer treatment and its effects on aging. **Journal of geriatric oncology**, v. 10, n. 2, p. 346-355, 2019.

CINGI, M. R. et al. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicology in vitro**, v. 5, n. 2, p. 119-125, 1991.

CORREIA, S. de J. et al. Flavonoids, norisoprenoids and other terpenes from leaves of *Tapirira guianensis*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2056-2059, 2008.

CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3, p. 491s-499s, 1999.

DANTAS, B. B. Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 413-422, 2006.

DE MARTINO, L. et al. Essential oils from Mediterranean aromatic plants. In: **The Mediterranean Diet**. Academic Press, 2015. p. 649-661.

DE MENEZES ALENCAR, M. S.; BOCHNER, R.; DIAS, M. F. F. A pesquisa brasileira dedicada à nanotecnologia e riscos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Eletrônica de**

Comunicação, Informação e Inovação em Saúde, v. 8, n. 3, 2014.

DE SOUZA, D. S. S. et al. FM. Avaliação in vitro da citotoxicidade de análogos tiossemicarbazônicos e 4-tiazolidinônicos em linhagens de células tumorais. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 40, n. 1, 2019.

DHANKHAR, R. et al. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 230-249, 2010.

DIAO, Wen-Rui et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 2014.

DILLON D, et al. Pathology of invasive breast cancer. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. **Diseases of the Breast**. 5th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health; 2014.

DO ROSÁRIO MARTINS, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014.

DUVA, A. et al. Pcn41 Impact Of Disease Related Group In Breast Cancer Treatment In The Brazilian Public Healthcare System. **Value in Health Regional Issues**, v. 19, p. S21, 2019.

DVORA, H.; KOFFAS, M. A. G. Microbial production of flavonoids and terpenoids. In: **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. Woodhead Publishing, 2013. p. 234-261.

ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacology & therapeutics**, v. 64, n. 2, p. 201-214, 1994.

FARHANG, B. Nanotechnology and lipids. **Lipid Technology**, v. 19, n. 6, p. 132-135, 2007.

FARKAS, J., MOHÁCSI-FARKAS, C. In: MOTAJERMI, Y. (ed). 1º Ed. Safety of foods and beverages: spices and seasonings. **Encyclopedia of Food Safety**. Volume 3: Foods, Materials, Technologies and Risks. Elsevier, 2014. p. 324-330

FENG, Si-Shen. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert review of medical devices**, v. 1, n. 1, p. 115-125, 2004.

FERREIRA, C. G. et al. Increasing access to immuno-oncology therapies in Brazil. **Journal of Cancer Policy**, v. 16, p. 1-5, 2018.

FESSI, H. et al. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules. **European patent**, v. 274961, p. A1, 1988.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, p. 301- 313, 2005.

FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. In: **Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology**. Springer, Dordrecht, 2001. p. 9-26.

FUJISAWA, T. et al. Cysteamine suppresses invasion, metastasis and prolongs survival by inhibiting matrix metalloproteinases in a mouse model of human pancreatic cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34437, 2012.

GAO, Yu et al. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 4, p. 761-777, 2014.

GEGECHKORI, N.; HAINES, L.; LIN, J. J. Long-Term and Latent Side Effects of Specific Cancer Types. **The Medical clinics of North America**, v. 101, n. 6, p. 1053-1073, 2017.

GLOECKNER, H.; JONULEIT, T.; LEMKE, Horst-Dieter. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. **Journal of immunological methods**, v. 252, n. 1-2, p. 131-138, 2001.

GONÇALVES, J. C. R. Estudo do efeito antinociceptivo de (-)-carvona em modelos experimentais in vivo e in vitro. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 108f, 2008.

GONG, R.; CHEN, G. Preparation and application of functionalized nano drug carriers. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 3, p. 254-257, 2016.

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

HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, Md A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2019.

HAYES, J. R.; STAVANJA, M. S.; LAWRENCE, B. M. Mentha: Biological and toxicological properties of mint oils and their major isolates: safety assessment. **Mint. The genus Mentha. Medical and Aromatic Plants—Industrial Profiles**, 2006.

HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions—A review. **Journal of controlled release**, v. 223, p. 85-98, 2016.

HUCZYŃSKI, A. Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 23, p. 7002-7010, 2012.

IENGAR, P. Identifying pathways affected by cancer mutations. **Genomics**, v. 110, n. 5, p. 318-328, 2018.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

KAUR, R.; KAPOOR, K.; KAUR, H. Plants as a source of anticancer agents. **J Nat Prod Plant Resour**, v. 1, n. 1, p. 119-24, 2011.

KINOSHITA, T. et al. A Novel Laser Fiberscope for Simultaneous Imaging and Phototherapy of Peripheral Lung Cancer. **Chest**, 2019.

KNOBLOCK, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, M.; VIGENSCHOW, H. **Action of**

- terpenoids on energy metabolism.** In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia – da Planta ao Medicamento. 5. Ed. Porto Alegre: UFRGS/ UFSC, p. 473- 474, 2003.
- KOCH, C. et al. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1-2, p. 71-78, 2008.
- KUMAR, A. et al. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 171, n. 3, p. 332-347, 2008.
- KUTTAN, G. et al. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 10, p. 995-1007, 2011.
- LECOMTE, N. et al. Emergence of potent inhibitors of metastasis in lung cancer via syntheses based on migrastatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 37, p. 15074-15078, 2011.
- LEE, B. L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **The lancet oncology**, v. 13, n. 3, p. e95-e102, 2012.
- LI, X. et al. Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 7, p. 479-483, 2011.
- LIU, W. et al. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of colloid and interface science**, v. 303, n. 2, p. 557-563, 2006.
- LOGAN, S. et al. Systematic review of fertility-related psychological distress in cancer patients: Informing on an improved model of care. **Psycho-oncology**, v. 28, n. 1, p. 22-30, 2019.
- LUTFI, M.; ROQUE, N. F. História de Eugênicas. **Revista Química Nova na Escola**, v. 36, n. 4, p. 252-260, 2014.
- MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug discovery today**, v. 14, n. 23-24, p. 1136-1142, 2009.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.
- MARIOTTO, A. B. et al. Estimation of the number of women living with metastatic breast cancer in the United States. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 26, n. 6, p. 809-815, 2017.
- MARTIN, M. et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in HER2- positive breast cancer (ExteNET): 5-year analysis of a randomised, double-blind, placebo- controlled, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 12, p. 1688-1700, 2017.
- MASMOUDI, H. et al. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International journal of pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 117-131, 2005.

- MCMURRY, J. 7° Ed. Química Orgânica - Combo. **São Paulo: Cengage Learning**, 2011. 1344 p.
- MEDEIROS, G. C.; THULER, L. C. S.; BERGMANN, A. Delay in breast cancer diagnosis: a Brazilian cohort study. **Public health**, v. 167, p. 88-95, 2019.
- MIRZA, Z.; KARIM, S. Nanoparticles-based drug delivery and gene therapy for breast cancer: recent advancements and future challenges. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2019.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, p. 105-111, 2001.
- MONTERO-VILLEGAS, S. et al. Cytotoxic effects of essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 3, p. 167-181, 2018.
- MOO, Tracy-Ann et al. Overview of breast cancer therapy. **PET clinics**, v. 13, n. 3, p. 339-354, 2018.
- MORAIS, G. G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 158f, 2006
- Morrow M. Physical examination of the breast. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. **Diseases of the Breast**. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health; 2014:chap 3.
- MORCIA, C. et al. Chapter 35 - Carvone (*Mentha spicata* L.) Oils. Editor(s): Victor R. Preedy. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, Academic Press, 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1- 2, p. 55-63, 1983.
- NEERGHEEN, V. S. et al. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 229-241, 2010.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.
- PADUCH, R. et al. Biological activity of terpene compounds produced by biotechnological methods. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1096-1107, 2016.
- PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315, 2007.
- PATEL, P. B.; THAKKAR, V. R. L-carvone induces p53, caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. 3, p. 453-462, 2014.

- PAVITRA, E. et al. Engineered nanoparticles for imaging and drug delivery in colorectal cancer. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2019.
- PENG, Xiang-Hong et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 311, 2008.
- POULIOT, N.; PEARSON, H. B.; BURROWS, Allan. Investigating metastasis using in vitro platforms. In: **Madame Curie Bioscience Database [Internet]**. Landes Bioscience, 2013.
- PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, Suet-Feung. Molecular classification of breast cancer. **PET clinics**, v. 13, n. 3, p. 325-338, 2018.
- RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 483-489, 2003.
- RAVINDRA, N. S.; KULKARNI, R. N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, v. 184, p. 31- 35, 2015.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1-13, 2003.
- RESEARCH AND MARKETS. Global Nanotechnology Market (by Component and Applications), Funding & Investment, Patent Analysis and 27 Companies Profile & Recent Developments - Forecast to 2024. **Global: RESEARCH AND MARKETS**, 2018.
- ROLAND, I. et al. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International journal of pharmaceutics**, v. 263, n. 1-2, p. 85-94, 2003.
- SALAZAR, A. Torres et al. Anti-inflammatory and anti-cancer activities of essential oils and their biological constituents. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 49, n. 1, p. 93-95, 2011.
- SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, 2001.
- SANTOS, O. D. H. dos; ROCHA FILHO, P. A. da. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de Calendula officinalis com cristal líquido. 2006.
- SARKAR, A. et al. Targeted delivery of quercetin loaded mesoporous silica nanoparticles to the breast cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 10, p. 2065-2075, 2016.
- SCARANO, F.; GUIMARÃES, A.; DA SILVA, J. M. Rio+ 20: Lead by example. **Nature**, v. 486, n. 7401, p. 25, 2012.
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737**, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737**, 2003.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, 2010.

SHAWER, M. et al. VLDL-resembling phospholipid-submicron emulsion for cholesterol-based drug targeting. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 91, n. 6, p. 1405-1413, 2002.

SHESEY, R. C. Rowe-Paul J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients 5th Ed/Raymond C Rowe & Paul J Sheskey/Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2006**. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2006, 2006.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019.

SIMON, S. D. et al. Characteristics and prognosis of stage I-III breast cancer subtypes in Brazil: The AMAZONA retrospective cohort study. **The Breast**, v. 44, p. 113-119, 2019.

STÁŇKOVÁ, K. et al. Optimizing cancer treatment using game theory: A review. **JAMA oncology**, v. 5, n. 1, p. 96-103, 2019.

SUGGITT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 971-981, 2005.

TAUBER, N. M. et al. Effect of psychological intervention on fear of cancer recurrence: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Oncology**, 2019.

TRIPLETT, M. D.; RATHMAN, J. F. Optimization of β -carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. **Journal of nanoparticle research**, v. 11, n. 3, p. 601-614, 2009.

TUBTIMSRI, S. et al. Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 425-437, 2018.

VANDEBROEK, I. et al. A comparison of traditional healers' medicinal plant knowledge in the Bolivian Andes and Amazon. **Social Science & Medicine**, v. 59, n. 4, p. 837-849, 2004.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K.. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025- 1058, 2009.

VICTORIA, F. N. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

VIEGAS JÚNIOR, C.. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, p. 390-400, 2003.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

- WANG, B. et al. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: a review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1141-1151, 2011.
- WATTANAPITAYAKUL, S. K. et al. Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 96, n. 1, p. 80-87, 2005.
- WEISS, J. et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 146-154, 2008.
- WEN, Chih-Jen et al. In vivo real-time fluorescence visualization and brain-targeting mechanisms of lipid nanocarriers with different fatty ester: oil ratios. **Nanomedicine**, v. 6, n. 9, p. 1545-1559, 2011.
- WORSFOLD, P. et al. **Encyclopedia of analytical science**. Elsevier, 2019.
- YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007.
- ZHAO, D. et al. Lyophilized Cheliensisin A submicron emulsion for intravenous injection: characterization, in vitro and in vivo antitumor effect. **International journal of pharmaceutics**, v. 357, n. 1-2, p. 139-147, 2008.
- ZHENG, Guo-qiang; KENNEY, Patrick M.; LAM, Luke KT. Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemoprotective agents from dill weed oil and caraway oil. **Planta medica**, v. 58, n. 04, p. 338-341, 1992.
- ZORZI, G. K. et al. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 426-436, 2015.