UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

KARINNE KELLY GADELHA MARQUES

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE UMA NANOCÁPSULA CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO

João Pessoa, PB

2024

KARINNE KELLY GADELHA MARQUES

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE UMA NANOCÁPSULA CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestra em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior

João Pessoa, PB

2024

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M357s Marques, Karinne Kelly Gadelha.
Síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral in vitro de uma nanocápsula contendo óleo de copaíba (Copaifera sp.) Em células de adenocarcinoma mamário humano. / Karinne Kelly Gadelha Marques. - João Pessoa, 2024.
118 f. : il.

Orientação: Juan Carlos Ramos Gonçalves.
Coorientação: Francisco Humberto Xavier Junior.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais - Atividade antineoplásica. 2. Atividades antitumorais - Oléo de copaíba. 3. Nanopartícula polimérica. 4. Nanotecnologia. 5. Apoptose. I. Gonçalves, Juan Carlos Ramos. II. Xavier Junior, Francisco Humberto. III. Título.

UFPB/BC CDU 547.9(043)

Elaborado por ANNA REGINA DA SILVA RIBEIRO - CRB-15/24

KARINNE KELLY GADELHA MARQUES

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE UMA NANOCÁPSULA CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO

APROVADA EM: 24/09/2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
JUAN CARLOS RAMOS GONCALVES
Data: 28/10/2024 10:34:27-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves
Orientador/Presidente – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
gov.br
FRANCISCO HUMBERTO XAVIER JUNIOR
Data: 29/10/2024 14:44:46-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior
Coorientador – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
gov.br
MARCIA REGINA PIUVEZAM
Data: 30/10/2024 17:12:07-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Membro interno – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
gov.br
JOAO MARCELO DE CASTRO E SOUSA
Data: 06/11/2024 09:18:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa
Membro externo – Universidade Federal do Piauí (UFPI)

À minha avó materna e madrinha (*in memoriam*), que deu um grito de felicidade na minha formatura. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à Deus, que me fez forte e me ensinou que não há desafio que Ele não me ajude a superar. Quando me chamou para servir em nome Dele, em plena finalização de mestrado, não imaginaria que seria a minha maior fonte de força. Dessa forma, agradeço logo em seguida ao EJC e ao meu grupo da coordenação geral por me acompanharem nesse ano intenso, mas com um final recompensador.

Agradeço à minha família: à minha mãe, que esteve comigo em todos os momentos desde à graduação, celebrando vitórias e ouvindo dificuldades. Mãe, o que seria de mim sem você me perguntando “Como posso te ajudar, filha?” nos dias mais difíceis? Tudo o que conquisto é porque me ensinou a coragem, força e gentileza necessária. Ao meu pai, que prezou desde o início pela minha educação, sempre me dando todas as condições para que eu crescesse ao seu lado. Às minhas irmãs e cunhados, que comprariam batalhas em meu nome e que me ensinam que família, mesmo distante, é amor. À minha segunda mãe, que todos os dias cuida de mim da sua própria maneira e ainda continua perguntando se eu estou indo para a escola até hoje. Agradeço a minha avó e madrinha, que mesmo tendo nos deixado neste ano, me ensinou que nada vale mais do que cultivar o amor e a família. Agradeço também aos meus tios e primos por todo o apoio durante esses anos de trajetória acadêmica.

Aos meus amigos do PW e segunda família que está comigo desde a escola, participando de todos os momentos dessa história, me ouvindo reclamar, vibrando minhas aprovações e me proporcionando os melhores momentos que só quem tem amizades longas poderia entender. Assim como agradeço a todos os meus amigos, de curta e longa data, por todo o apoio e vivências que completam minha história.

Ao Laboratório de Oncofarmacologia, coordenado pela Profa. Dra. Marianna Sobral, por ser uma segunda casa, onde sempre encontro pessoas que me fortalecem nessa caminhada tantas vezes árdua. Agradeço a toda a equipe pelo carinho, pela solicitude e também pelos momentos que compensaram tantos estresses da pós graduação. Lá encontro amigos, parceiros de experimentos e pesquisadores competentes. Em especial, agradeço à Isione, Heivila, Ramon e Sâmia por terem me ajudado em diferentes etapas deste trabalho.

Agradeço também à instituição “Oncotox”, na qual Igor se inclui, por ter me dado suporte não só neste trabalho, mas sempre que precisei. Assim como agradeço a todos os meus amigos e colegas de outros laboratórios, que tanto me auxiliaram nestes dois anos de mestrado.

Minha gratidão ao Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, coordenado pelo Prof. Dr. Humberto Xavier, que passou a ser tão familiar a mim e que possui uma equipe sempre solícita e capacitada. Em especial, à minha amiga Allessya, por ter sido meu maior ponto de apoio em toda a fase de desenvolvimento tecnológico desse trabalho. Sem ela, jamais teria conseguido ir até o fim.

Agradeço também à equipe do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, coordenado pelo professor doutor Demetrius Machado de Araújo, pela parceria durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Juan Gonçalves, que viu potencial em mim em uma entrevista de iniciação científica na graduação e permanece estimulando esse potencial a cada ano de orientação. Assim como agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Humberto Xavier, que no último período do curso de Farmácia, em um estágio de curto tempo, me fez amar nanotecnologia e alguns meses depois abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender tanto.

Agradeço à minha banca de defesa de dissertação de mestrado, composta pelos professores doutores João Marcelo de Castro e Sousa e Márcia Regina Piuvezam, assim como os suplentes professores doutores Robson Cavalcanti Veras e Enéas Ricardo de Morais Gomes. Obrigada por fazerem parte desse momento e contribuírem para minha formação continuada como profissional.

Minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo crescimento e maturidade em mim desenvolvidos. À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), que tem sido minha casa há 7 anos e que continuará sendo também pelos 4 próximos. Assim como agradeço ao povo brasileiro, que torna capaz o desenvolvimento dessa pesquisa e de tantas outras.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) pelo apoio financeiro.

"A trajetória somos nós mesmos. Em matéria de viver, nunca se pode chegar antes. A via-crúcis não é um descaminho, é a passagem única, não se chega senão através dela e com ela." — A Paixão Segundo G. H., 1964 (Clarice Lispector).

MARQUES, K.K.G. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE UMA NANOCÁPSULA CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO.** 2024. 119 f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer de mama é um dos tipos neoplásicos mais incidentes no Brasil e no mundo, com tratamento limitado devido à resistência tumoral e/ou toxicidade das alternativas disponíveis. Nesse contexto, produtos naturais e seus derivados têm sido investigados como fontes promissoras para novos compostos com atividade antineoplásica. O óleo de copaíba (OC), um potente derivado natural extraído do tronco das árvores do gênero *Copaifera*, possui atividade anticancerígena. No entanto, seu uso pode ser limitado devido a sua alta volatilidade e lipofilicidade. Nanocápsulas poliméricas são sistemas de carreamento de compostos que podem trazer benefícios, como melhor estabilidade para o bioativo, maior penetração nas células tumorais e, consequentemente, melhor atividade farmacológica. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de uma nanopartícula polimérica do tipo nanocápsula contendo óleo de copaíba (NPOC) em linhagens de células de adenocarcinoma mamário. Para isso, foi feito um estudo de pré-formulação de NPOC, seguido de caracterizações morfológicas e físico-químicas, além de estudos de estabilidade e internalização celular. NPOC (com 40 µg/mL de OC) mostrou-se com parâmetros desejados para uma nanopartícula e foi capaz de penetrar nas células de neoplasia mamária (MCF-7). Quando testada em linhagens de câncer de mama como MCF-7 e MDA-MB-231, a NPOC mostrou-se citotóxica (CI_{50} de 25 ± 0,83 e 31 ± 0,75 µg/mL, respectivamente), com atividade superior ao OC isolado nas mesmas concentrações (CI_{50} de 49 ± 2,1 e 63 ± 1,86 µg/mL, respectivamente). Além disso, nas linhagens não tumorais MCF-10A e HEK-293, apresentou toxicidade reduzida, mostrando-se mais seletiva que OC e que a droga padrão doxorrubicina (DXR). A linhagem MCF-7, por sua maior sensibilidade nos estudos de citotoxicidade, foi selecionada para experimentos subsequentes. Nos estudos de tipo de morte celular com laranja de acridina/iodeto de propídeo (LA/IP) e Hoechst 34580, NPOC mostrou-se capaz de induzir apoptose, levando as células a apresentarem características como formação de *blebs* de membrana e alterações nucleares, com resultados superiores ao OC. Nos estudos de alterações mitocondriais por JC-1, foi possível observar perda de potencial de membrana das mitocôndrias, indicando via de apoptose intrínseca induzida por NPOC e OC, sendo a resposta mais pronunciada com o tratamento com o nanossistema. Em estudos sobre o estado redox celular, o pré-tratamento com N-Acetilcisteína (NAC) revelou que tanto a NPOC quanto o OC induzem estresse oxidativo, sugerindo um possível mecanismo citotóxico. Além disso, experimentos de citotoxicidade com cultivo tridimensional de esferoides demonstraram que a NPOC foi eficaz na redução do tamanho dos microtumores (82,6% na CI_{50}) e na diminuição do raio de migração celular (88% na CI_{50}), com desempenho superior ao OC. Dessa forma, conclui-se que NPOC apresenta melhora significativa de atividade antitumoral quando comparado com OC, com alta seletividade sobre células de câncer de mama, por meio de mecanismos envolvendo morte celular por apoptose e a via de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Antitumoral. Nanopartícula polimérica. Nanotecnologia. Apoptose.

MARQUES, K.K.G. **SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND *IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF A NANOCAPSULE CONTAINING COPAIBA OIL (*Copaifera* sp.) IN HUMAN MAMMARY ADENOCARCINOMA CELLS.** 2024. 119 p. Dissertation (Master's in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most prevalent neoplastic types in Brazil and worldwide, with limited treatment options due to tumor resistance and/or the toxicity of available therapies. In this context, natural products and their derivatives have been investigated as promising sources for new compounds with antineoplastic activity. Copaiba oil (CO), a potent natural derivative extracted from the trunk of trees of the Copaifera genus, exhibits anticancer activity. However, its use can be limited due to its high volatility and lipophilicity. Polymeric nanocapsules are compound delivery systems that can offer benefits, such as improved stability for the bioactive compound, increased penetration into tumor cells, and, consequently, enhanced pharmacological activity. Thus, the aim of this study was to develop, characterize, and evaluate the antitumor activity of a polymeric nanoparticle in the form of a nanocapsule containing copaiba oil (NPOC) in breast adenocarcinoma cell lines. To achieve this, a pre-formulation study of NPOC was conducted, followed by morphological and physicochemical characterizations, as well as stability and cellular internalization studies. NPOC (containing 40 µg/mL of CO) demonstrated the desired parameters for a nanoparticle and was able to penetrate breast cancer cells (MCF-7). When tested on breast cancer cell lines such as MCF-7 and MDA-MB-231, NPOC exhibited cytotoxicity (IC_{50} of 25 ± 0.83 and 31 ± 0.75 µg/mL, respectively), with superior activity compared to isolated CO at the same concentrations (IC_{50} of 49 ± 2.1 and 63 ± 1.86 µg/mL, respectively). Additionally, in non-tumoral cell lines MCF-10A and HEK-293, it showed reduced toxicity, being more selective than CO and the standard drug doxorubicin (DXR). The MCF-7 cell line, due to its greater sensitivity in cytotoxicity studies, was selected for subsequent experiments. In cell death type studies with acridine orange/propidium iodide (AO/PI) and Hoechst 34580, NPOC was shown to induce apoptosis, leading the cells to exhibit characteristics such as membrane bleb formation and nuclear alterations, with results superior to CO. In mitochondrial alteration studies using JC-1, a loss of mitochondrial membrane potential was observed, indicating an intrinsic apoptosis pathway induced by NPOC and CO, with a more pronounced response in the nanocarrier treatment. In studies on the cellular redox state, pre-treatment with N-Acetylcysteine (NAC) revealed that both NPOC and CO induce oxidative stress, suggesting a possible cytotoxic mechanism. Furthermore, cytotoxicity experiments using 3D spheroid culture demonstrated that NPOC was effective in reducing microtumor size (82.6% at IC_{50}) and decreasing cell migration radius (88% at IC_{50}), outperforming CO. Thus, it is concluded that NPOC presents a significant improvement in antitumor activity compared to CO, with high selectivity toward breast cancer cells through mechanisms involving apoptosis and oxidative stress pathways.

Keywords: Antitumor. Polymeric Nanoparticle. Nanotechnology. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da carcinogênese. 25
Figura 2. Características biológicas do câncer 26
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma 27
Figura 4. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose..... 35
Figura 5. Sinalização induzida por EROs em células cancerígenas..... 38
Figura 6. Árvore de copaíba 41
Figura 7. Diferença da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas 45
Figura 8. Preparação das formulações de NPOC 53
Figura 9. Caracterização de NPOC por DLS e ELS 63
Figura 10. Visualização de NPOC no MEV 63
Figura 11. Caracterização de NPOC por FTIR 65
Figura 12. Estudo de estabilidade de NPOC por DLS e ELS 67
Figura 13. Internalização de NPOC-VN em células de câncer de mama humano MCF-7 68
Figura 14. Citotoxicidade de NPOC e OC em linhagem de células de câncer mamário humano MCF-7 após 24, 48 e 72h de tratamento 70
Figura 15. Citotoxicidade de NPOC e OC em linhagem de células de câncer mamário humano MDA-MB-231 após 24, 48 e 72h de tratamento 71
Figura 16. Citotoxicidade de NP em linhagens de células de câncer mamário MCF-7 e MCF-10A após 48h de tratamento 72
Figura 17. Citotoxicidade de NPOC e OC em linhagens não tumorais de células mamárias humanas MCF-10A e células de rim embrionário humano HEK-293 após 48h de tratamento 73
Figura 18. Citotoxicidade de doxorrubicina em linhagens de células de câncer mamário humano MCF-7 e células de mama humana não tumorais MCF-10A após 48h de tratamento 74
Figura 19. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) de células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC, OC e DXR por 48h de tratamento. 76

Figura 20. Imagens de alterações celulares observadas na avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) de células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC após 48h de tratamento 77
Figura 21. Indução da apoptose por NPOC, OC e DXR analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de câncer mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento 78
Figura 22. Imagens representativas de alterações nucleares por coloração de *Hoechst* 34580 em células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC e OC por 48h de tratamento 79
Figura 23. Avaliação de alterações nucleares induzidas por NPOC e OC por marcação com *Hoechst* 34580 em células de câncer mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento 80
Figura 24. Imagens representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração de JC-1 em células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC e OC por 48h e CCCP 81
Figura 25. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial com tratamento de NPOC, OC e CCCP por marcação com JC-1 em células de câncer mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento 82
Figura 26. Investigação da atividade redox dos tratamentos pela análise de citotoxicidade de NPOC, OC e DXR na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 48h de tratamento 83
Figura 27. Imagens representativas dos esferoides de células de câncer mamário humano MCF-7 incubados com NPOC e OC por 48h de tratamento 84
Figura 28. Análise de citotoxicidade de NPOC e OC em cultura tridimensional de esferoides formados por células de câncer mamário humano MCF-7 em 48h de tratamento 85
Figura 29. Análise de inibição de migração celular induzida NPOC e OC em cultura tridimensional de esferoides formados por células de câncer mamário humano MCF-7 em 48h de tratamento 86
Figura 30. Mecanismos de ação da nanopartícula de óleo de copaíba (NPOC) nas células MCF-7 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudo de pré-formulação de NPOC e caracterização por DLS e ELS.....62
Tabela 2. Valores de CI_{50} e IS de NPOC, OC e DXR em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas após 48h de tratamento 74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação molecular do câncer de mama 29
Quadro 2. Principais agentes terapêuticos utilizados no câncer de mama 32
Quadro 3. Alguns medicamentos antitumorais nanotecnológicos comercializados Brasil..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt: proteína cinase B

Apaf-1: fator 1 de ativação da protease da apoptose

B16F10: linhagem celular de melanoma

BAK: proteína antagonista/*killer* Bcl-2

BAX: proteína X Associada ao Bcl-2

Bcl-2: proteína linfoma de células B2

BID: proteína agonista da morte com domínio de interação BH3

BRCA1: gene breast cancer 1

CARD: domínio de recrutamento de caspase

CCCP: cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona

CCND1: oncogene

CDK: cinases dependentes de ciclinas

CDKI: inibidores de cinases dependentes de ciclinas

CG: cromatografia gasosa

CG-SEM: cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CI_{50}: concentração inibitória média

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CO_2: dióxido de carbono

DED: domínio efetor de morte

DISC: complexo de sinalização indutor de morte

DLS: dispersão de luz dinâmica

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DXR: doxorrubicina

E10: células epiteliais cancerígenas de pulmão de camundongo

E2F: fator de transcrição

EE%: eficiência de encapsulação

ELS: dispersão de luz eletroforética

EPR: aumento de permeabilidade e retenção

ERN: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

FADD: domínio de morte associado a Fas

FasL: ligante de receptor Fas

Fas: receptor de morte de superfície celular

FTIR: Infravermelho com transformada de Fourier

HAP: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HEK-293: linhagem celular de rim embrionário saudável humano

HER2: receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2

IP: iodeto de propídeo

IS: índice de seletividade

JC-1: cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LA: laranja de acridina

MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógeno

MCF-10A: linhagem celular de mama saudável humana

MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano

MDA-MB-231: linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano triplo negativo

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

MYC: proto-oncogene

NAC: N-acetilcísteína

NPOC: nanopartícula de óleo de copaíba

NPOC-VN: nanopartícula de óleo de copaíba + vermelho de nilo

OC: óleo de copaíba

p21: proteína envolvida no ciclo celular

p27: proteína envolvida no ciclo celular

p53: proteína envolvida no ciclo celular

PBS: solução fosfato tamponada

PC-3: linhagem celular de câncer de próstata humana

PCL: policaprolactona

PDI: índice de polidispersão

pH: potencial de hidrogênio

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase

PKD: proteínas quinases D

PLA: poli ácido lático

PLGA: poli ácido lático e ácido glicólico

PMEM: permeabilidade da membrana mitocondrial externa

PR: receptor de progesterona

RAS: proteína Rat Sarcoma vírus

RB: retinoblastoma

RE: receptor de estrogênio

RNA: ácido Ribonucleico

SBF: soro fetal bovino

SDS: dodecil sulfato de sódio

SH-SY5Y: linhagem celular de neuroblastoma humana

SKOV-3: linhagem celular de câncer de ovário humana

T47D: linhagem celular de câncer de mama humana

TNF: fator de necrose tumoral

TNFR: receptor do fator de necrose tumoral

TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

UV: radiação ultravioleta

VEGF: crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **22**
2.1 Aspectos gerais do câncer 23
2.2 Câncer de mama 27
2.2.1 Tratamento para o câncer de mama 30
2.3 Apoptose 33
2.4 Estresse oxidativo e o câncer 36
2.7 Produtos naturais e seus derivados como fonte de moléculas antitumorais 38
2.6 Óleo de copaíba 40
2.7 Nanopartículas no tratamento oncológico 43
2.7.1 Nanopartículas poliméricas no tratamento oncológico 44
3 OBJETIVOS **47**
3.1 Objetivo geral 48
3.2 Objetivos específicos 48
4 MATERIAL E MÉTODOS **49**
4.1 Local da pesquisa 50
4.2 Material 50
4.2.1 Substâncias e reagentes 50
4.2.2 Equipamentos 51
4.2.3 Obtenção do óleo de copaíba 51
4.2.4 Cultivo celular 52
4.3 Métodos 52
4.3.1 Estudo de pré-formulação 52
4.3.2 Caracterização da formulação 53
4.3.2.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI) 53
4.3.2.2 Potencial zeta 54
4.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 54
4.3.2.4 Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 54
4.3.2.5 Determinação da eficiência de encapsulação e doseamento de NPOC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 55
4.3.2.6 Estudo de estabilidade 55

4.3.3 Estudo de internalização celular 56

4.3.4 Estudo de citotoxicidade de NPOC em linhagens tumorais e não tumorais e obtenção do índice de seletividade (IS) 56

4.3.5 Estudo de morte celular induzida por NPOC 57

4.3.6 Estudo de alterações nucleares induzidas por NPOC 58

4.3.7 Estudo do potencial de membrana mitocondrial por JC-1 58

4.3.8 Estudo de indução de estresse oxidativo por NPOC 59

4.3.9 Estudo de citotoxicidade de NPOC em modelo de cultura celular tridimensional de esferoides 59

4.4 Análise estatística 60

5 RESULTADOS 61

5.1 Pré-formulação e caracterização do diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta 62

5.2 Caracterização de NPOC por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 63

5.3 Caracterização de NPOC por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 63

5.4 Determinação da eficiência de encapsulação e doseamento de NPOC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 66

5.5 Estabilidade de NPOC 66

5.6 Internalização celular de NPOC 67

5.7 Citotoxicidade de NPOC em linhagens tumorais e não tumorais e obtenção do índice de seletividade (IS) 69

5.8 Tipo de morte celular induzida por NPOC em microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo 75

5.9 Alterações nucleares induzidas por NPOC em microscopia confocal após coloração com *Hoechst* 34580 78

5.10 Potencial de membrana mitocondrial com o tratamento de NPOC em microscopia confocal após coloração com JC-1 80

5.11 Indução de estresse oxidativo pela avaliação da citotoxicidade do NPOC na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) 82

5.12 Citotoxicidade de NPOC em modelo de cultura celular tridimensional de esferoides 83

6 DISCUSSÃO 88

7 CONCLUSÕES 100

8 REFERÊNCIAS 103

9 ANEXOS 115

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como uma colônia de células que sofre proliferação descontrolada de um tecido previamente normal, adquirindo propriedades invasivas e metastáticas. Os fatores para o desenvolvimento tumoral podem ser hereditários ou ambientais e geralmente estes coexistem, no entanto, para desenvolvimento do câncer é necessário um acúmulo de mutações (Vaghari-Tabari *et al.,* 2020).

Segundo o Global Cancer Observatory (Globocan, 2024), foram registrados 19,3 milhões de casos novos de câncer no mundo no ano de 2020. Já no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2023), apontou que entre os anos de 2023-2025 a estimativa é que ocorram 704 mil casos novos, sendo o câncer de mama o segundo mais incidente.

O câncer de mama é um tumor maligno caracterizado por heterogeneidade molecular e morfológica, que pode ser classificado em quatro subtipos, de acordo com a expressão dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (PR), e o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). São eles o tipo luminal A (RE+ e/ou PR+), luminal B (RE+ e/ou PR+, sendo mais agressivo), HER2+ (RE-, PR- e HER2+) e por último o triplo negativo (RE-, PR- e HER2-) (Tong *et al.,* 2018; Godoy-Ortiz *et al.,* 2019).

Como estratégias de tratamento para o câncer de mama, tem-se a cirurgia de retirada do tumor, radioterapia ou intervenções medicamentosas, com o uso de agentes quimioterápicos, a exemplo das classes de antimetabólitos (por exemplo, metotrexato), os agentes interativos de DNA (cisplatina e doxorrubicina), agentes antitubulina (paclitaxel e docetaxel); além hormonioterapia (tamoxifeno) e terapia alvo (por exemplo, trastuzumabe) (Waks; Winer, 2019; Joshi & Press, 2018; Bukowski; Kciuke; Kontek, 2020). Apesar das alternativas existentes, as terapias para o câncer de mama nem sempre são eficazes e estão associadas a certas limitações, como toxicidade sistêmica, taxa de resposta insatisfatória e resistência aos fármacos já utilizados (Xie; Chen; Fang, 2020). Diante disso, existe uma busca pela obtenção de novas terapias para o câncer de mama.

Uma importante fonte de medicamentos são os produtos naturais e os seus derivados. Nos últimos anos, vários fármacos derivados de produtos naturais, como a vincristina e paclitaxel, foram descobertos como quimioterápicos e hoje são amplamente utilizados na clínica (Lima *et al.*, 2019). Além disso, vários derivados de

produtos naturais possuem atividade antitumoral reportada na literatura, a exemplo de extratos, moléculas isoladas e óleos essenciais (An *et al*., 2023; Li *et al*., 2023).

Nesse contexto, o óleo de copaíba, proveniente da família Leguminosae e gênero *Copaifera,* é encontrado em muitas regiões da América Latina e África Ocidental, sendo encontrado, no Brasil, principalmente na região Amazônica. Com composição química basicamente de sesquiterpenos e diterpenos, possui atividades biológicas conhecidas como anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante, bactericida e antitumoral (Pieri; Mussi; Moreira, 2009; Silva, 2019). Apesar disso, suas características físico-químicas, como a sua elevada lipofilicidade e volatilidade, dificultam o seu uso clínico.

Nesse sentido, o sistema de transporte de drogas utilizando a nanotecnologia é uma estratégia tecnológica em potencial para o tratamento anticancerígeno, que objetiva melhorar a biodisponibilidade, superar os efeitos colaterais tóxicos e melhorar a farmacocinética, por meio do encapsulamento de compostos em nanopartículas que podem ser direcionadas ao tumor (Abdolmaleki *et al.,* 2021; Nagaraju *et al.,* 2021).

Assim, as nanocápsulas poliméricas têm sido consideradas promissoras para o carreamento de diversos tipos de moléculas terapêuticas, podendo aumentar a biodisponibilidade de produtos pouco solúveis em água e fornecer sua liberação sustentada (Neves *et al.,* 2022).

Diante da alta incidência global e significativa mortalidade associadas ao câncer de mama, além das limitações dos tratamentos atualmente disponíveis, este trabalho tem como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade anticancerígena de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de copaíba. A utilização do óleo de copaíba em sistemas nanoestruturados visa potencializar sua eficácia terapêutica, oferecendo uma abordagem promissora para o tratamento dessa doença.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

A proliferação celular é a base de crescimento para todas as unidades estruturais e seres vivos, sendo mediada por mitoses para que tecidos e órgãos sejam formados. Essa proliferação deve ser perfeitamente regulada com produção de fatores de crescimento celular ou fatores inibidores, respeitando a homeostasia e eficientemente regulando a proliferação celular, além de responder às necessidades do organismo (Al-Bedeary, Getta, Al-Sharaf, 2020).

O ciclo celular é regulado por vias de sinalização específicas, que podem reconhecer células que sofreram alterações genéticas e/ou epigenéticas (Matthews; Bertoli; Bruin, 2022). Diferentes vias de sinalização controlam o crescimento celular, seu metabolismo, a morte celular e o microambiente tumoral, como angiogênese e inflamação (Hisada; Mackman, 2019).

A sinalização desregulada durante o processo de divisão celular pode levar a formação de tumores, ou seja, as células passam a escapar da homeostase que suprime a proliferação desordenada e se proliferam com características modificadas, indiferenciadas e mutadas (Eldehna *et al*., 2021).

Os tumores formados podem ser de caráter maligno ou benigno, sendo o último caracterizado por células morfologicamente semelhantes ao tecido de origem, com crescimento ordenado e sem invasão de tecidos adjacentes (Boutry *et al*., 2022). Já os tumores malignos possuem morfologia anormal, crescendo rapidamente e podendo causar metástases, ou seja, alcançando a corrente sanguínea e linfática e se instalando em outras regiões do corpo (Ahmad; Ahsan, 2020).

Os tumores malignos, denominados de câncer, são doenças com alta complexidade genética, com mutações em mais de 250 genes, ocasionadas quando existem padrões anormais de expressão gênica (Nenclares; Harrington, 2020). O principal mecanismo de alteração é o acúmulo de mutações genéticas e epigenéticas (como metilação do DNA). Essas alterações levam a mudanças de processos biológicos nas células cancerígenas, atribuindo características que facilitam a sua sobrevivência e proliferação (Hanahan, 2022).

O câncer é considerado um grave problema socioeconômico e de saúde pública, que envolve fatores relacionados ao crescimento e ao envelhecimento populacional, além de mudança na prevalência dos fatores de risco (sedentarismo,

alimentação inadequada, entre outros) (Bray, 2018), sendo caracterizado atualmente como a segunda principal causa de mortalidade no mundo (Molejon *et al*., 2020).

Apenas em 2020, quase 10 milhões de casos de mortes foram registradas em todo mundo, dos quais os tipos mais presentes foram o câncer de mama (2,26 milhões de casos), de pulmão (2,21 milhões de casos), de cólon e reto (1,93 milhão de casos), próstata (1,41 milhão de casos) e pele (1,20 milhão de casos) (Ferlay *et al*., 2021). Estimativas sugerem que em 2030, a carga global será 22,2 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes em todo o mundo (OMS, 2018).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2023-2025 apontava que ocorreriam 704 mil casos novos de câncer (INCA, 2023). O câncer melanoma é o mais incidente, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelos cânceres de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%) (INCA, 2023).

Em relação a etiologia, o câncer possui desenvolvimento que abrange fatores endógenos e fatores exógenos, ou seja, ambientais. Os fatores endógenos estão associados a mutações durante a replicação do DNA no processo de divisão celular, sendo responsáveis por até 30% dos casos de câncer, incluindo distúrbios genéticos hereditários. Alguns fatores exógenos são radiação ultravioleta e ionizante, estilo de vida e hábitos alimentares, além de sedentarismo, características estas que podem levar a acúmulo de alterações genéticas, principal causa de carcinogênese (Langevin; Kelsey, 2020; Shankar; Gupta, 2019).

A patogênese neoplásica é um processo complexo que pode ser dividido em três fases distintas: iniciação, promoção e progressão (**Figura 1**). Durante as três etapas ocorrem mudanças genéticas, sendo as etapas de iniciação e promoção marcadas por apoptose (morte celular programada) e proliferação equilibradas, enquanto que na progressão o equilíbrio é modificado para surgir a malignidade (Majumder *et al*., 2020).

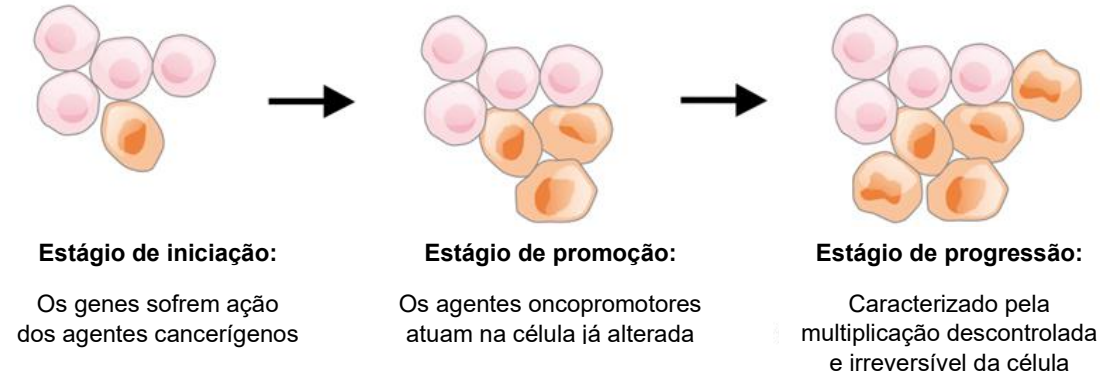
A iniciação tumoral é causada por alterações genéticas e/ou epigenéticas irreversíveis, envolvendo fatores endógenos e exógenos, que predispõem células normais suscetíveis à evolução maligna e imortalidade. Essas alterações podem ativar proto-oncogenes, como RAS e MYC, além de inibir genes supressores de tumor, como os que codificam a proteína p53 e retinoblastoma (Rb), gerando novos fenótipos que conferem uma transformação de uma célula normal para célula modificada (Liang *et*

al., 2019; Napoli; Flores, 2020). Nesta fase, as células iniciadas podem permanecer latentes por semanas, meses ou anos, ou podem crescer de forma autônoma e clonal (Lopez; Bleich; Arthur, 2020).

A promoção neoplásica é definida como a etapa em que as células iniciadas desenvolvem maior capacidade proliferativa. Os agentes promotores aumentam essa proliferação celular em tecidos susceptíveis, contribuem para a fixação de mutações, potencializam alterações na expressão genética e causam alterações no controle do ciclo celular (Lopez; Bleich; Arthur, 2020). O promotor deve estar presente por semanas, meses e anos para ser eficaz e sua eficácia depende de sua concentração no tecido alvo (Ahmad; Ahsan, 2020).

A última etapa da patogênese neoplásica, a progressão, é a etapa irreversível e agressiva, resultando na instalação do tumor. Além disso, a progressão é caracterizada por instabilidade genética, crescimento mais rápido, e independente de estímulo, invasão, metástase, e alterações nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas das células (Lopez; Bleich; Arthur, 2020).

Figura 1. Etapas da carcinogênese



Fonte: Adaptado de Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2011.
Legenda: A carcinogênese é dividida em três etapas: iniciação, que envolve fatores endógenos e exógenos, responsáveis por promover alterações genéticas e/ou epigenéticas, podendo ativar proto-oncogenes e inibir genes supressores de tumor, responsáveis pela transformação da célula normal para célula modificada. A fase seguinte, a promoção, envolve um agente promotor que induz a proliferação das células transformadas na fase anterior, e por último a fase de progressão, etapa irreversível e agressiva que resulta na instalação do câncer.

Apesar de existirem diversos tipos distintos de câncer, a partir de 2000, Hanahan e Weinberg começaram a descrever as alterações cancerígenas que explicam amplamente o comportamento maligno dos diversos cânceres. Dentre as principais características ("*hallmarks*") do câncer atualmente, estão: (I) fuga de

supressores do crescimento, para maior crescimento e proliferação celular; (II) reprogramação epigenética não mutacional; (III) evasão da destruição imune, atribuída a mudança do microambiente pelas células tumorais, capazes de desativar os componentes do sistema imune; (IV) imortalidade replicativa, ou seja, indução de uma resistência da senescência ou crise/apoptose; (V) inflamação promotora do tumor; (VI) microbiomas polimórficos; (VII) ativação da invasão e metástase; (VIII) indução ou acesso à angiogênese, o que dá suprimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento do tumor, além de favorecer metástases; (IX) células senescentes; (X) instabilidade genômica e mutação; (XI) resistência à morte celular; (XII) desregulação do metabolismo celular, promovendo independência funcional para o tumor; (XIII) sinalização proliferativa sustentada, sem necessidade de ligantes ou estimulantes; e (XIV) desbloqueio da plasticidade fenotípica (**Figura 2**) (Hanahan, 2022).

Figura 2. Características biológicas do câncer

Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.
Legenda: *Hallmarks*, ou características, do câncer. São eles: sinalização proliferativa sustentada, fuga de supressores de crescimento. Reprogramação epigenética mutacional, evitar destruição imune, habilidade para imortalidade replicativa, inflamação promotora do tumor, microbiomas polimórficos, ativação da invasão e metástase, indução ou acesso à vascularização, células senescentes, instabilidade genômica e mutação, resistência à morte celular, desregulação do metabolismo celular e desbloqueio da plasticidade fenotípica.

Estas características desenvolvidas pelas células tumorais compreendem capacidades biológicas distintas, que podem ser adquiridas durante o processo de desenvolvimento do tumor, e são capazes de proporcionar sobrevivência, proliferação e disseminação de maneira descontrolada (Hanahan, 2022; Zefferino *et al.,* 2019).

2.2 Câncer de mama

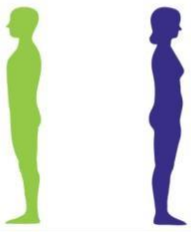
O câncer de mama é um dos principais cânceres mais incidentes do mundo, com altas taxas de mortalidade e morbidade. Apesar dos tratamentos disponíveis, existe uma pequena taxa de sobrevivência para o câncer de mama metastático, abaixo de 30% (Kashyap *et al*., 2022).

Este tumor lidera globalmente em incidência, representando 11,7% dos casos globais. Em 2020, foram registrados 2,3 milhões de novos casos, correspondendo a 24,5% dos cânceres em mulheres (excluindo câncer de pele não melanoma). Os continentes mais afetados foram América do Norte, Oceania e países da Europa Ocidental (Ferlay *et al.,* 2021; Sung *et al*., 2021).

No Brasil, ocorreram, em 2020, 17.825 óbitos por câncer de mama feminina (INCA, 2023). O número estimado de casos novos de câncer de mama no Brasil, para o triênio de 2023 a 2025, é de 73.610 casos (INCA, 2023). Em homens, estima-se que os tipos de câncer mais frequentes serão próstata, com 72 mil (30,0%) e cólon e reto, com 22 mil (9,2%). Em mulheres, os mais incidentes serão mama, com 74 mil (30,1%); cólon e reto, com 24 mil (9,7%); colo do útero, com 17 mil (7,0%) (**Figura 3**) (INCA, 2023).

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%
Cólon e reto	21.970	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%
Estômago	13.340	5,6%
Cavidade oral	10.900	4,6%
Esôfago	8.200	3,4%
Bexiga	7.870	3,3%
Laringe	6.570	2,7%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%
Fígado	6.390	2,7%



Localização Primária	Casos	%
Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	23.660	9,7%
Colo do útero	17.010	7,0%
Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Glândula tireoide	14.160	5,8%
Estômago	8.140	3,3%
Corpo do útero	7.840	3,2%
Ovário	7.310	3,0%
Pâncreas	5.690	2,3%
Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2023

Esse tipo de tumor engloba diversas características biológicas distintas, marcadas por uma variabilidade na patologia, mudanças genômicas, padrões de expressão gênica e no microambiente tumoral. Esses fatores interagem e determinam tanto o comportamento clínico quanto a eficácia das terapias (Nolan; Lindeman; Visvader, 2023).

Os tumores de mama são classificados pela histologia como carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo: o carcinoma ductal *in situ* é a forma mais recorrente de câncer de mama pré-invasivo, seguido pelo carcinoma lobular *in situ*. Os carcinomas invasivos representam um grupo diverso de doenças, classificadas de acordo com a morfologia celular. O tipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo (60% a 75% dos casos), seguido pelo carcinoma lobular invasivo (10% a 15% dos tumores) (Nolan; Lindeman; Visvader, 2023).

O adenocarcinoma é um subtipo de carcinoma que se desenvolve nas células glandulares da mama, responsáveis pela produção de secreções, como o leite. São o tipo mais comum de carcinoma de mama, já que tanto os ductos quanto os lóbulos são compostos por células glandulares, podendo ser ductal ou lobular (Kashyap *et al.,* 2022).

Com base nos tipos de receptores superexpressos, o câncer de mama é classificado em sub-grupos: Luminal A, com expressão de receptor hormonal de estrogênio ou receptor hormonal de progesterona, ou seja, RE+ ou PR+; Luminal B, com expressão de receptores hormonais, porém mais agressivo; HER2+, com superexpressão de receptor epidérmico humano 2; e o câncer de mama triplo negativo, ou seja, que não apresenta nenhum desses receptores (Barzaman *et al.,* 2020). Os cânceres RE+ correspondem a aproximadamente 70% de todos os cânceres de mama, enquanto HER+, cerca de 15%, assim como o tipo triplo negativo (**Quadro 1**) (Kashyap *et al.,* 2022; Nolan; Lindeman; Visvader, 2023; INCA, 2023). Estes receptores são responsáveis pelo crescimento e proliferação celular no processo tumoral e podem ser alvos terapêuticos.

Quadro 1. Classificação molecular do câncer de mama

Subtipo	Receptor	Prevalência	Subcategoria
Hormonal postivo	RE+ ou PR+	70%	Luminal A e B
HER2 postivo	HER2+	15%	-
Triplo negativo	RE-, PR- e HER-	15%	Basal-like 1, basal-like 2, imunolodulatória, mesenquimal, mesenquimal célula tronco-like, e receptor de androgênio luminal

Fonte: Adaptado de Barzaman *et al.*, 2020.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama incluem: a idade tardia de gravidez e menopausa, dieta desequilibrada e baixa atividade física. Outro forte fator em mulheres na pós-menopausa é a obesidade. O câncer de mama pode surgir devido ao acúmulo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) no tecido adiposo da mama. Estes compostos interagem com os receptores de estrogênio nas células mamárias, potencialmente elevando o risco de desenvolvimento da doença (Kashyap *et al*., 2022).

Além disso, um estudo descobriu que o consumo moderado de álcool aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de mama, uma vez que o álcool é metabolizado em acetaldeído e este pode interferir no sistema de defesa antioxidante, síntese de DNA e sistema de reparo ao regular negativamente o BRCA1 (gene breast cancer 1) (Dumitrescu & Shields, 2005). Medicamentos anticoncepcionais, apesar de conter baixas concentrações de estrogênio, podem colocar as mulheres em alto risco com o uso a longo prazo (White, 2018).

Outros fatores de risco incluem tabagismo, podendo induzir mutações genéticas, como mutação do gene p53 e adutos de DNA; menopausa tardia, devido ao início tardio da involução mamária e exposição prolongada ao estrogênio e à progesterona; além de menarca precoce, pois as células mamárias tendem a crescer e se dividir, aumentando o risco de câncer de mama. Mutações no gene BRCA1/2 advindas de histórico familiar também podem levar ao desenvolvimento da doença (Kashyap *et al*., 2022).

A principal manifestação clínica do câncer de mama em cerca de 59,5% dos casos é a presença de nódulo palpável nas mamas. Outras manifestações incluem achados mamográficos relacionados ou não à secreção mamilar, retração da pele da mama e enduração. Os sintomas mais frequentes incluem dor, edema e hiperemia na região, além de secreção mamilar, com 84% dos casos apresentando lesão palpável (Cruz *et al.,* 2023).

Para a identificação do tumor, além do exame clínico das mamas, são realizados exames de imagem, como mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética. O diagnóstico definitivo é obtido por meio da biópsia, um procedimento que envolve a coleta de uma amostra de tecido da área afetada (Sartori & Basso, 2019).

Além disso, os avanços nas técnicas moleculares auxiliam o diagnóstico do câncer de mama e facilitam a escolha do tratamento, de forma que os métodos histopatológicos tradicionais são combinados com testes moleculares específicos para uma classificação mais precisa dos subtipos moleculares do câncer de mama (Kashyap *et al.,* 2022).

2.2.1 Tratamento para o câncer de mama

Conhece-se atualmente diversas modalidades de tratamento para o câncer, tais como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo e hormonal, transplantes e imunoterapia (Pajuelo-lozano *et al.,* 2018). A abordagem a ser utilizada dependerá da escolha a partir da observação de estadiamento da doença.

O tratamento para o tumor mamário pode ser classificado em local e sistêmico, a depender do estadiamento que o paciente se encontra. O tratamento local envolve cirurgia de retirada do tumor e radioterapia. Nesse caso, para o câncer não metastático, os principais objetivos da terapia são erradicar o tumor da mama e dos linfonodos regionais, além de prevenir a recorrência metastática (Waks & Winer, 2019; Sartori & Basso, 2019).

A terapia sistêmica para o câncer de mama não metastático inclui hormonioterapia para pacientes com neoplasia mamária RE+, podendo ser associado a quimioterapia; terapia alvo direcionada a HER2 em pacientes HER2+, combinada com quimioterapia; e quimioterapia isolada para câncer de mama do tipo triplo negativo (Waks & Winer, 2019).

Para o câncer de mama metastático, as condutas clínicas se repetem, no entanto com o objetivo de reduzir sintomas e prolongar a vida, uma vez que atualmente continua incurável em praticamente todos os pacientes afetados (Barzaman *et al.,* 2020).

A cirurgia de retirada do tumor tem como finalidade a remoção total do sítio tumoral, para que haja cura do paciente, ou até mesmo de maneira paliativa, quando o objetivo é reduzir a quantidade de células tumorais para controle de sintomas, aumento da qualidade de vida e sobrevida dos pacientes. Essa estratégia terapêutica é utilizada principalmente em tumores localizados e sem metástase (INCA, 2020).

Já a radioterapia é um tratamento com a utilização de radiações ionizantes, que tem como finalidade destruir as células do tumor ou impedir que estas continuem com a multiplicação desenfreada característica. O tratamento radioterápico pode ser utilizado com a intenção curativa ou paliativa e o esquema de aplicação dependerá de cada caso. Sozinho ou em combinação, é usado em mais de 50% dos casos para tratar indivíduos com diversos tipos de câncer (Sawada; Dias; Zago, 2004).

A hormonioterapia neutraliza o crescimento tumoral por ação antiestrogênica, como o fármaco tamoxifeno, modulador seletivo do receptor de estrogênio, inibindo a ligação deste com seu receptor e bloqueando o crescimento tumoral. Outros exemplos incluem inibidores da aromatase, como anastrozol e letrozol, que inibem a conversão de andrógenos em estrogênio, reduzindo os níveis circulantes deste hormônio (**Quadro 2**) (Joshi; Press, 2018).

Quadro 2. Principais agentes terapêuticos utilizados no câncer de mama

Agente terapêutico	Mecanismo de ação	Efeitos tóxicos
Hormonioterapia		
Tamoxifeno	Inibe competitivamente a ligação do estrogênio ao seu receptor	Ondas de calor, doença tromboembólicas
Letrozole, anastrozole	Inibe a conversão de andrógenos em estrogênio	Ondas de calor, artralgias, mialgias, osteoporose
Quimioterapia		
Docetaxel, paclitaxel	Inibe a mitose cellular por interromper o dinamismo dos microtúbulos	Astenia, mielossupressão, mialgias, náuseas
Ciclofosfamida	Agente alquilante de DNA, impedindo a replicação do DNA	Astenia, mielossupressão, náuseas
Doxorrubicina	Interage com a enzima Topoisomerase II, causando danos ao DNA; geração de radicais livres	Cardiotoxicidade, astenia, alterações intestinais, náuseas
Metotrexato	Inibe o metabolismo do ácido fólico	Mielossupressão, fadiga, complicações pulmonares, náuseas
Terapia alvo		
Trastuzumabe	Inibe o receptor HER2	Artralgia, mialgia, plaquetopenia
Neratibine	Inibe tirosina quinase de vários receptores HER	Náuseas, fadiga, dor abdominal
Pertuzumabe	Inibe o receptor HER2	Náuseas, mialgias

Fonte: autoria própria.

Já a terapia alvo para câncer de mama do tipo HER2+ inclui o uso do trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que se liga a estes receptores superexpressos nas células tumorais. O neratinibe é um inibidor oral de tirosina quinase de molécula pequena de vários membros da família HER, incluindo o HER2. Além disso, o pertuzumabe é outro anticorpo com capacidade de se ligar ao receptor HER2 e impedir que este se dimerize, impedindo suas ações de proliferação e crescimento tumoral (**Quadro 2**) (Waks; Winer, 2019).

Dentre as abordagens terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer, a quimioterapia é uma das mais comuns. Dependendo do mecanismo de ação, os quimioterápicos podem ser divididos em agentes alquilantes, como ciclofosfamida, promovendo danos ao DNA; antimetabólitos, como o metrotexato, que atuam no bloqueio da síntese do DNA; e produtos naturais, como os alcaloides da vinca, antibióticos e taxanos, os quais induzem parada do ciclo celular e apoptose (Bukowski; Kciuke; Kontek, 2020).

A quimioterapia do câncer de mama inclui antraciclinas, como a doxorrubicina; taxanos, como o paclitaxel e docetaxel; além da ciclofosfamida e metotrexato, bastante utilizada em tumores mamários (**Quadro 2**) (Waks; Winer, 2019)

Apesar das estratégias de tratamento, as células tumorais são capazes de desenvolver fenômenos de resistência aos medicamentos, com diminuição da absorção, diminuição da ativação, aumento do efluxo do fármaco, alteração da proteína alvo, aumento do reparo do DNA, inibição de apoptose e aumento do metabolismo do fármaco (Bukowski; Kciuke; Kontek, 2020; Vidal *et al.,* 2014).

Segundo Alberts *et al.* (2009), o aumento da heterogeneidade das células tumorais ao longo do processo de carcinogênese é devido a elevadas taxas de mutações genéticas, o que impossibilita a existência de um tratamento único e universal para o câncer. Assim, a instabilidade genética é o principal fator para muitos cânceres desenvolverem resistência aos tratamentos. Essa resistência continua sendo um obstáculo ao tratamento bem-sucedido do câncer (Rocha, 2014).

2.3 Apoptose e câncer

A apoptose é um processo de morte celular programada das células para manutenção da homeostase, permitindo a eliminação de células indesejadas e favorecendo a regulação do crescimento (D'arcy, 2019). Esse tipo de morte celular

ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento, além de ser um mecanismo de defesa, como nas reações imunes ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (Yan; Elbadawi; Efferth, 2020).

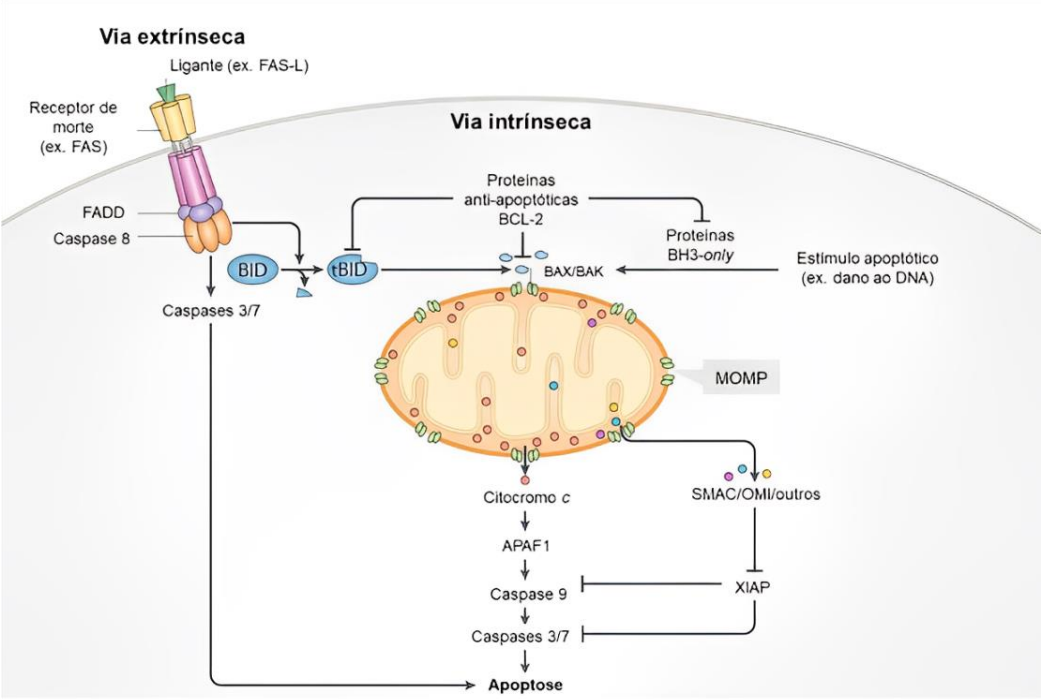
A apoptose e crescimento celular em tecidos saudáveis são bem regulados e o processo de desregulação está associado a diversas doenças, dentre elas, o câncer (Yu *et al.,* 2019). A indução de apoptose como resultado de danos no DNA, como ocorre em lesões pré-cancerosas, pode remover células nocivas, impedindo o crescimento tumoral. A desregulação desse processo está associada a proliferação celular descontrolada, com desenvolvimento do tumor (Morana; Wood e Gregory, 2022).

A apoptose é caracterizada por alterações intracelulares específicas: nos estágios iniciais é caracterizada por condensação de cromatina, fragmentação do DNA e mudanças membranares, como externalização de fosfatidilserina; já nas fases tardias, são formados os corpos apoptóticos, com desintegração nuclear e citoplasmática, assim como perda da integridade da membrana plasmática (Bock; Tait, 2020).

O processo apoptótico é controlado por proteases intracelulares especializadas em clivar sequências específicas de proteínas, as caspases, as quais dependem da integração e equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (Gilmore; King, 2019). As caspases são essenciais para o mecanismo de apoptose, pois são iniciadoras, como no caso das caspases 2, 8, 9 e 10, e executoras, como as caspases 3, 6 e 7, sendo responsáveis por levar a processos de fragmentação do DNA, ativação de endonucleases, destruição de proteínas nucleares e citoesqueleto, expressão de ligantes para células fagocíticas e, por fim, formação dos corpos apoptóticos (Bock; Tait, 2020).

A apoptose pode ser ativada por sinais extracelulares ou intracelulares, sendo distinguida em duas vias distintas: via extrínseca, que capta sinais como indutores de morte produzidos por células T citotóxicas do sistema imune em resposta às células danificadas ou infectadas por receptores específicos, e via intrínseca, ou mitocondrial, que é ativada por fatores como estresse oxidativo e dano ao DNA. Ambas as vias convergem para ativação das caspases, levando ao processo de morte celular programada (**Figura 4**) (Gilmore; King, 2019).

Figura 4. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose



Fonte: Adaptado de Bock; Tait, 2019.
Legenda: A via intrínseca é desencadeada por estímulos de morte intracelulares, como danos no DNA, radiação e estresse oxidativo, que induzem a apoptose, promovendo a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) e a liberação do citocromo c, formação do apoptossomo e ativação da caspase 9, 3 e 7, possibilitando a execução da apoptose. A via extrínseca é iniciada por ligantes extracelulares que se ligam aos receptores de superfície celular FASR, TNFR TRAILR. A sinalização é transmitida via domínio de morte associado à FAS (FADD), que aciona a ativação da caspase 8 ou caspase 10, iniciando a apoptose por meio da clivagem e ativação da caspase 3 ou caspase 7.

A via extrínseca da apoptose é induzida por interação de sinais de morte com receptores de morte, como o receptor Fas (que possui como ligante o FasL), o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) (cujo ligante é o TNF), e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (Elmore, 2007). Uma vez ligados a seus ligantes, esses receptores recrutam proteínas adaptadoras, como é o caso da FADD (domínio de morte associado a Fas). A formação desse complexo permite a ligação de caspases iniciadora 8 ou 10 através de seu domínio efetor de morte (DED) para formar um complexo ativado chamado complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A ativação dessas caspases leva a ativação de pró-caspases executoras, as quais levarão à morte celular. Além disso, a ativação de caspase 8 é capaz de levar à clivagem do BID, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, amplificando a apoptose (Voss; Strasser, 2020).

Já a via intrínseca é desencadeada por diversos fatores, como estímulos internos (danos genéticos irreparáveis, hipóxia, concentrações extremamente altas de Ca^{2+} citosólico e estresse oxidativo severo) ou ainda fatores como condições de estresse (irradiação, tratamento com agentes quimioterápicos, etc). Tais eventos levam a ativação de proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, as quais neutralizam as proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1. As proteínas Bax/Bak ativadas são translocadas do citoplasma para a mitocôndria, inserindo-se na membrana externa da mitocôndria e induzindo alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial externa (PMEM) (Giacomello *et al.,* 2020), de modo que as proteínas normalmente confinadas no espaço intermembranar se espalham para o citosol (Bock; Tait, 2020).

Essas proteínas incluem os chamados fatores apoptogênicos, como o citocromo c, que desempenha um papel importante ao ligar-se ao fator 1 de ativação da protease da apoptose (Apaf-1) e desencadear a formação do complexo conhecido como apoptosssomo, que por sua vez recruta a caspase 9 para seu domínio de recrutamento de caspase (CARD), permitindo sua ativação. Esse processo ativa as caspases 3, 6 e 7, culminando na morte celular (Elmore, 2007).

A apoptose e os genes que a controlam têm uma influência significativa nos processos de carcinogênese. Dessa forma, a apoptose é a principal forma de morte produzida por agentes antitumorais, os quais induzem esse processo por diferentes vias (Morana, Wood e Gregory, 2022).

2.4 Estresse oxidativo e câncer

O estresse oxidativo refere-se a um estado de desequilíbrio causado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN) (Kruk *et al*., 2019; Sies, 2020). Essas moléculas, caracterizadas por sua alta reatividade devido à presença de elétrons desemparelhados, têm uma tendência a oxidar macromoléculas, o que pode interferir na regulação redox. Como consequência, ocorrem danos moleculares que podem levar ao desenvolvimento de várias doenças, como condições degenerativas, problemas cardiovasculares e câncer (Liguori *et al*., 2018).

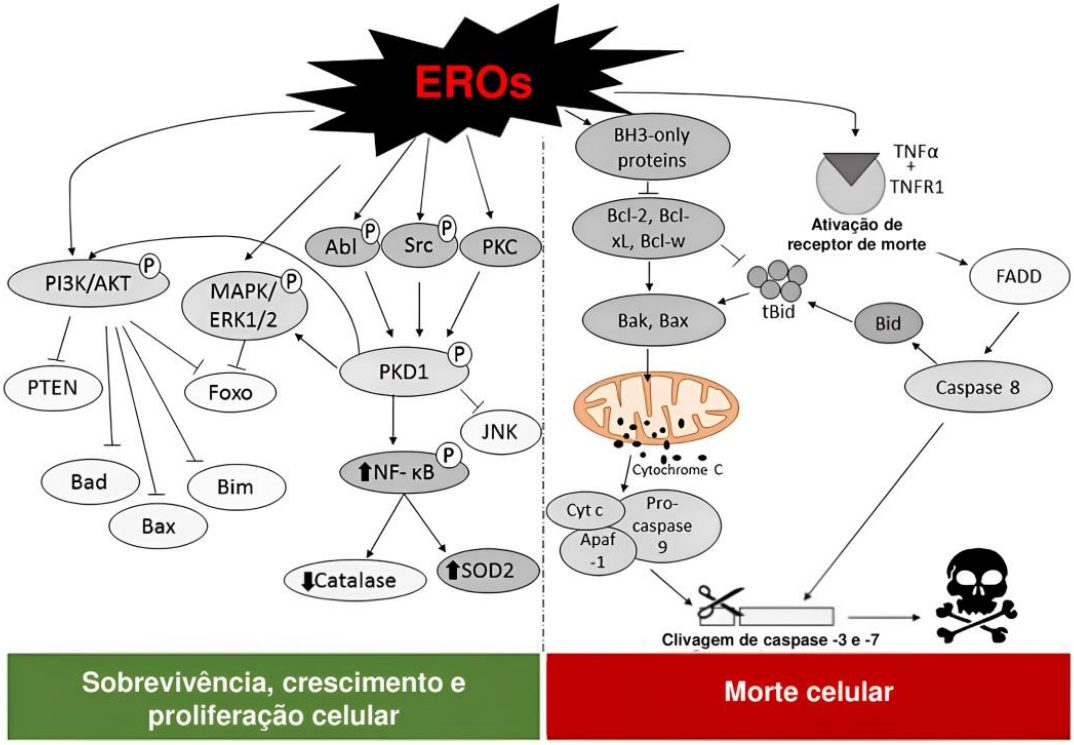
EROs são radicais de oxigênio, como o ânio superóxido (O_2^-), radicais de hidroxila (OH^-), peroxila (RO_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3) e o oxigênio singleto ($^1O_2$). E como exemplo das ERNs, tem-se óxido nítrico (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Liu *et al.,* 2020).

Durante o metabolismo oxidativo, essas moléculas são predominantemente geradas como subprodutos do metabolismo celular, especialmente em peroxissomos, retículo endoplasmático e nas mitocôndrias, onde atuam como sinalizadores que interagem de maneira destrutiva com proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, e podem ser originárias de diferentes locais dentro da célula, resultando em danos moleculares e estresse oxidativo (Perillo *et al*., 2020). Fatores como exposição à radiação ultravioleta (UV), metais pesados, solventes e poluentes também contribuem na geração desses radicais intracelulares (Bodega *et al*., 2019).

Para que as células permaneçam em homeostase, é necessário manter um equilíbrio redox, com função de proteger as estruturas celulares da ação desses radicais. Esse sistema antioxidante age neutralizando os radicais livres e é dividido em: enzimático, contando com enzimas como catalase, peroxirredoxinas, tioredoxinas, glutationa peroxidase e superóxido dismutase; e não enzimático, onde participam proteínas e metabólitos produzidos pelas células (glutationa, bilirrubina, melatonina, ácido úrico), assim como componentes da dieta, a citar as vitaminas A, C e E, o selênio e o β-caroteno (Klieser *et al.,* 2019; Liu *et al.,* 2020).

No câncer, EROs possuem papel dual, sendo necessário uma regulação fina nas células tumorais (Moloney; Cotter, 2018). O aumento de EROs implica em proliferação, sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das células malignas, por regulações de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK) a via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) com Akt e proteínas quinases D (PKD). Mutações em genes que codificam fatores de transcrição, bem como em genes supressores de tumores, como p53, podem igualmente influenciar essas vias de sinalização (**Figura 5**) (Reczek; Chandel, 2018; Moloney; Cotter, 2018). Além disso, na fase de progressão da carcinogênese, níveis elevados de EROs modulam a sinalização do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), promovendo a angiogênese e metástase (Fiocchetti *et al.,* 2019).

Figura 5 - Sinalização induzida por EROs em células cancerígenas



Fonte: Adaptado de Moloney; Cotter, 2018
Legenda: A produção de EROs tem papel dual nas células cancerígenas. Os níveis aumentados de EROs contribuem para a sobrevivência e proliferação celular sustentadas por muitas vias, incluindo PI3K/AKT, MAPK e PKD. Níveis tóxicos de EROs causa morte celular por vias de apoptose intrínseca ou extrínseca, resultando na liberação e translocação do citocromo C para o citoplasma, resultando em apoptose.

Apesar disso, aumento excessivo de EROs nas células podem induzir a parada do ciclo celular e apoptose. Esse mecanismo pode ser explicado pela ativação de vias como JNK, que leva a ativação das vias intrínsecas ou extrínsecas da apoptose, uma vez que achados indicam que em células tumorais a via da JNK está desativada (Figura 5) (Liu *et al.,* 2020). Assim, alguns fármacos quimioterápicos, como a doxorrubicina (Davalli *et al*., 2018) e cisplatina (Yu *et al*., 2020), e a radioterapia agem aumentando os níveis de EROs nas células tumorais, causando danos que leva à apoptose (Chatterjee; Chatterjee, 2020).

Neste contexto, a busca por abordagens terapêuticas e compostos que levem ao aumento de estresse oxidativo nas células tumorais pode ser promissora no tratamento do câncer.

2.5 Produtos naturais e seus derivados como fonte de moléculas antitumorais

Produtos naturais são compostos extraídos de plantas, animais, fungos ou organismos marinhos. A utilização desses compostos advém da antiguidade e são fundamentais para a história da descoberta de diversos agentes terapêuticos hoje utilizados na clínica (Amaral *et al.*, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das pessoas ainda utilizam medicamentos tradicionais à base de plantas para cuidados primários de saúde. Além disso, estudos mostram que 80% das 122 drogas derivadas de plantas estudadas mantiveram a relação com seu uso etnofarmacológico original (Dias; Urban; Roessner, 2012), incluindo atividades antitumorais.

Entre 1940 e 2002, aproximadamente 40% dos fármacos utilizados no tratamento do câncer eram derivados de produtos naturais, como a vincristina e a vinblastina, extraídas da planta *Catharanthus roseus* (Souza *et al.*, 2007). Além disso, a camptotecina, um alcaloide extraído da *Camptotheca acuminata*, levou ao desenvolvimento de derivados semi-sintéticos como o irinotecano e o topotecano, que são utilizados no tratamento de câncer colorretal (Brandão *et al.,* 2010).

Além disso, o estudo conduzido por Newman e Cragg (2016) ressalta a importância das pesquisas com produtos naturais. Entre o início de 1981 e o final de 2014, foram identificadas 136 drogas contra o câncer globalmente, das quais apenas 17% eram completamente sintéticas. Os outros 83% eram produtos naturais, derivados, ou ainda análogos desses compostos.

Esses números podem ser explicados pelo fato de produtos naturais exibirem uma enorme diversidade química, o que proporciona uma ampla gama de mecanismos de ação contra células cancerosas. Compostos como alcaloides, flavonoides e terpenos podem afetar diferentes vias moleculares envolvidas na progressão do câncer (Brandão *et al.,* 2010).

No âmbito microbiológico, por volta de 1941 começaram as pesquisas de isolamento de compostos candidatos a antibióticos antineoplásicos. Na classe das antraciclinas, que foram isoladas de *Streptomyces peucetius* no início da década de 1960, a doxorrubicina e daunorrubicina foram aprovadas para uso clínico e permanecem até hoje como principais quimioterápicos para tratamento de vários tipos de câncer (Amaral *et al.,* 2019).

Alguns organismos marinhos e terrestres também têm se mostrado uma fonte promissora de compostos com atividade antitumoral. Como exemplo, tem-se a ET-743

(também conhecida como trabectedina), isolada do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, um agente alquilante indutor de apoptose em células tumorais. Ela é aprovada para o tratamento de sarcoma de tecidos moles e câncer de ovário recidivante (Costa-Lotufo *et al.*, 2009). Além disso, polissacarídeos, como quitosana, derivados do exoesqueleto de crustáceos e insetos, têm mostrado atividade antiproliferativa em estudos *in vitro* e *in vivo* contra diversos tipos de câncer (Amaral *et al.*, 2019).

Dentre os produtos naturais, os vegetais representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Além disso, o Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta (Kato, 2001).

Um exemplo de descoberta relevante no campo do câncer envolveu substâncias encontradas em espécies vegetais do gênero *Podophyllum*, tradicionalmente utilizadas por populações nativas da América e da Ásia para tratar câncer de pele e verrugas. A partir da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica, foram desenvolvidos o etoposídeo e o teniposídeo, cujas pesquisas experimentais resultaram na incorporação desses compostos na terapia contra o câncer (Carvalho, 2009).

Adicionalmente, o paclitaxel, um dos primeiros fármacos da classe antitumoral dos antimitóticos, foi inicialmente obtido da espécie vegetal *Taxus brevifolia*, sendo hoje um dos fármacos mais conhecidos no tratamento de câncer de mama e ovário (Brandão *et al.*, 2010).

Uma das principais vantagens do uso de produtos naturais e seus derivados, reconhecidos como moléculas de múltiplos alvos, é a possibilidade de abordar um dos maiores desafios na terapia do câncer: a resistência tumoral. Esses compostos podem atuar por meio de duas estratégias principais: aumentar as concentrações intracelulares de quimioterápicos e/ou induzir mecanismos alternativos de morte celular, além da apoptose (Yuan *et al.,* 2017).

Dessa forma, a pesquisa em produtos naturais com atividade antitumoral é extensa e tem apresentado cada vez mais resultados promissores, principalmente devido à infinidade de alvos para estudo.

2.6 Óleo de copaíba

As copaibeiras (**Figura 6**) são árvores pertencentes à família Leguminosae, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera* (Lloyd, 1898), com 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas exclusivamente no Brasil (Veiga Junior; Pinto, 2002). São árvores comuns à América Latina e África Ocidental, sendo encontradas, no Brasil, na região Amazônica principalmente e conhecidas como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva, copai, copaibarana, copaibo, copal, marimari e bálsamo dos jesuítas (Pieri; Mussi; Moreira, 2009).

Figura 6. Árvore de copaíba

Fonte: copaiba.org.br

Da árvore da copaíba é extraído um óleo, de cor que varia de amarelo ouro a marrom. Este provém de canais secretores, localizados principalmente no lenho da árvore, onde são produzidos como defesa contra animais, fungos e bactérias (Pieri; Mussi; Moreira, 2009).

O óleo de copaíba é composto de uma parte sólida resinosa não volátil formada por ácidos diterpênicos responsável por 55 a 60 % do óleo, diluída na outra parte, um óleo essencial composto de sesquiterpenos oxigenados (álcoois) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (Rigamonte Azevedo *et al.,* 2004; Araújo Júnior *et al.,* 2005; Veiga Junior *et al.,* 2005; Oliveira *et al.,* 2006; Ramos, 2006).

Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo de copaíba são β-cariofileno, com ação antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica; β-bisaboleno, sendo antiinflamatório e analgésico; além de α-humuleno; α e β selineno; α-bisabolol; β- elemeno; γ-cadineno; α-cadinol, entre outros (Maciel *et al.,* 2002; Veiga Junior; Pinto, 2002; Oliveira *et al.,* 2006; Ramos, 2006) Segundo Silva *et al.* (2006), o óleo

essencial extraído das folhas da copaibeira possui composição semelhante à da parte volátil sesquiterpênica do óleo-resina, com substâncias como β-cariophileno, cadinol e γ cadineno. Apesar das variações de espécies, a composição química do óleo se mantém estável, como estudos tem demonstrado.

Um método por cromatografia gasosa (CG) desenvolvido por Xavier-Junior *et al.* (2017) observou os componentes β-cariofileno, α-humuleno e óxido de cariofileno em resina de copaíba e óleos essenciais, sendo o β-bisaboleno, β-cariofileno e α-bergamoteno os principais compostos identificados no óleo essencial da espécie *Copaifera langsdorffii*, corroborando com estudos da literatura.

O óleo de copaíba é amplamente utilizado na medicina tradicional por suas propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, cicatrizantes, bactericidas e antitumorais (Brito *et al.,* 2001; Cavalcanti *et al.,* 2006; Lima *et al.,* 2003).

Alguns autores testaram o óleo de copaíba contra células tumorais, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Os resultados demonstraram atividade antiproliferativa e citotóxica frente às células tumorais de câncer gástrico (ACP01) (Goulart, 2016), além de adenocarcinoma pulmonar, endocervical e mamário (Lemes et al., 2017). Além disso, Domingues (2017) verificou que o óleo de copaíba promoveu efeito citotóxico sobre células de carcinoma pulmonar, apresentando menor efeito citotóxico em linhagem murina normal.

Quando administrado em camundongos C57black/6, o óleo de copaíba reduziu o crescimento de células de melanoma (B16F10) injetadas subcutaneamente e também o número de nódulos metastáticos nos pulmões dos animais (Ranieri *et al*., 2015).

Ao testar o isolado do óleo, o ácido caurenoico, em células leucêmicas, Cavalcanti *et al.* (2002) observaram que a concentração teste reduziu em 95% a viabilidade celular. Em linhagens de câncer de mama e células de câncer de cólon houve redução de 45%.

Considerando o grande número de pesquisas de produtos naturais com propriedades medicinais, com destaque às espécies de *Copaifera*, se denota a importância de investigar a fundo atividades biológicas, dando maior enfoque à atividade antitumoral na perspectiva de descoberta de novos compostos para o desenvolvimento de medicamentos antitumorais.

2.7 Nanopartículas no tratamento oncológico

Nanotecnologia pode ser definida como a preparação, estudo do comportamento e exploração das propriedades dos materiais em escala nanométrica, com tamanho variável de 1 a 1000 nanômetros, segundo a *European Medicines Agency* (Robson, 2010; Oliveira, 2022).

Em nanotecnologia, os sistemas de entrega de fármacos (*drug delivery*), possuem como finalidade o aprimoramento das características farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas de diversos tipos de medicamentos conhecidos ou a serem estudados (Venditti, 2017).

Diferentes materiais são utilizados nas formulações nanotecnológicas, estes sendo escolhidos de acordo com características como biodegrabilidade, complexação, encapsulamento, funcionalização da superfície e biocompatibilidade (Dimer *et al.,* 2013). Além disso, fármacos ou compostos naturais podem ser encapsulados por diferentes mecanismos, que incluem solubilização ou retenção na nanopartícula, conjugação ou adsorção (Schaffazick *et al.,* 2003).

Dentre as múltiplas variações presentes na nanotecnologia, os principais sistemas nanotecnológicos aplicados na terapêutica hoje são: os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as micelas e as nanopartículas poliméricas (Dimer *et al.,* 2013).

Nesse sentido, o sistema de transporte de drogas utilizando nanoformulações é uma estratégia tecnológica em potencial para o tratamento anticancerígeno, que objetiva superar os efeitos colaterais tóxicos, melhorar a farmacocinética e o índice terapêutico, além de outros benefícios, por meio do encapsulamento de moléculas em nanopartículas que podem ser direcionadas ao tumor (Abdolmaleki *et al.,* 2021; Nagaraju *et al.,* 2021).

Em condições ideais, as nanopartículas são capazes de transportar o composto encapsulado para um local específico no corpo e, assim, levar à sua atividade terapêutica com o máximo de segurança e especificidade (Dimer *et al.,* 2013). Já os mecanismos que as células podem usar para absorver as nanopartículas são pinocitose, endocitose mediada por clatrina e endocitose dependente de caveolina (Sbalqueiro *et al.,* 2018).

O aumento da eficácia de um tratamento com o uso de nanossistemas pode ser justificado pela maior absorção celular do composto encapsulado, além de

melhora farmacocinética e maior tempo de circulação sanguínea (Aslan *et al.,* 2013). Além disso, Matsumara *et al.* (1986) observaram que ao utilizar nanopartículas em um tumor, houve acúmulo destas no ambiente tumoral, aumentando assim o tempo de contato da droga e maior eficácia do tratamento.

O Brasil possui registo de medicamentos nanotecnológicos regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), avaliando a segurança, eficácia e a melhora terapêutica. Além disso, já foram identificados outros antitumorais comercializados no Brasil (**Quadro 3**), a exemplo de Daunoxome (daunorrubicina lipossomal), Doxil (doxorrubicina lipossomal), Abraxane (paclitaxel), Marqibo (vincristina lipossomal) e Onivyde (Sant'Anna *et al.,* 2013).

Quadro 3. Alguns medicamentos antitumorais nanotecnológicos comercializados Brasil.

Medicamento	Princípio ativo	Indicação	Sistema nanotecnológico
Caelyx	Doxorrubicina	Cânceres	Lipossoma
Daunoxome	Daunorrubicina	Sarcoma de kaposi	Lipossoma
Doxil	Doxorrubicina	Câncer de ovário, sarcoma de kaposi	Lipossoma
Eligard	Leuprolide	Câncer de próstata	Nanopartícula polimérica
Abraxane	Paclitaxel	Câncer de pâncreas	Nanopartícula polimérica
Oncaspar	Pegaspargase	Leucemia linfoblástica aguda	Nanopartícula polimérica
Marqibo	Vincristina	Cânceres	Lipossoma
Onivyde	Irinotecano	Câncer de pâncreas	Lipossoma
Vyxeos	Daunorrubicina e citarabina	Leucemias	Lipossoma

Fonte: Adaptado de Silva, 2019.

2.7.1 Nanopartículas poliméricas no tratamento oncológico

As nanopartículas poliméricas são estudadas para o carreamento de diversos tipos de moléculas terapêuticas, devido à sua excelente biocompatibilidade e

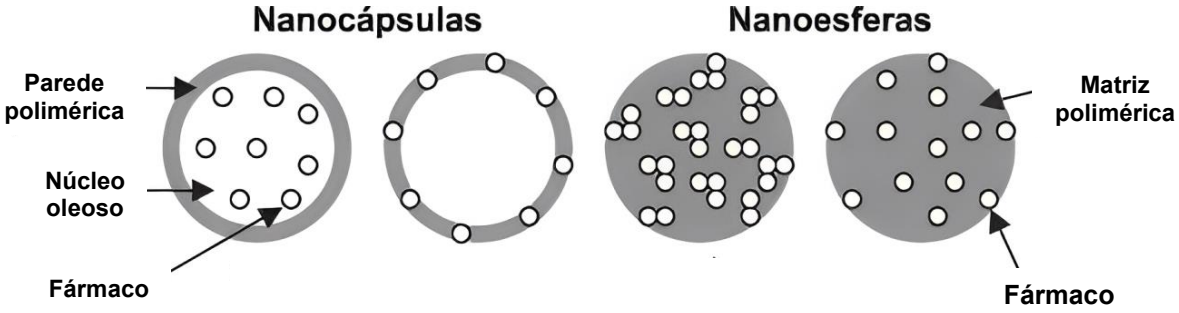
biodegradabilidade, serem não tóxicas, não imunogênicas e de baixo custo (Venditti, 2017). Além disso, podem aumentar a biodisponibilidade de produtos pouco solúveis em água e fornecer sua liberação sustentada (Neves *et al*., 2022).

Nanopartículas à base de polímeros também conseguem permear através de várias barreiras biológicas e ter uma boa estabilidade termodinâmica, além de que sua superfície pode ser modificada para aumentar a interação com o alvo terapêutico no corpo (Zhang *et al.,* 2013).

Esse tipo de sistema carreador possui menos que 1 µm de diâmetro, com a vantagem adicional de suas propriedades físico-químicas poderem ser controladas de acordo com a composição dos monômeros. Os polímeros podem ser sintéticos ou naturais, sendo os mais utilizados nas formulações: poli (ácido lático e ácido glicólico) – PLGA, poli (ácido lático) – PLA, quitosana e policaprolactona (PCL). O fármaco pode encontrar-se dissolvido, retido ou adsorvido na matriz polimérica ou no núcleo oleoso (Neves *et al.,* 2022).

Quanto à classificação, esses carreadores são divididos em dois grandes grupos: sistemas de nanocápsulas, que apresentam um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso; e sistemas de nanoesferas, que são formadas por uma matriz polimérica, onde a substância pode ficar retida ou adsorvida, e não possuem óleo em sua composição (Schaffazick *et al.,* 2003) (**Figura 7**).

Figura 7. Diferença da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: Adaptado de Schaffazick *et al.,* 2003

As nanopartículas poliméricas são aplicadas no tratamento do câncer de mama, ovário, colo retal e pulmão principalmente, com formas de administração injetável, oral e tópico. O principal medicamento utilizado desta categoria é o

Abraxane, composto por nanopartículas de albumina, um polímero natural (Tomuleasa *et al.,* 2014) (**Quadro 3**).

Portanto, considerando as inúmeras vantagens proporcionadas pelas nanopartículas poliméricas, o desenvolvimento de novas formulações desponta como um campo altamente promissor na pesquisa de estratégias inovadoras para o tratamento do câncer.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de uma nova nanopartícula polimérica do tipo nanocápsula contendo óleo de copaíba sobre células de câncer de mama humano.

3.2 Objetivos específicos

- Formular uma nanocápsula contendo óleo de copaíba (NPOC);
- Caracterizar NPOC quanto às suas propriedades físico-químicas e estruturais;
- Determinar a estabilidade físico-química de NPOC;
- Caracterizar NPOC quanto à sua capacidade de internalização celular;
- Avaliar a citotoxicidade de NPOC em linhagens de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231 e MCF-7) e em linhagens de células sadias, como MCF-10A (mama humana) e HEK-293 (rim embrionário humano);
- Comparar a atividade de NPOC com o óleo de copaíba isolado (OC);
- Determinar a CI_{50} e o índice de seletividade (IS) de NPOC e comparar com OC e a droga padrão doxorubicina;
- Avaliar o tipo de morte celular e a via envolvida no efeito de NPOC;
- Investigar o efeito de NPOC no estado redox das células;
- Avaliar a citotoxicidade e capacidade antimigratória de NPOC em modelo de cultivo celular tridimensional.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A obtenção e a caracterização da nanopartícula de óleo de copaíba foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). A nanopartícula foi obtida como dispersão coloidal líquida esbranquiçada, armazenada em frasco de vidro hermeticamente fechado e mantida sob refrigeração.

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de NPOC foi realizada no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), localizado no IPeFarM/UFPB.

4.2 Material

4.2.1 Reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: azul de tripan (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), soro fetal bovino (SBF) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Êxodo Científica®, Sumaré, São Paulo, Brasil), doxorrubicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), iodeto de propídeo (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), anexina V-FITC (Thermo Fisher®, Rochester, New York, EUA), RNAse (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), cloreto de sódio (NaCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de potássio (KCl) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), cloreto de cálcio (CaCℓ2) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), sulfato de magnésio (MgSO4) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), sulfato de sódio (Na2SO4) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO®, Grand Island, New York, EUA), Cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), Hoechst 34580 (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, EUA), cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA),

PCL 80 e Tween80 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), lipoid (Rhineland-Palatinate, Germany), e triglicerídeos de cadeia média (MCT) (Basf Pharma, California, EUA).

As drogas e as soluções reagentes foram preparadas imediatamente antes do uso.

4.2.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: centrífuga Rotina 380R (Hettich®, North Rhine-Westphalia, Alemanha), microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus®, Tóquio, Japão), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu®, São Paulo, Brasil), cabina de fluxo de ar laminar vertical Aeolus V (Telstar®, São Paulo, Brasil), incubadora de CO_2 MCO-18ACL-PA (Panasonic®, Osaka, Japão), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek®, Vermont, EUA), autoclave vertical linha CS-A (Prismatec®, São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo® equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), citômetro de fluxo FacsCanto II (Becton Dickinson®, New Jersey, EUA), estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss®, Baden-Württemberg, Alemanha), câmera fotográfica OverShot A2500 (Canon®, São Paulo, Brasil), evaporador rotativo (IKA® Equipamentos Laboratoriais, São Paulo, Brasil), microscópio confocal de varredura a *laser* (Leica®, Hesse, Alemanha), agitador magnético com aquecimento (Solab Cientifica®, São Paulo, Brasil), banho-maria AQUAline (LAUDA®, São Paulo, Brasil), geladeira DFN49 (Eletrolux®, Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA®, Baden-Württemberg, Alemanha), aparelho tipo Clevenger M480 (Marconi®, São Paulo, Brasil), microscópio Axio Observer A1 (Zeiss®, Baden-Württemberg, Alemanha), Zetasizer LAB (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), UV-VIS SPD-20A (Shimadzu) e espectrofotômetro (Shimadzu, Japão).

4.2.3 Obtenção do óleo de copaíba

O óleo de *Copaifera lagsdorfii* utilizado na pesquisa foi adquirido da Ferquima Indústria e Comércio LTDA, Lote nº 120, e a caracterização química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EMS) pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (BiotecFarm). Os compostos

majoritários do óleo incluíram: α-copaeno, β-elemeno, β-cariofileno, α-humuleno, β-bisaboleno e δ-cadieno (**Anexo 1**).

4.2.4 Cultivo celular

As linhagens celulares MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário triplo negativo humano), HEK-293 (rim de embrião humano saudável) e MCF-10A (células de mama humana sadias), foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

O cultivo celular foi realizado em frascos adequados com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com soro bovino fetal (SBF) 10% e antibiótico 1% (penicilina/estreptomicina). As linhagens foram mantidas em estufa biológica em condições de alta umidade, a 37ºC e 5% CO_2. A manutenção das garrafas de cultivo foi feita a cada 48-72 horas, com trocas de meio e procedimentos de repique utilizando-se tripsina 0,25%, quando necessário, em um ambiente estéril no interior de uma cabine de segurança biológica do Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar/UFPB). Foi adotada a técnica de contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando o reagente azul de tripan 0,4%, para avaliação da viabilidade celular mínima de 90%, antes dos experimentos.

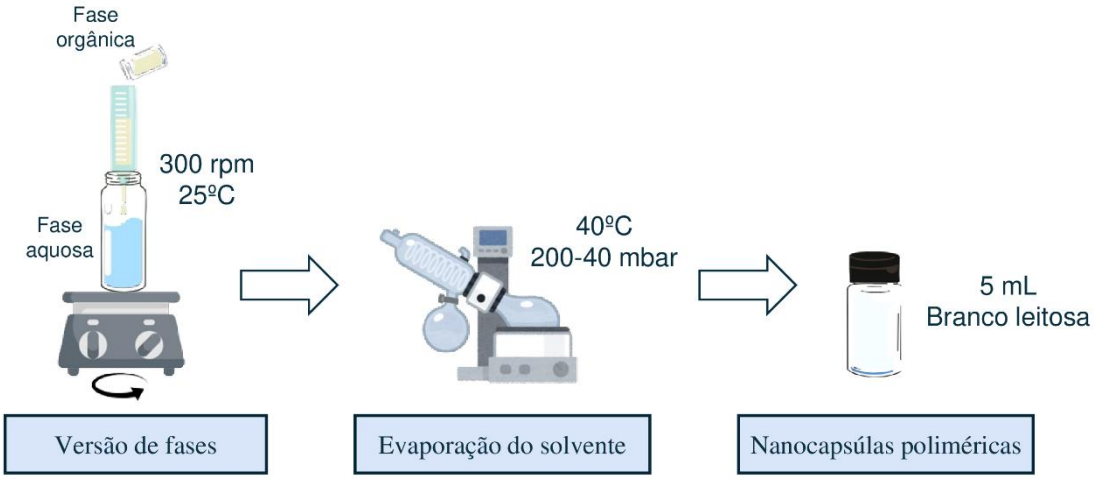
4.3 Métodos

4.3.1 Estudo de pré-formulação

Para a produção das nanopartículas, foi realizado um estudo de pré-formulação de amostras contendo diferentes concentrações dos componentes que integram esses sistemas. A escolha das variáveis independentes levou em consideração os aspectos que interferem na formação eficiente da partícula, sendo elas as concentrações de polímero e óleo na fase orgânica, e tensoativo hidrofílico na fase aquosa (Ebrahimi *et al*., 2021). Assim sendo, como polímero foi utilizado a policaprolactona (PCL, Mw=80 kDa) (30-40 mg), tensoativo hidrofílico, Tween80 (20-60 mg), Lipoid s100 como tensoativo lipofílico (20-40 mg), e como óleo, o óleo de copaíba (OC) (50-200 mg) para formulações de NPOC. Triglicerídeos de cadeia média (200 mg) (MCT) foram utilizados em substituição ao óleo de copaíba, para a obtenção de formulações de NP inertes (NPMCT), utilizando o mesmo protocolo descrito acima, para controle negativo dos experimentos.

A produção das nanocápsulas seguiu o método de polimerização interfacial de Xavier-Junior *et al*. (2018) com adaptações (**Figura 8**), no qual foram preparadas as fases orgânicas contendo as variáveis polímero, óleo e Lipoid s100, dissolvidos em 6 mL de acetona. Esta fase orgânica foi injetada gota a gota em 12 mL de uma solução aquosa contendo o tensoativo hidrofílico Tween80. A dispersão formada foi homogeneizada por agitação magnética em temperatura ambiente. Posteriormente, a formulação foi concentrada para 5mL em rotaevaporador de forma a extrair o solvente e obter o nanosistema concentrado.

Figura 8. Preparação das formulações de NPOC



Fonte: autoria própria.
Legenda: Esquema de formação das nanopartículas por polimerização interfacial. A fase orgânica (PCL, OC, Lipoid) e acetona) foi vertida na fase aquosa (Tween80 e água) sob agitação, seguido por evaporação do solvente.

4.3.2 Caracterização da formulação

4.3.2.1 Diâmetro médio e índice de polidispersão (PDI)

O diâmetro médio de partícula e o índice de polidispersão (PDI) de NPOC foram determinados pela técnica de dispersão de luz dinâmica, ou *Dynamic Light Scattering* (DLS), com o Zetasizer LAB no ângulo fixo de 90° e usando a distribuição de volume a 25 ºC. O PDI mede a distribuição de tamanho dos nanocarreadores, de forma que quanto menor o PDI, mais estreita a distribuição de tamanho. O software Zeta Plus® Particle Sizing versão 3.95 foi utilizado para a análise dos dados. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média.

4.3.2.2 Potencial zeta

O potencial zeta é um indicador de carga de superfície das partículas, e foi determinado a partir da técnica de dispersão de luz eletroforética, ou *Electrophoretic Light Scattering* (ELS), usando o Zetasizer LAB. Esta técnica mede a mobilidade eletroforética, combinando dispersão de luz com eletroforese (Silva, 2015). A dispersão é introduzida em uma célula contendo dois eletrodos, onde um campo elétrico é aplicado através dos eletrodos, e qualquer partícula carregada migrará em direção ao seu eletrodo de carga oposta com uma velocidade que depende de sua carga. A mobilidade eletroforética medida é normalmente convertida em potencial zeta, aplicando a equação de Helmholtz–Smoluchowski. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média.

4.3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia das nanopartículas, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em parceria com a Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PGMTR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para preparar as amostras, as dispersões foram diluídas na proporção de 1:10 e 5 µL da diluição foram depositadas em uma lâmina fixa contendo fita de carbono.

As amostras foram secas em estufa a 37 ºC por 24 horas, metalizadas com ouro, usando um metalizador DESK II (Denton Vacuum) e analisadas usando um MEV (TESCAN, MIRA3, Rep. Tcheca) com uma tensão de aceleração de 20 kV e uma distância de trabalho de 15 milímetros. Também foram realizadas análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), usando um EDS (OXFORD ULTIM MAX 40) acoplado ao MEV (tensão de aceleração de 20kv e distância de trabalho de 5mm).

4.3.2.3 Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Estudos de FTIR foram utilizados de modo a comprovar a estrutura dos nanossistemas. Assim, os espectros de infravermelho de formulação e dos componentes do óleo de copaíba foram registados por espectrofotometria com transformada de Fourier, para a determinação desses grupos funcionais, onde foram analisados a uma varredura de comprimento de onda de 600-4000 cm^{-1} à 25º C.

4.3.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação e doseamento de NPOC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A eficiência de encapsulação refere-se à proporção de uma substância ativa que é eficientemente encapsulada em um sistema de liberação. Já o doseamento refere-se ao processo de determinar a quantidade precisa de uma substância ativa que deve ser administrada para alcançar o efeito terapêutico desejado (Moghimi; Hunter; Murray, 2001).

A quantificação do óleo de copaíba foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um aparelho com detector UV-VIS SPD-20A e coluna C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 um) equipado com uma pré-coluna C-18 (40mm x 4.6 mm, 5 um). A análise foi feita sob fluxo isocrático de 1.8 mL/min na proporção acetonitrila (ACN):água de 95:5. O comprimento de onda utilizado e confirmado por meio de padrão de β-cariofileno foi 207 nm.

A determinação do doseamento da formulação foi realizada por meio de 10 µL das nanopartículas ACN, agitadas em banho ultrassônico e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. Posteriormente, uma diluição utilizando do sobrenadante para uma concentração no intervalo da curva de calibração foi realizada e em seguida analisado por CLAE. A quantificação foi realizada por um método previamente validado para o óleo de copaíba.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada pelo método de ultrafiltração, utilizando-se filtro Amicon® Ultra 0,5 mL submetidos à centrifugação (5.000 rpm/15 minutos). O filtrado foi diluído em ACN e analisado no CLAE. A EE% foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{EE (\%)} = \frac{Quantidade\ total\ do\ composto - Quantidade\ do\ composto\ não\ encapsulado}{Quantidade\ total\ do\ composto} \times 100$$

4.3.2.5 Estudo de estabilidade

As amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas (4 , 25 e 37 ºC) com o intuito de avaliar a estabilidade físico-química das partículas. Para esta avaliação foram realizadas análises de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta após 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias da formulação, usando o Zetasizer LAB. As medições foram realizadas por meio da avaliação dos parâmetros descritos nos tópicos **4.3.2.1** e **4.3.2.2.** Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média ± desvio padrão.

4.3.3 Estudo de internalização celular

A capacidade de internalização celular de NPOC foi analisada por meio de microscopia confocal a *laser*. Para tanto, foram feitas as formulações nas mesmas condições descritas anteriormente, adicionada do fluoróforo vermelho de nilo na concentração final de 0,2 mg/mL encapsulado na nanocápsula polimérica com OC (NPOC-VN). NPOC-VN ainda foi dialisada para remoção do fluoróforo residual não encapsulado. Para o estudo, $1x10^5$ células de câncer de mama humano da linhagem MCF-7 foram semeadas em placas de microscopia confocal com volume de 2 mL e incubadas durante 24h, com posterior tratamento por 24 h com concentrações de 25 µg/mL e 12,5 µg/mL de NPOC-VN. Após a incubação, os núcleos das células foram corados com Hoechst 34580 10 µg/mL durante 15 minutos. As células foram observadas em microscopia confocal a *laser* com 4000x de magnificação, utilizando os lasers de 405 e 552 nm, e emissão nas faixas de 410-450 e 600-700 nm. Imagens de 3 campos aleatórios foram obtidas por cada amostra, de um total de três experimentos independentes.

4.3.4 Estudo de citotoxicidade de NPOC em linhagens tumorais e não tumorais e obtenção do índice de seletividade (IS)

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio), um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (Mosmann, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomais presentes em células metabolicamente ativas. Uma vez solubilizado, o produto formado (formazan) pode ser quantificado por espectrofotômetro e sua intensidade colorimétrica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Gonçalves; Sobral, 2020).

As células foram incubadas com concentrações variadas de NPOC e OC em placas de 96 poços por 24, 48 e 72h horas, a 37 ºC com 5 % de CO_2 numa densidade de $2x10^5$ células/mL para MDA-MB-231, $1x10^5$ células/poço para MCF-7 e $3x10^5$ células/mL para MCF-10A e HEK-293. Após incubação, o sobrenadante foi parcialmente removido, seguido da adição do MTT (5 mg/mL em PBS) (m/v). Após um período de 4 horas, foi adicionado uma solução de SDS/HCL 0.01N, em seguida as

placas foram lidas em um espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA a 570 nm (Gonçalves et al., 2016). A droga padrão doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e NPMCT foi utilizado como controle negativo nas mesmas condições descritas anteriormente. Para cada linhagem celular, foram realizados três experimentos independentes.

4.3.5 Estudo de morte celular induzida por NPOC

Para avaliação do tipo de morte celular (apoptose ou necrose), utilizou-se da marcação dupla de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP). LA é um corante metacromático, permeável às membranas celulares, que possui afinidade por ácidos nucleicos (Gao *et al*., 2020). Células viáveis são coradas em verde, por ligação do LA ao RNA citoplasmático e nuclear. Já o IP é um corante de núcleo que apenas adentra na célula após a perda da integridade da membrana, marcando células em necrose ou estágios finais de apoptose (Bankó *et al*., 2021).

Os critérios para identificação seguiram as seguintes avaliações: (a) as células viáveis parecem ter um núcleo verde claro e uma estrutura intacta; (b) as células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde claro mostrando condensação da cromatina; (c) as células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e blebs de membrana; (d) as células necróticas parecem ter núcleo vermelho (Renvoizé *et al.,* 1998; Tan; Norhaizan, 2019).

Para o estudo, as células MCF-7 foram incubadas em placas de 24 poços por 24 h, a 37ºC com 5% de CO_2 numa densidade de $1x10^5$ células/mL. Após o tratamento com 25 ou 12,5 µg/mL de NPOC e OC (correspondentes a CI_{50} e metade, respectivamente) ou 4 µM de doxorrubicina (correspondente a CI_{50}) por 48h, as células foram coletadas por centrifugação (500 x g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS, marcadas com 10 µL de laranja de acridina (10 µg/mL) e iodeto de propídio (10 µg/mL). As células recém-coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a *laser*, com 2000x de magnificação, utilizando os lasers de 488 e 552 nm, e emissão nas faixas de 510-541 e 639-701 nm. Imagens de 3 campos aleatórios foram obtidas por cada amostra, de um total de três experimentos independentes. A contagem das células por campo de imagem obtida foi feita utilizando o software Image J.

4.3.6 Estudo de alterações nucleares induzidas por NPOC

Durante o processo de apoptose, diversas alterações celulares são visualizadas, dentre elas, alterações nucleares, como condensação e/ou fragmentação da cromatina e encolhimento nuclear (picnose). O Hoechst 34580 é um marcador de cromatina, azul fluorescente, permitindo demonstrar alterações relacionadas à apoptose no núcleo celular. Esses padrões podem ser medidos de acordo com a fluorescência do marcador, onde quanto mais fluorescente, mais alterações a nível nucleares são encontradas naquelas células (Kabakov; Gabai, 2018).

Para o estudo, as células MCF-7 foram incubadas em placas de 24 poços por 24 h, a 37ºC com 5% de CO_2 numa densidade de $1x10^5$ células/mL. Após o tratamento com 25 ou 12,5 µg/mL de NPOC e OC (correspondentes a CI_{50} e metade, respectivamente) por 48h, as células foram coradas com 20 µL de Hoechst (10 µg/mL) por 20 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. As células recém-coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a *laser*, com 2000x de magnificação, utilizando o laser de 405 nm, e emissão na faixa de 410-600 nm. Imagens de 3 campos aleatórios foram obtidas por cada amostra, de um total de três experimentos independentes. A fluorescência foi mensurada utilizando o software Image J. Alterações nucleares das células foram identificadas em células apoptóticas.

4.3.7 Estudo do potencial de membrana mitocondrial por JC-1

A apoptose envolve vários eventos celulares, principalmente mitocondriais, sendo o mais característico a perda do potencial da membrana mitocondrial, associado a abertura dos poros de permeabilidade dessa organela. O corante JC-1 (cloreto de 5,5′,6,6′-tetracloro-1,1′,3,3′-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) é um corante catiônico lipofílico verde capaz de entrar na mitocôndria e, em condições saudáveis da célula, formar agregados de coloração vermelha. Já em células apoptóticas, o JC-1 entra em menor grau nessas organelas devido a perda de seu potencial de membrana, adquirindo fluorescência na sua forma livre verde (Smiley *et al.*, 1991).

Para o estudo, as células MCF-7 foram incubadas em placas de 24 poços por 24 h, a 37ºC com 5% de CO_2 numa densidade de $1x10^5$ células/mL. Após o tratamento com 25 ou 12,5 µg/mL de NPOC e OC (correspondentes a CI_{50} e metade,

respectivamente) por 48h, as células foram coradas com 10 µL de JC-1 (2,5 µM) por 15 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Nos grupos controle positivo, foi adicionado 10 µL de CCCP (cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona) (50 µM) por 5 min, seguido por 10 µL de JC-1 (2,5 µM) por 15 minutos nas mesmas condições anteriores. As células recém-coradas foram observadas sob microscópio confocal de varredura a *laser*, com 2000x de magnificação, utilizando o laser de 488 nm, e emissão nas faixas de 520-542 e 580-614 nm. Imagens de 3 campos aleatórios foram obtidas por cada amostra, de um total de três experimentos independentes. A fluorescência foi mensurada utilizando o software Image J.

4.3.8 Estudo de indução de estresse oxidativo por NPOC

Para avaliar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (EROs) no efeito citotóxico de NPOC, as células MCF-7 foram pré-tratadas com N-acetilcísteína (NAC), uma molécula antioxidante que atua neutralizando EROs, bem como servindo de precursora para a síntese de glutationa (Marco; Foti; Corsico, 2022).

Para isto, as células MCF-7 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $1x10^5$ células/mL. Após 24 h, as células foram incubadas na presença ou ausência da NAC (10 µM) por mais 3 h. Decorrido este período, as células foram tratadas com 25 ou 12,5 µg/mL de NPOC (correspondentes a CI_{50} e metade, respectivamente) ou 4 µM de doxorrubicina (correspondente a CI_{50}). Após incubação por 48h, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 4h. O formazan depositado foi dissolvido com SDS *overnight* (Mosmann, 1983) e as densidades ópticas foram medidas usando um leitor de microplacas em λ = 570 nm e usadas para determinar a viabilidade celular (%). Foram realizados três experimentos independentes.

4.3.9 Estudo de citotoxicidade de NPOC em modelo de cultura celular tridimensional de esferoides

Os esferoides são um tipo de modelo tridimensional de cultivo celular capaz de reproduzir características tumorais semelhantes à de um tumor *in vivo*. Possui características moleculares e formação com centro necrótico e células periféricas altamente proliferativas semelhantes à de um tumor sólido, capaz de ser reproduzido por esferoides entre 200 e 500 µm. Dessa forma, são hoje considerados um avanço

significativo da análise celular dimensional de monocamada para estudos tumorais (Coelho, 2020).

Para esse ensaio, utilizou-se o método de "*hanging drop*" (Duval *et al.*, 2017), ou gota invertida, no qual foram depositadas gotas de 25 µL de uma suspensão celular de MCF-7 ($6x10^4$ células/mL) na tampa de uma placa de petri descartável e estéril. A tampa foi invertida sobre a placa de petri, permitindo o acumulo de células na interface líquido/ar, seguido pela incubação por 72h para a formação dos esferoides. Os esferoides formados foram transferidos para uma placa de 48 poços, um por poço, e a placa foi incubada por 60 minutos à 37°C e 5% de CO_2, a fim de garantir a adesão do esferóide à placa. Após o tratamento com 25 ou 50 µg/mL de NPOC e OC (correspondentes a CI_{50} e o dobro, respectivamente) por 48h, os esferoides foram fotografados em microscópio invertido com programa ZEN 2 Pro (versão 2.0) nos tempos de 0h e 48h para avaliação de tamanho e raio de migração celular (Proença, 2016). Os dados de três experimentos independentes foram analisados no *software* Image J.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 8.0.2 (Graphpad *Software* Inc, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM).

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$). As concentrações inibitórias médias (CI_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% foram obtidos por análise de regressão não-linear. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da razão entre a CI_{50} da célula não tumoral pela CI_{50} da célula tumoral (Duarte *et al.*, 2022).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Pré-formulação e caracterização do diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta

No estudo de pré-formulação da nanopartícula de óleo de copaíba, foram avaliadas as variações das concentrações de componentes da formulação, tais como PCL, Lipoid, óleo de copaíba e Tween80, comparando com os resultados dos parâmetros iniciais de caracterização (**Tabela 1**).

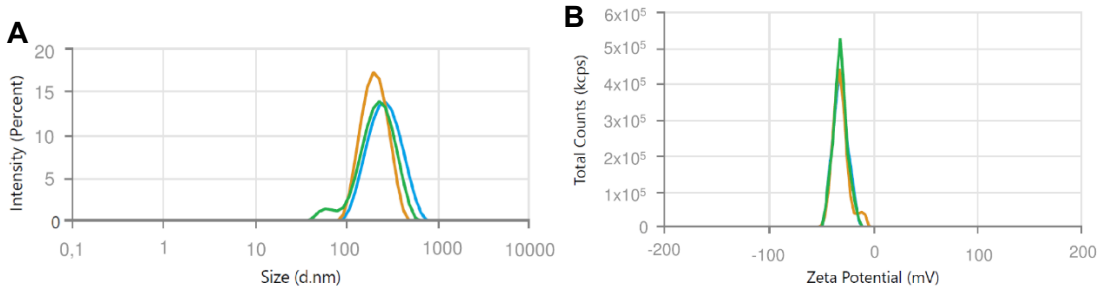
Tabela 1. Estudo de pré-formulação de NPOC e caracterização por DLS e ELS

	PCL 80 (mg)	Lipoid (mg)	OC (mg)	Tween 80 (mg)	Acetona (mL)	H_2O Mili-Q (mL)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
NPOC 1	40	40	100	40	6	12	225,5	0,193	-26,7
NPOC 2	30	30	100	30	6	12	231,7	0,175	-31,3
NPOC 3	40	40	200	40	6	12	221,1	0,218	-31,4
NPOC 4	40	20	100	20	6	12	259	0,205	-26,1
NPOC 5	40	20	200	20	6	12	270	0,238	-29,1
NPOC 6	40	20	200	60	6	12	273,7	0,215	-24,3
NPOC 7	40	20	50	20	6	12	230,3	0,145	-30,5

Fonte: autoria própria.
Legenda: NPOC: nanopartícula de óleo de copaíba; PCL: policaprolactona; OC: óleo de copaíba; PDI: índice de polidispersão

A formulação NPOC3 foi a escolhida para os estudos posteriores por apresentar um tamanho reduzido de 221,1 nm, PDI abaixo de 0,3 (0,218) e potencial zeta elevado de -31,4 mV (**Figura 9 B**). Além disso, NPOC3, que a partir de agora será chamada apenas de NPOC, apresentou maior quantidade de óleo de copaíba para parâmetros ideais de formulação. Um pico único no gráfico obtido do DLS indica homogeneidade do sistema (**Figura 9 A**).

Figura 9. Caracterização de NPOC por DLS e ELS

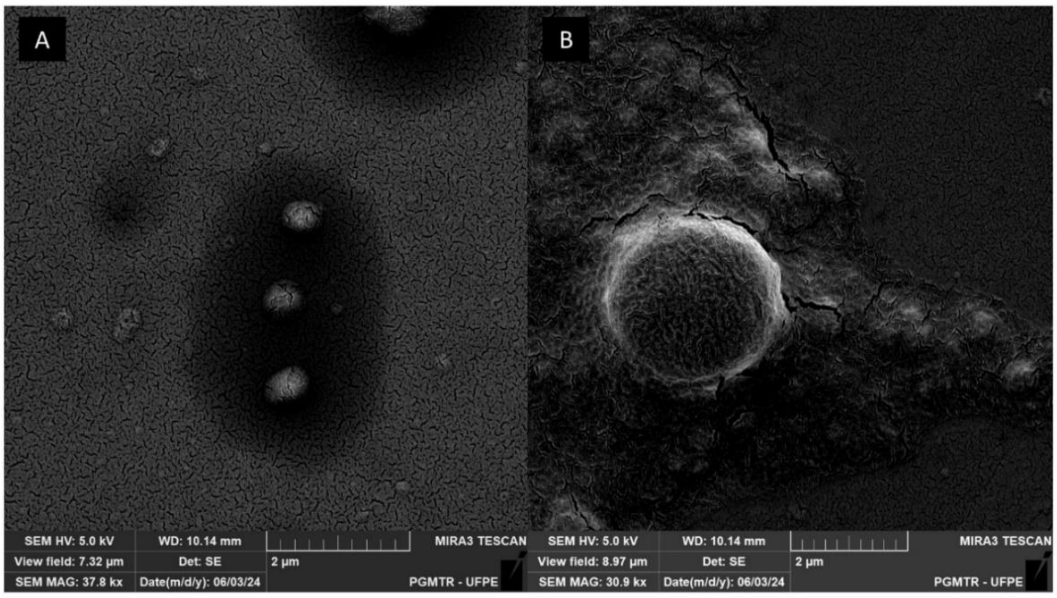


Fonte: autoria própria.
Legenda: gráfico obtido por DLS de tamanho de partícula (**A**) e gráfico obtido por ELS de potencial zeta (**B**) de três leituras.

5.2 Caracterização de NPOC por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio de MEV foi possível observar que NPOC apresenta superfície lisa e homogênea, sendo as partículas em sua maioria de formato esférico e dispostas isoladamente (sem agregados) (**Figura 10 A e B**).

Figura 10. Visualização de NPOC no MEV



Fonte: autoria própria em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PGMTR) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Legenda: Diferentes campos de NPOC por MEV **(A)** e **(B)**.

5.3 Caracterização de NPOC por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Como as análises de infravermelho são qualitativas, o óleo de copaíba apresentou bandas características dos seus compostos majoritários (β-cariofileno e

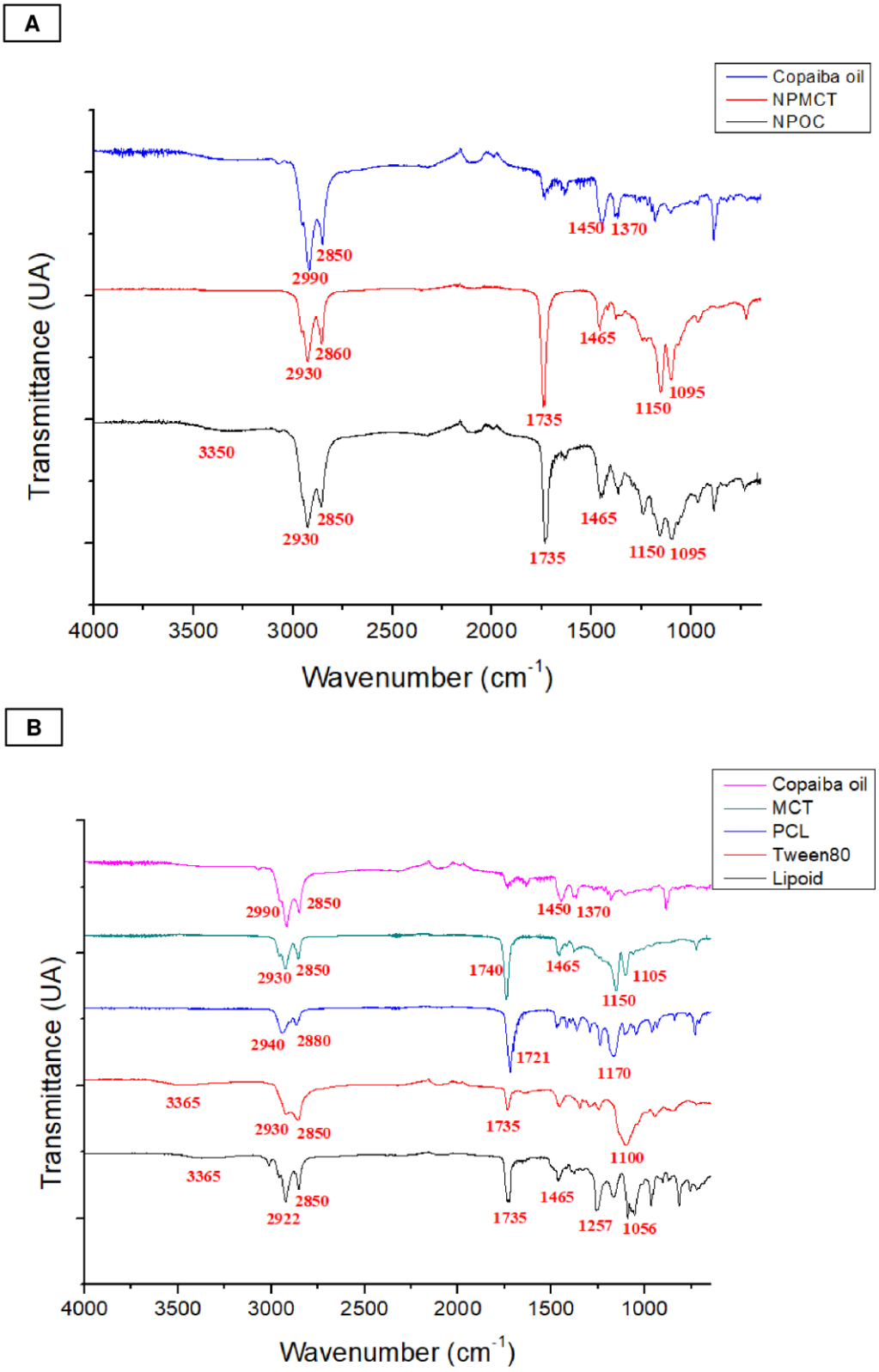
α-humuleno). Foram observados sinais de estiramento de C-H sp3 (2990 cm^{-1} e 2850 cm^{-1}), confirmados por dobramentos em 1450 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} referentes as bandas de -CH2 e -CH3, respectivamente (**Figura 11 A**).

A nanopartícula produzida com MCT (NPMCT) apresentou estiramento em 1735 cm^{-1}, característico de carbonila (C=O), além de sinais indicativos de hidrocarbonetos (2930 cm^{-1}, 2860 cm^{-1}, 1465 cm^{-1}). Foram identificados dobramentos C-C (1150 cm^{-1}) e C-O (1105 cm^{-1}) que determinam as bandas estiramento descritas (**Figura 11 A**).

Quando comparada às formulações, a nanopartícula de óleo de copaíba (NPOC), apresentou sinais diferentes na região de 3350 cm^{-1} referentes ao estiramento O-H em ponte, sobreposição de bandas na região de 1150 a 1000 cm^{-1} e aumento na intensidade dos sinais de hidrocarbonetos (2930 cm^{-1}, 2850 cm^{-1} e 1465 cm^{-1}).

A encapsulação do óleo de copaíba foi estimada pelo surgimento de estiramentos O-H em ponte (3350 cm^{-1}), C=O (1735 cm^{-1}) e C-O (1105 cm^{-1}), atrelado a presença de outros componentes em sua superfície como o Tween80, PCL e Lipoid (**Figura 11 B**).

Figura 11. Caracterização de NPOC por FTIR



Fonte: autoria própria.
Legenda: Espectros de IFTR do óleo de copaíba, NPMCT (formulação vazia, apenas com MCT) e NPOC (**A**); e óleo de copaíba, MCT, PCL, Tween80 e Lipoid (**B**).

5.4 Eficiência de encapsulação e doseamento de NPOC

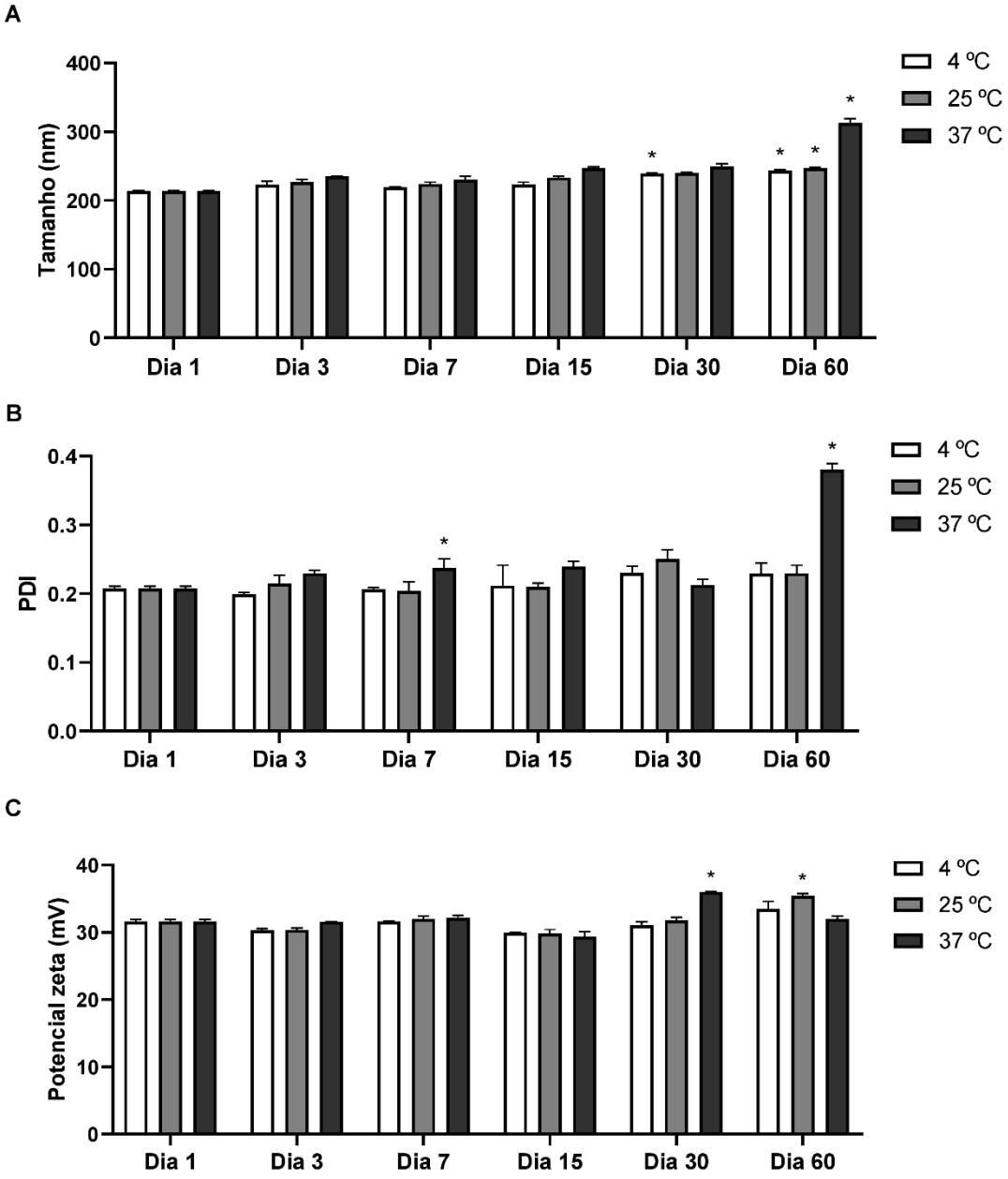
Os resultados de doseamento do óleo de copaíba na formulação demonstraram que, a partir da concentração de 40 mg/mL de óleo adicionada, foi doseado 39,7 ± 1.4 mg/mL.

A eficiência de encapsulação apresentou porcentagem de 99,6%, com uma pequena fração não significativa estando não encapsulada (0,4%).

5.5 Estabilidade de NPOC

No estudo de estabilidade de NPOC em três temperaturas (4, 25 e 37 ºC), foram analisadas as variáveis tamanho, PDI e potencial zeta durante 60 dias. O tamanho da partícula não sofreu variações consideráveis nos 15 primeiros dias nas três temperaturas avaliadas. No entanto, o tamanho de NPOC variou após 30 dias sob 4 ºC e somente após 60 dias, com aumento de cerca de 30 nm sob 4 e 25 ºC e 99 nm sob 37 ºC (**Figura 12 A**). O PDI não sofreu grandes mudanças ao decorrer dos dias de análise, sendo alterado na temperatura de 37 ºC apenas após 60 dias (aumento de 0,18) (**Figura 12 B**). Já o potencial zeta também apresentou poucas variações, sofrendo elevações na temperatura 37 ºC no dia 30 (aumento de 4,4 mV) e a temperatura ambiente (25 ºC) após 60 dias (aumento de 3,8 mV) (**Figura 12 C**).

Figura 12. Estudo de estabilidade de NPOC por DLS e ELS



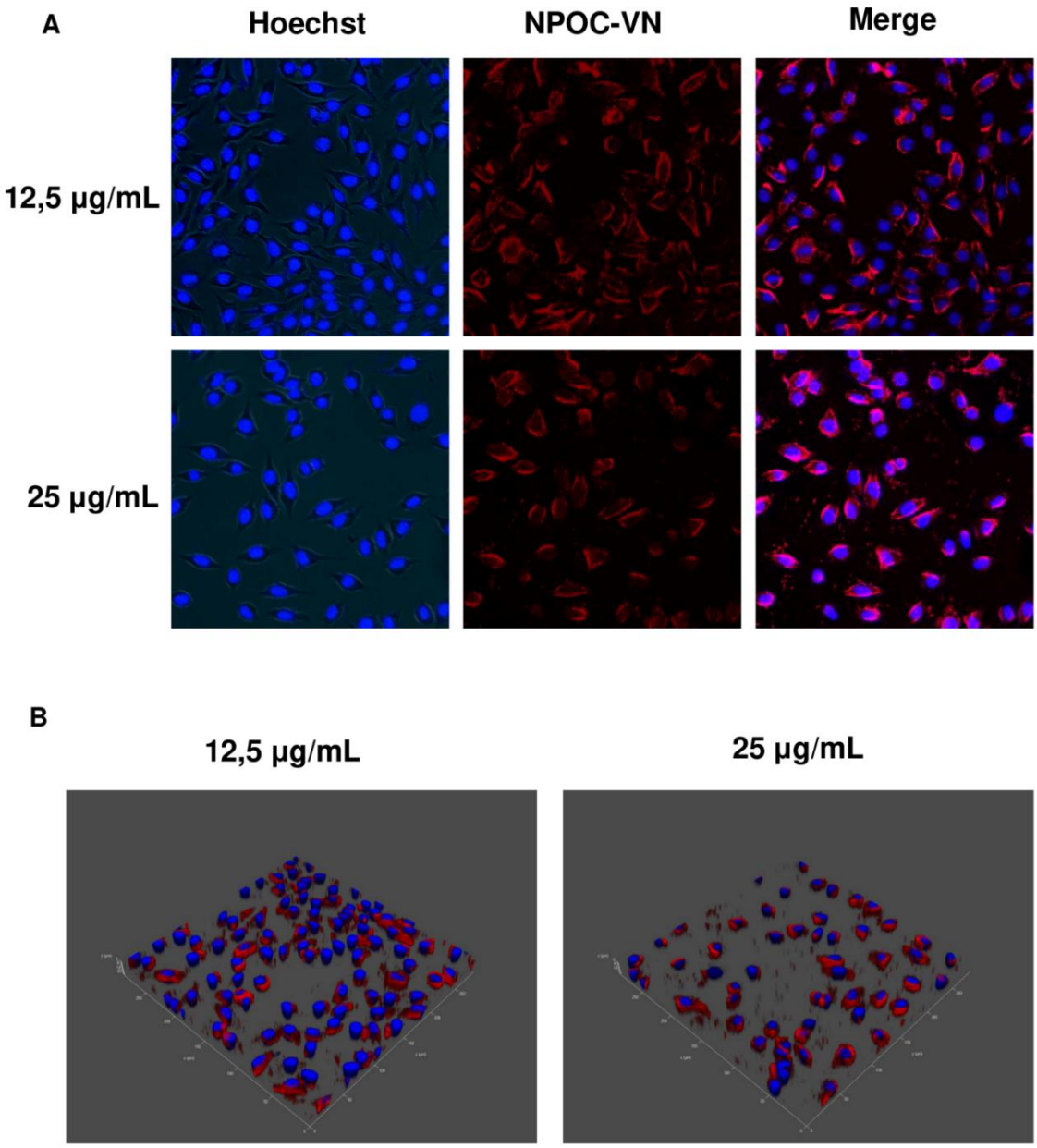
Fonte: autoria própria.
Legenda: Gráficos representam tamanho de partícula (A) PDI (B) e potencial zeta (C) da formulação de NPOC em função dos dias e alterações de temperatura. Os dados foram expressos como dados brutos de análises em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *two-way* seguido do teste de Tukey (*p < 0,05 comparado com os controles no dia 1).

5.6 Internalização celular de NPOC

O estudo de internalização celular com os marcadores vermelho de nilo (encapsulado com óleo de copaíba, chamado de NPOC-VN) e Hoechst 34580 nas células de câncer mamário humano MCF-7 está demonstrado na **Figura 13 A e B**.

É possível observar a fluorescência azul do Hoechst no interior dos núcleos das células, enquanto a fluorescência vermelha do vermelho de nilo predominou nas regiões do citoplasma e da membrana celular (**Figura 13 B**). O padrão se repetiu nas duas concentrações testadas de NPOC-VN (25 e 12,5 µg/mL), comprovando a internalização da nanopartícula nas células tumorais.

Figura 13. Internalização de NPOC-VN em células de câncer de mama humano MCF-7

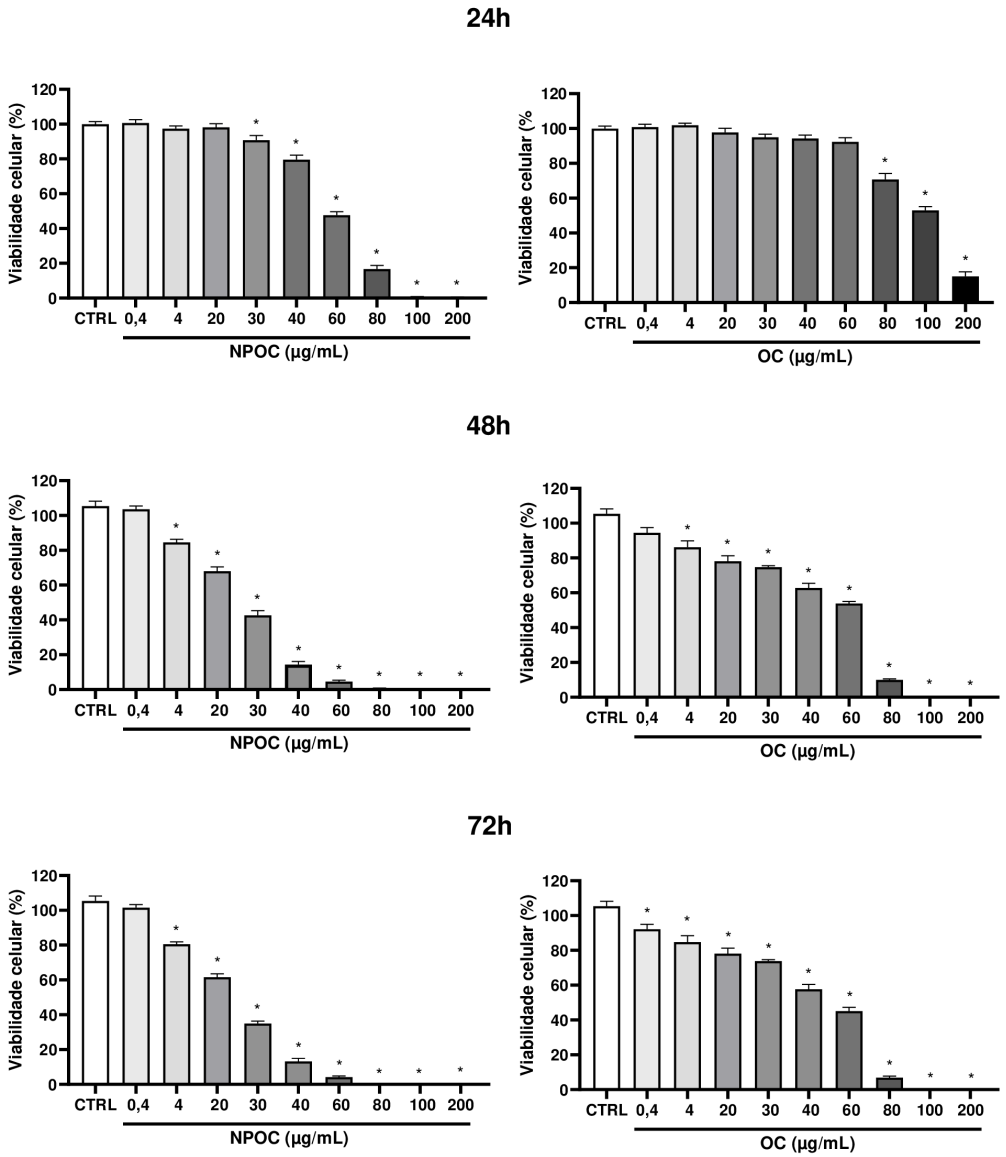


Fonte: autoria própria.
Legenda: Células MCF-7 após tratamento com NPOC-VN nas concentrações de 25 e 12,5 µg/mL, observadas por microscopia confocal de varredura a laser (A) utilizando-se os filtros de campo claro (BF), 405/410-450nm (Hoechst) e 552/600-700nm (vermelho de nilo). Em B observam-se imagens obtidas por reconstrução tridimensional (3D) nas mesmas condições experimentais.

5.7 Citotoxicidade de NPOC em linhagens tumorais e não tumorais e obtenção do índice de seletividade (IS)

No ensaio de MTT, conforme observado na **Figura 14**, NPOC apresentou citotoxicidade na linhagem MCF-7 após 24, 48, e 72 h de tratamento, com CI_{50} de: 56 ± 0,81 µg/mL, 25 ± 0,83 µg/mL e 25 ± 0,92 µg/mL, respectivamente). Já o óleo livre (OC) induziu valores de CI_{50} de 107,6 ± 2,40 µg/mL (24 h), 49 ± 2,10 µg/mL (48 h) e 47 ± 1,60 µg/mL (72 h).

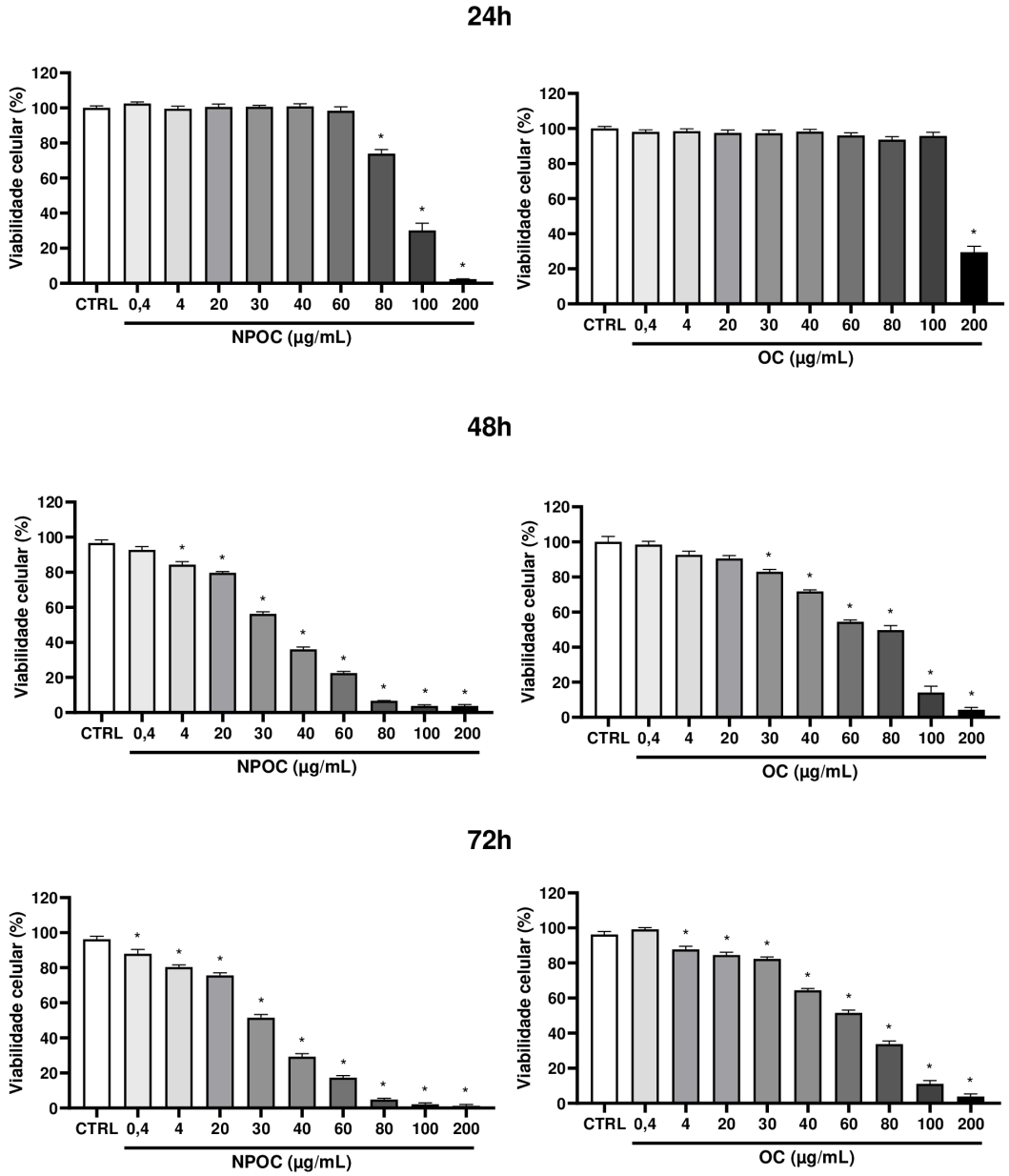
Figura 14. Citotoxicidade de NPOC e OC em linhagem de células de câncer mamário humano MCF-7 após 24, 48 e 72h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Viabilidade celular (%) após 24, 48 e 72 h de tratamento com NPOC e OC. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (*$p < 0,05$ comparado com os grupos controle).

Já na linhagem MDA-MB-231, NPOC também induziu citotoxicidade. (**Figura 15**), apresentando CI_{50} de 85 ± 0,7 µg/mL (24 h), 31 ± 0,83 µg/mL (48 h) e 30 ± 0,71 (72 h). Já OC apresentou citotoxicidade com CI_{50} de 120 ± 1,7 µg/mL (24 h), 63 ± 1,86 µg/mL (48 h) e 61 ± 0,81 µg/mL (72 h).

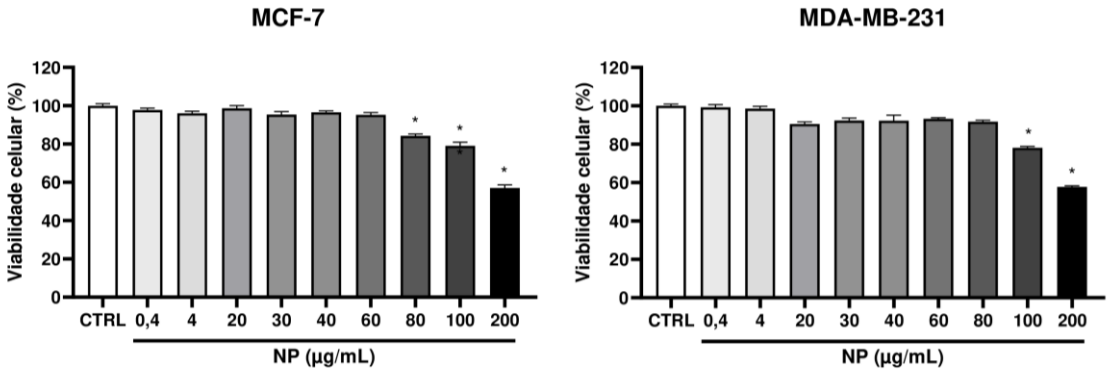
Figura 15. Citotoxicidade de NPOC e OC em linhagem de células de câncer mamário humano MDA-MB-231 após 24, 48 e 72h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Viabilidade celular (%) após 24, 48 e 72 h de tratamento com NPOC e OC. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (*$p < 0,05$ comparado com os grupos controle).

Resultados demonstraram que o controle negativo NPMCT apresentou baixa citotoxicidade nas linhagens testadas, com valores de CI_{50} impossíveis de serem obtidos estatisticamente (**Figura 16**).

Figura 16. Citotoxicidade de NP em linhagens de células de câncer mamário MCF-7 e MDA-MB-231 após 48h de tratamento

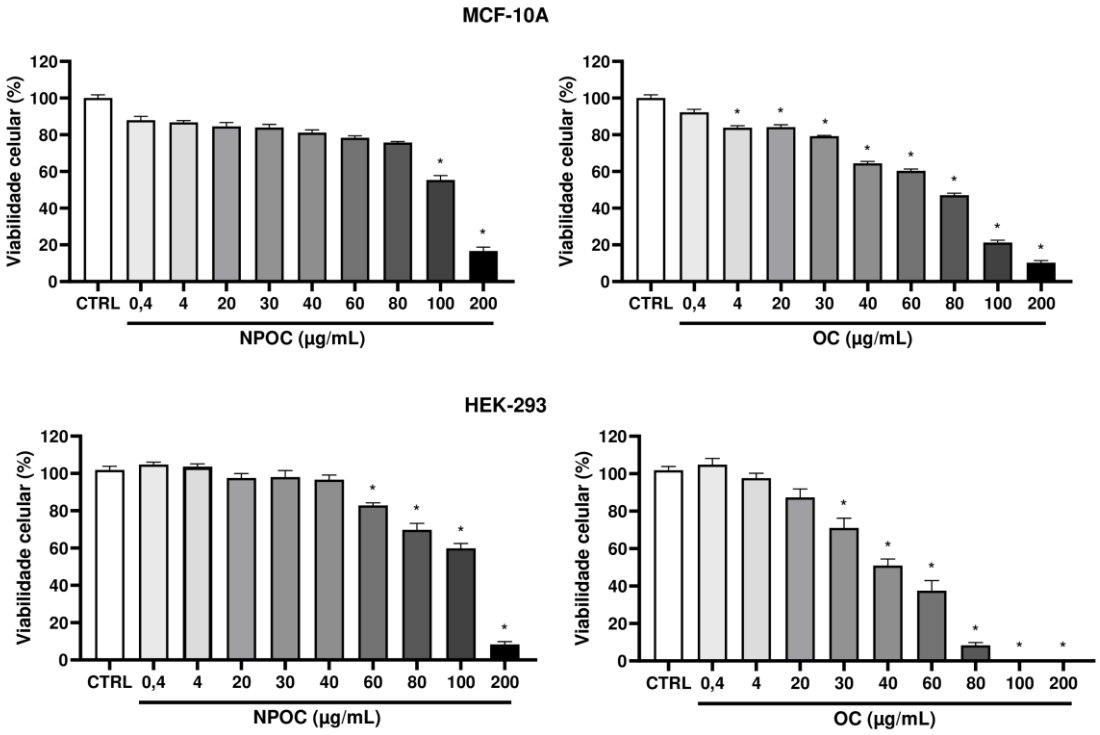


Fonte: autoria própria.
Legenda: Viabilidade celular (%) após 48 h de tratamento com NP (nanocápsula com óleo inerte MCT). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (*p < 0,05 comparado com os grupos controle).

Em relação à linhagem celular de mama não tumoral (MCF-10A), NPOC apresentou CI_{50} de 110 ± 2,0 também em 48 h, enquanto OC mostrou-se mais citotóxica, com CI_{50} de 58 ± 1,8 µg/mL (48 h) (**Figura 17**).

Já na linhagem não tumoral HEK-293, NPOC apresentou CI_{50} de 193 ± 1,8 µg/mL (48 h) e OC de 58 ± 1,8 µg/mL (48 h), indicando também maior citotoxicidade de OC em comparação a NPOC na linhagem não cancerígena (**Figura 17**).

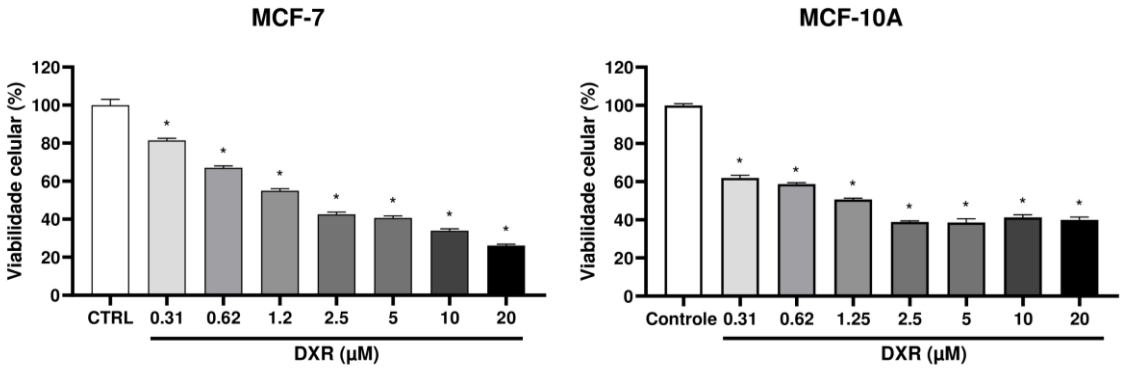
Figura 17. Citotoxicidade de NPOC e OC em linhagens não tumorais de células mamárias humanas MCF-10A e células de rim embrionário humano HEK-293 após 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Viabilidade celular (%) após 48 h de tratamento com NPOC e OC. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (*$p < 0,05$ comparado com os grupos controle).

Enquanto isso, a doxorrubicina (DXR), droga padrão utilizada como controle positivo, apresentou elevada citotoxicidade em linhagem tumoral e não tumoral, com CI_{50} de 4,0 ± 0,92 µM (MCF-7) e 1,5 ± 0,48 µM (MCF-10A) após 48 h de tratamento (**Figura 18**).

Figura 18. Citotoxicidade de doxorrubicina em linhagens de células de câncer mamário humano MCF-7 e células de mama humana não tumorais MCF-10A após 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Viabilidade celular (%) após 48 h de tratamento com doxorrubicina (DXR). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (*$p < 0,05$ comparado com os grupos controle).

A partir dos valores de CI_{50} obtidos, o Índice de Seletividade (IS) de NPOC, OC e DXR foi determinado usando a linhagem de células saudáveis MCF-10A como modelo de célula não tumoral. NPOC apresentou elevados valores de IS, de 4,4 e 3,5 em relação às linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente, conforme mostrado na **Tabela 2.** Já OC apresentou menor IS (1,2 e 0,92) para as mesmas linhagens, enquanto que DXR apresentou IS ainda mais baixo de 0,37 (relacionado à MCF-7).

Tabela 2. Valores de CI_{50} e IS de NPOC, OC e DXR em linhagens de células tumorais e não tumorais humanas após 48h de tratamento

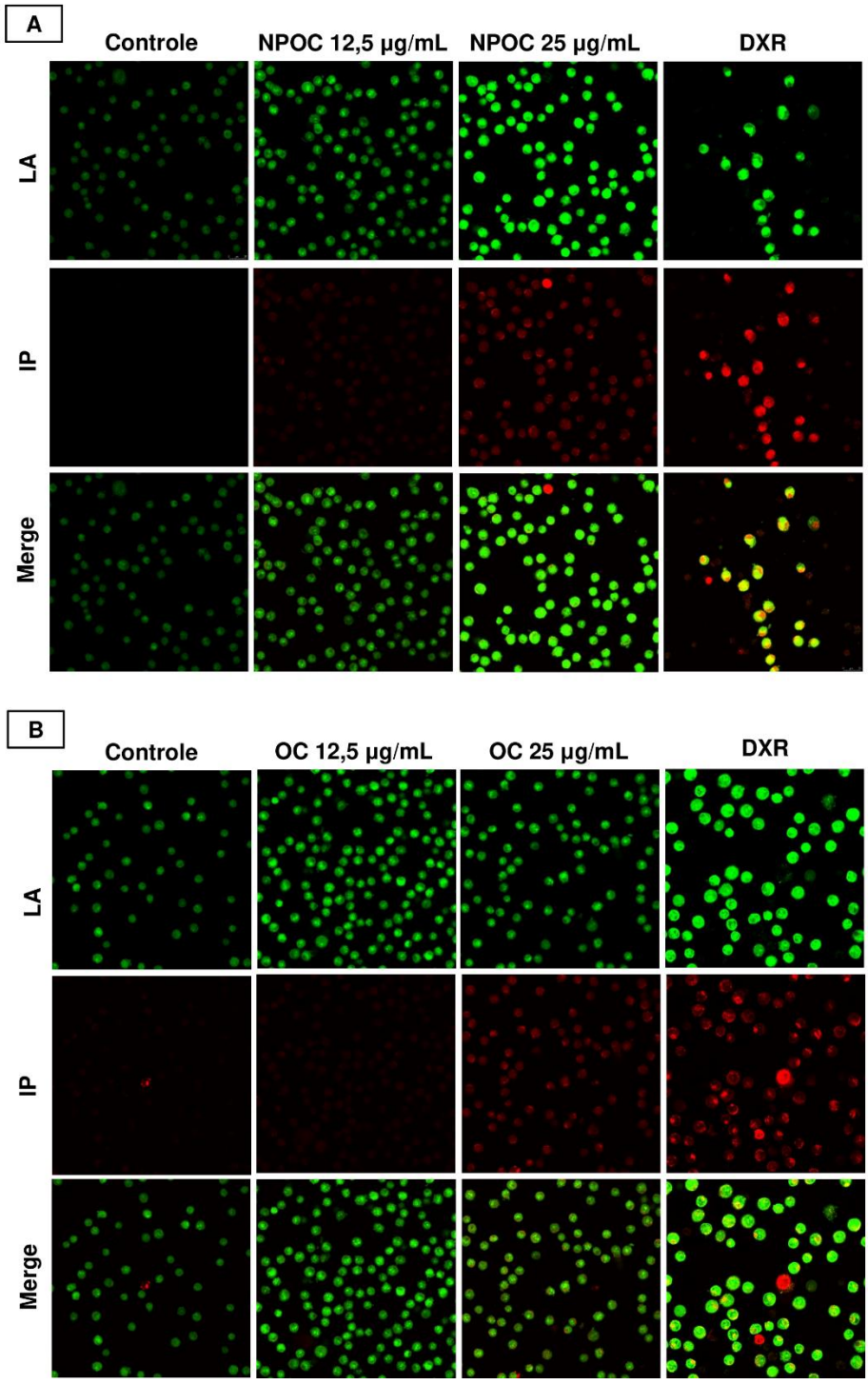
	CI_{50}			**IS**		
Linhagens	**NPOC (µg/mL)**	**OC (µg/mL)**	**DXR (µM)**	**NPOC**	**OC**	**DXR**
MCF-7	25 ± 0,83	49 ± 2,1	4 ± 0,92	4,4	1,2	0,37
MDA-MB-231	31 ± 0,75	63 ± 1,86	-	3,5	0,92	-
MCF-10A	110 ± 2,0	58 ± 1,8	1,5 ± 0,48	-	-	-

Fonte: autoria própria.
Legenda: CI_{50}: concentração inibitória mínima; IS: índice de seletividade

5.8 Tipo de morte celular induzida por NPOC em microscopia confocal após coloração com laranja de acridina e iodeto de propídeo

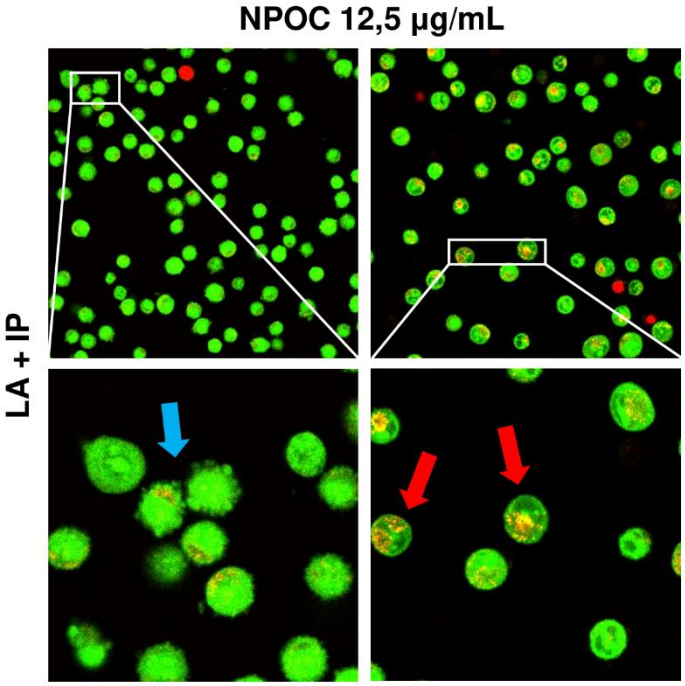
A **Figura 19** apresenta alterações morfológicas características do processo apoptótico nos grupos tratados com NPOC (**Figura 19 A**), OC (**Figura 19 B**) e DXR. **Na Figura 20** é possível observar condensação da cromatina e formação de *blebs* de membrana.

Figura 19. Imagens representativas da avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) de células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC, OC e DXR por 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Células MCF-7 após 48 h de tratamento com NPOC **(A)** e OC **(B)** (12,5 e 25 µg/mL) ou DXR (4 µM), marcadas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (PI) e observadas por microscopia confocal a *laser*, utilizando-se os *lasers* 488 e 552 nm, e emissão nas faixas de 510-541 e 639-701 nm. As células viáveis apresentam núcleo verde claro e uma estrutura intacta. As células apoptóticas iniciais exibem um núcleo verde brilhante mostrando condensação da cromatina. As células apoptóticas tardias mostram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho) de condensação da cromatina e *blebs* de membrana enquanto as células necróticas apresentam núcleo vermelho.

Figura 20. Imagens de alterações celulares observadas na avaliação da apoptose por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo de propídeo (IP) de células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC após 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Células MCF-7 após 48 h de tratamento com NPOC (12,5 µg/mL) marcadas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (PI) e observadas por microscopia confocal a *laser*, utilizando-se os *lasers* 488 e 552 nm, e emissão nas faixas de 510-541 e 639-701 nm. A seta vermelha indica alterações de cromatina celular; e a seta azul indica *blebs* de membrana. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

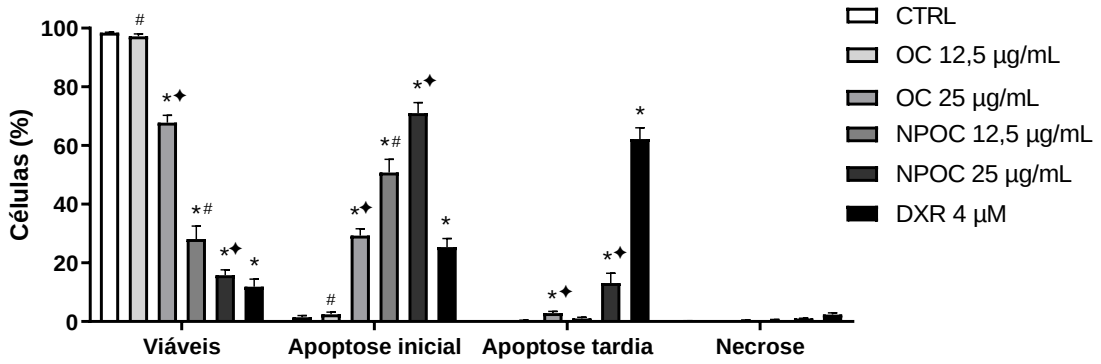
A **Figura 21** apresenta o percentual de células MCF-7 marcadas com IP e/ou LA, após 48 h de tratamento com NPOC, OC (25 µg/mL e 12,5 µg/mL) e DXR (4 µM). O tratamento com NPOC (25 µg/mL) induziu aumento significativo do percentual de células com características típicas de apoptose inicial (71%, $p < 0,05$) e tardia (13%, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (1,4%; e 0,3%, respectivamente). A metade da IC_{50} de NPOC (12,5 µg/mL) induziu 58,8% de apoptose inicial ($p < 0,05$) e 1% de apoptose tardia.

Já OC (25 µg/mL), também após 48 h de tratamento, induziu aumento de apoptose inicial e tardia de 29,2% ($p < 0,05$) e 2,9% ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparados com o grupo controle. Na concentração de 12,5 µg/mL demonstrou apoptose inicial mais discreta de 2,4% e apoptose tardia 0,1%.

Quanto ao tratamento com a DXR, observou-se aumento significativo do percentual de células em apoptose inicial e final (25,3 % e 62,2%, respectivamente, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Em adição, NPOC apresentou aumento significativo de células em apoptose inicial e tardia quando comparados com o OC na concentração de 25 µg/mL. A morte celular por necrose não foi observada nos grupos tratados ($p > 0,05$).

Figura 21. Indução da apoptose por NPOC, OC e DXR analisada por coloração de laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP) em células de câncer mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento

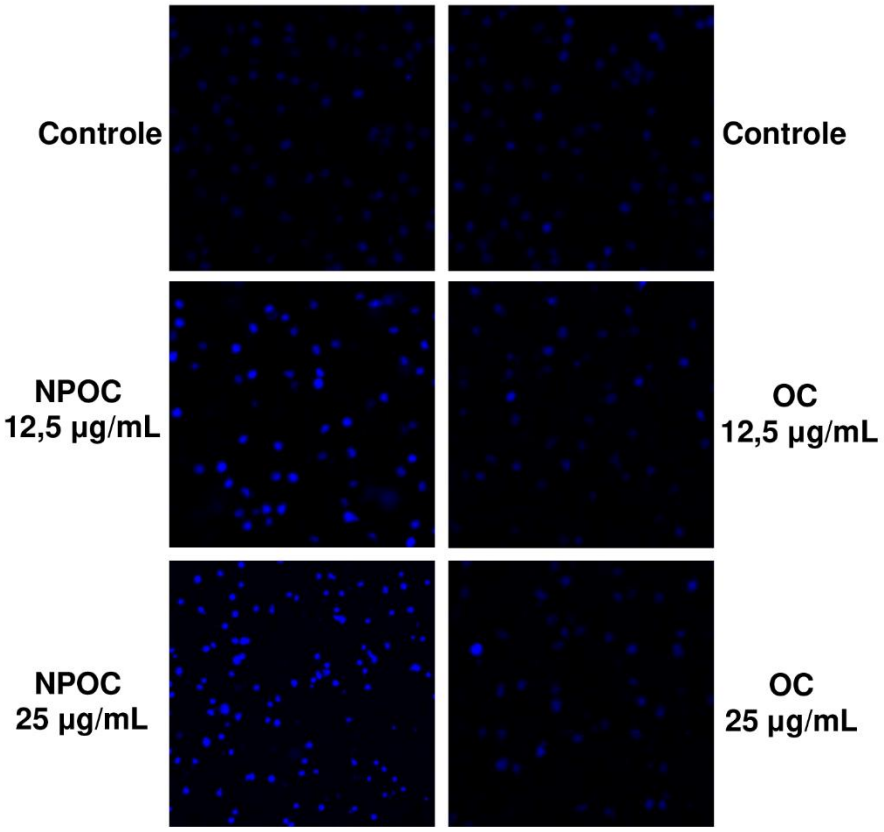


Fonte: autoria própria.
Legenda: Percentual de células coradas com laranja de acridina (LA) e/ou iodeto de propídeo (IP). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (* significa $p < 0,05$ comparado com os grupos controle; # *e* ✦ significam $p < 0,05$ comparado entre grupos NPOC e OC na mesma concentração).

5.9 Alterações nucleares induzidas por NPOC em microscopia confocal após coloração com Hoechst 34580

A **Figura 22** apresenta a fluorescência dos grupos tratados com NPOC ou OC, comparando-se com o grupo controle. O aumento da fluorescência significa aumento de alterações nucleares características de apoptose, como condensação e fragmentação de cromatina.

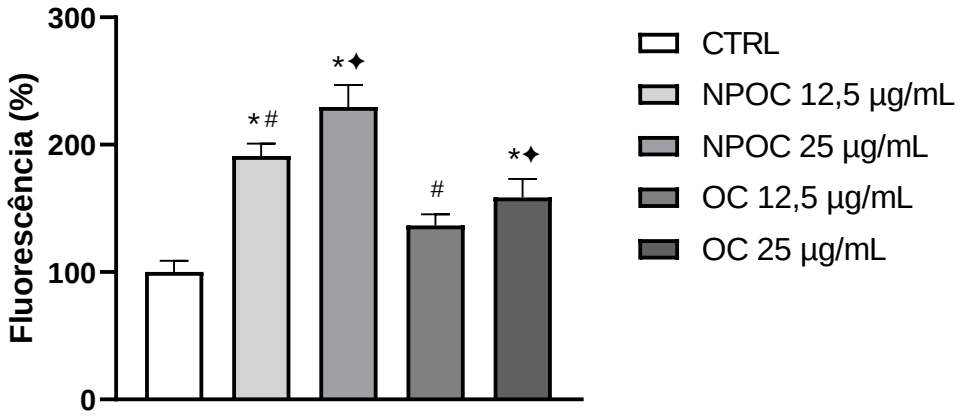
Figura 22. Imagens representativas de alterações nucleares por coloração de Hoechst 34580 em células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC e OC por 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Células MCF-7 após 48 h de tratamento com NPOC e OC (12,5 e 25 µg/mL), marcadas Hoechst 34580 e observadas por microscopia confocal a *laser*, utilizando-se o *laser* 405 nm e emissão na faixa de 410-600 nm.

A **Figura 23** apresenta o percentual de fluorescência de Hoechst nas células MCF-7 após 48 h de tratamento com NPOC (25 µg/mL e 12,5 µg/mL) e OC (25 µg/mL e 12,5 µg/mL). É possível observar que os tratamentos com NPOC e OC (25 µg/mL) aumentaram a fluorescência nas células (229,5% e 136,6%, respectivamente, $p < 0,05$), embora NPOC tenha se destacado quando comparado ao grupo OC ($p < 0,05$). O mesmo padrão ocorreu com a concentração de 12,5 µg/mL para ambos os tratamentos.

Figura 23. Avaliação de alterações nucleares induzidas por NPOC e OC por marcação com Hoechst 34580 em células de câncer mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento

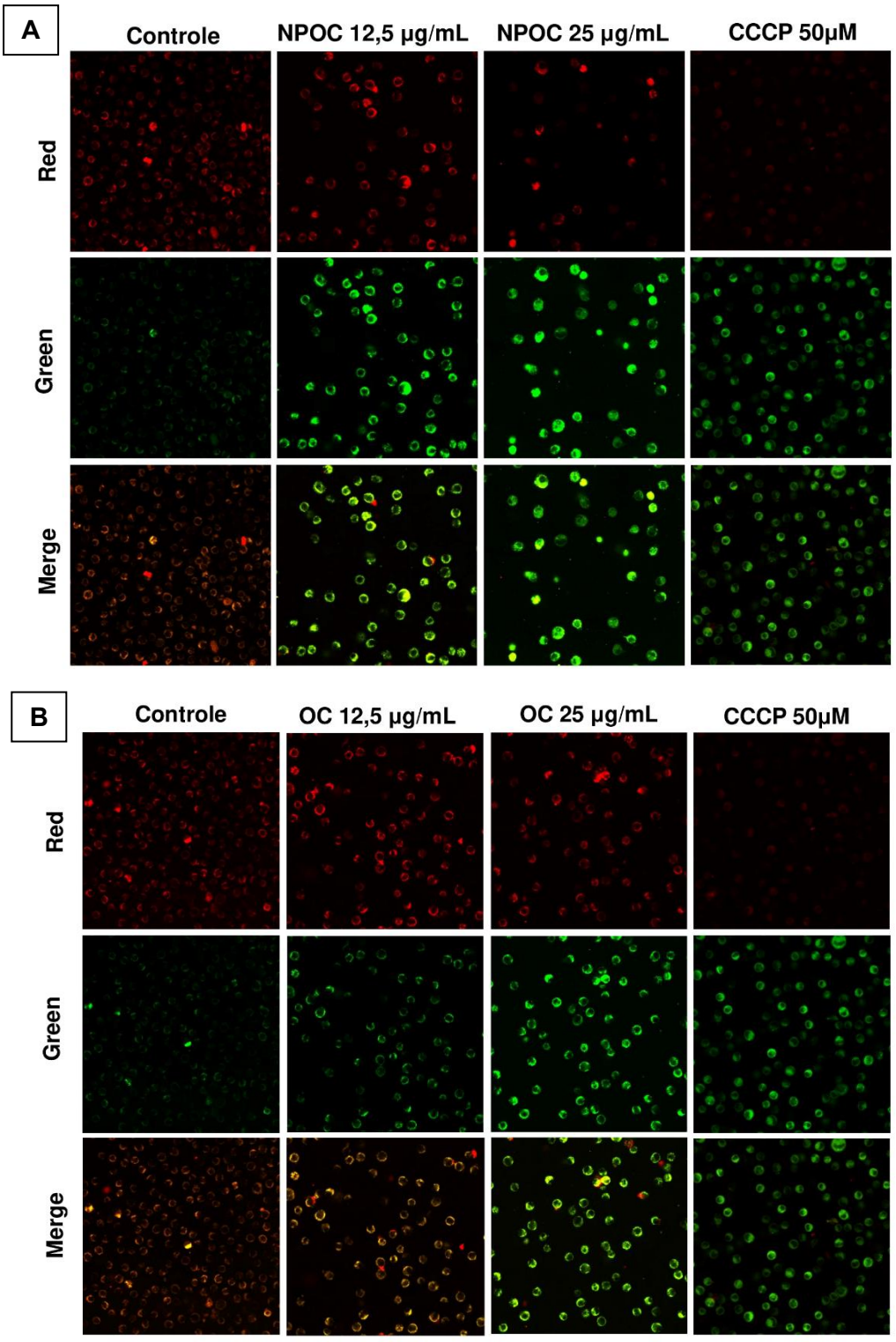


Fonte: autoria própria.
Legenda: Percentual de fluorescência. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (* significa $p < 0,05$ comparado com os grupos controle; # *e* ✦ significam $p < 0,05$ comparado entre grupos NPOC e OC na mesma concentração).

5.10 Potencial de membrana mitocondrial com o tratamento de NPOC em microscopia confocal após coloração com JC-1

A **Figura 24** apresenta as fluorescências de JC-1 livre (verde), significando células com perda de potencial de membrana mitocondrial; e agregados (vermelho), indicando células com mitocôndrias íntegras, dos grupos tratados com NPOC (**Figura 24 A**), OC (**Figura 24 B**) e CCCP como controle positivo, comparando-se com o grupo controle.

Figura 24. Imagens representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial por coloração de JC-1 em células de câncer mamário humano MCF-7 incubadas com NPOC e OC por 48h e CCCP

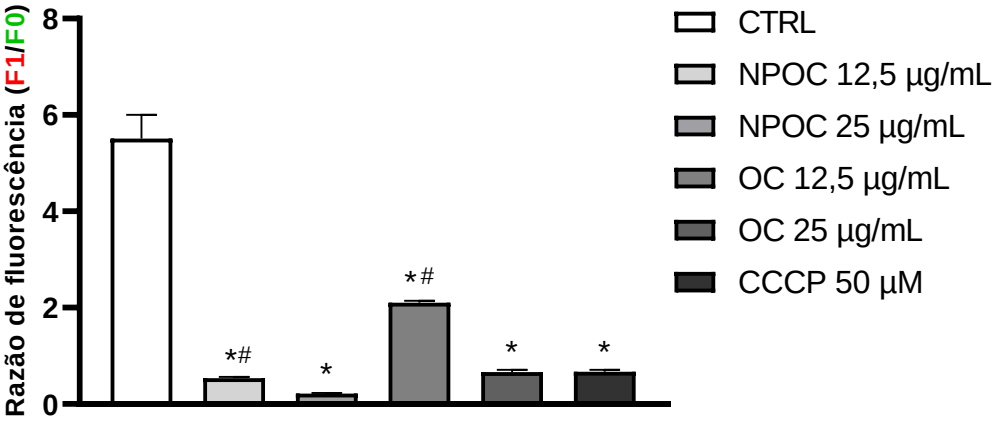


Fonte: autoria própria.
Legenda: Células MCF-7 após 48 h de tratamento com NPOC **(A)** e OC **(B)** nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, e CCCP (50 µM), marcadas JC-1 e observadas por microscopia confocal a *laser*, utilizando o *laser* 488 nm, e emissão nas faixas de 520-542 e 580-614 nm.

A **Figura 25** apresenta a razão de fluorescência de agregados de JC-1 com a sua porção livre nas células MCF-7 após 48 h de tratamento com NPOC e OC (25 µg/mL e 12,5 µg/mL). É possível ver que nos tratamentos com NPOC e OC (25 µg/mL), houve redução da razão de 5,5 do controle para 0,21 e 0,66 (p < 0,05), respectivamente.

Na concentração de 12,5 µg/mL, houve redução para 0,53 (p < 0,05) no grupo NPOC e para 2,1 (p < 0,05) no grupo OC. Em adição, houve diferença significativa entre os grupos NPOC e OC na concentração de 12,5 µg/mL (p < 0,05). O controle positivo CCCP apresentou redução da razão de 5,5 do controle para 0,67.

Figura 25. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial com tratamento de NPOC, OC e CCCP por marcação com JC-1 em células de câncer mamário humano MCF-7 após 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Razão de fluorescência entre JC-1 agregado (F1)/JC-1 livre (F0). Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey. (* significa p < 0,05 comparado com os grupos controle; # significa p < 0,05 comparado entre grupos NPOC e OC).

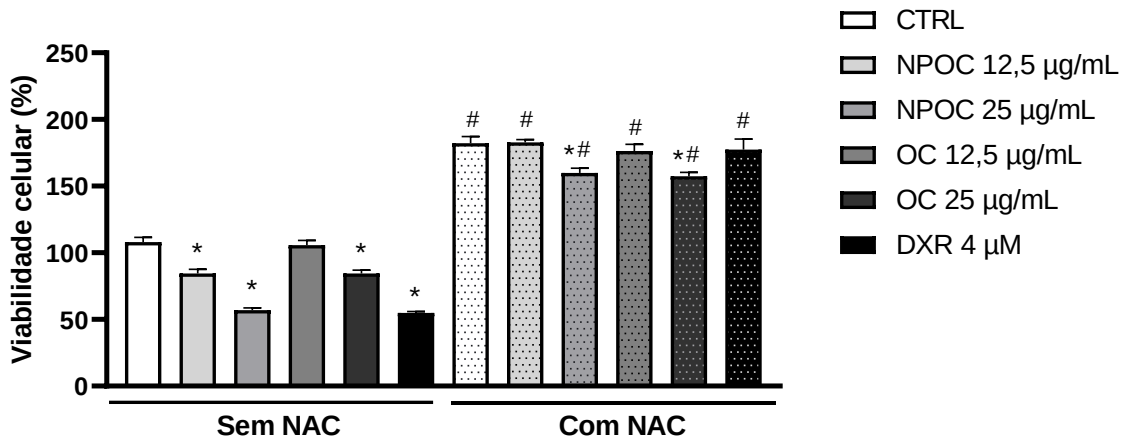
5.11 Indução de estresse oxidativo pela avaliação da citotoxicidade do NPOC na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC)

Como observado na **Figura 26**, após 48 h de tratamento com NPOC, na ausência de N-acetilcisteína (NAC), foi observada redução significativa da viabilidade celular (25 µg/mL: 50,1%; e 12,5 µg/mL: 22,5%, p < 0,05), quando comparado ao grupo controle (107%). Já após o tratamento com OC no mesmo tempo e mesmas condições, foi observada também redução da viabilidade celular (25 µg/mL: 23%, p < 0,05; e 12,5 µg/mL: 2%), quando comparado ao grupo controle.

O pré-tratamento de 3 h com NAC (10 µM), preveniu significativamente o efeito citotóxico de NPOC, quando comparado aos grupos tratados com o NPOC na ausência de NAC, nas respectivas concentrações testadas (25 µg/mL: 159%; 12,5 µg/mL: 182%, $p < 0,05$). Com OC, o padrão se repetiu com o pré-tratamento com NAC, revertendo o efeito citotóxico quando comparado com os grupos tratados na ausência de NAC (25 µg/mL: 176,3%; 12,5 µg/mL: 182%, $p < 0,05$).

Ainda, para o grupo tratado com a DXR na ausência de NAC, foi observada redução significativa da viabilidade celular (52,1%, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Como esperado, o efeito citotóxico da DXR foi significativamente prevenido na presença do NAC (177,4%, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com DXR na ausência deste antioxidante.

Figura 26. Investigação da atividade redox dos tratamentos pela análise de citotoxicidade de NPOC, OC e DXR na presença ou ausência N-acetilcisteína (NAC) após 48h de tratamento



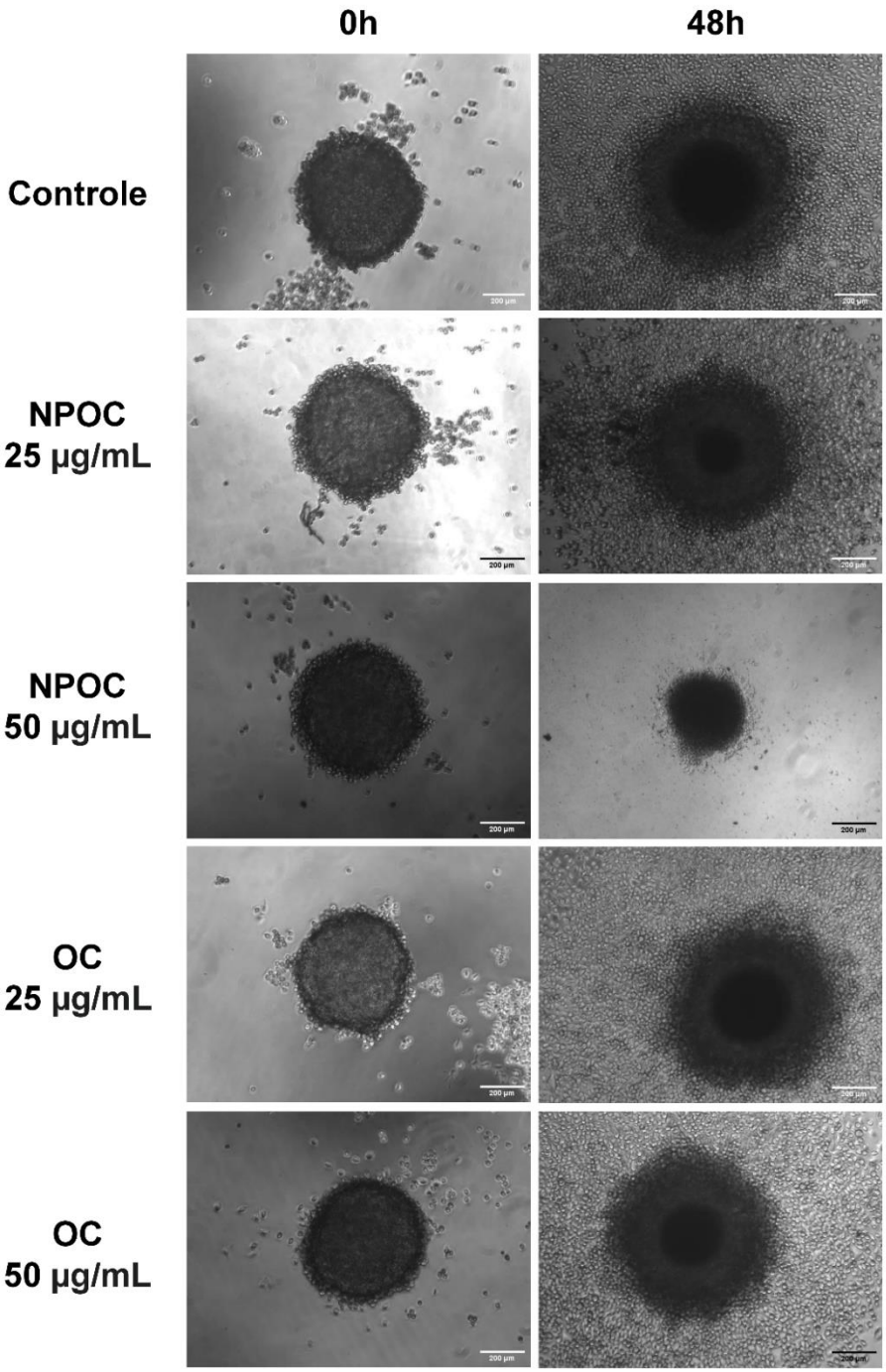
Fonte: autoria própria.
Legenda: Viabilidade celular (%) após 48 h de tratamento com NPOC, OC ou DXR na presença ou ausência de NAC. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey (* significa $p < 0,05$ comparado com o controle de cada grupo (sem NAC e com NAC); # significa $p < 0,05$ comparado com o grupo tratado com NAC).

5.12 Citotoxicidade de NPOC em modelo de cultura celular tridimensional de esferoides

A citotoxicidade em esferoides induzida pelos tratamentos com NPOC e OC estão representadas na **Figura 27**, na qual é possível observar redução de tamanho

de esferoides com o tratamento de NPOC, assim como redução de migração nos grupos tratados, quando comparados com o controle.

Figura 27. Imagens representativas dos esferoides de células de câncer mamário humano MCF-7 incubados com NPOC e OC por 48h de tratamento

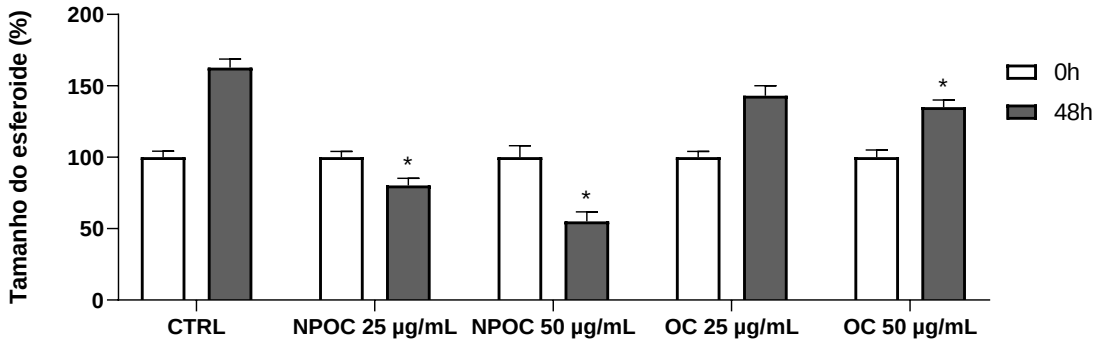


Fonte: autoria própria.
Legenda: Esferoides de MCF-7 tratados com NPOC e OC nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, observados por microscópio invertido.

Na **Figura 28**, representa-se o percentual de redução de tamanho dos esferoides após tratamento de NPOC e OC nos tempos de 0h e 48h. O grupo tratado

com 25 µg/mL e 50 µg/mL de NPOC apresentou redução significativa do tamanho médio de esferoide (80,21% e 55%, respectivamente, $p < 0,05$), em relação ao grupo controle (162,8%). Já os grupos tratados com OC não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle.

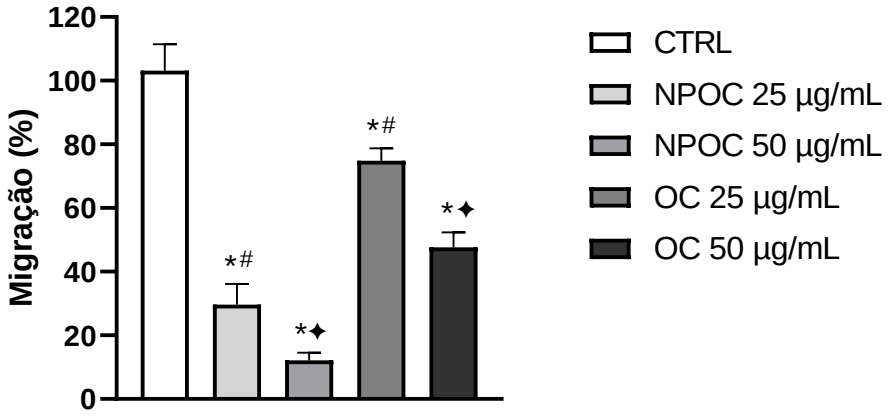
Figura 28. Análise de citotoxicidade de NPOC e OC em cultura tridimensional de esferoides formados por células de câncer mamário humano MCF-7 em 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Percentual de tamanho dos esferoides. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) *two-way* seguido do teste de Tukey. (* significa $p < 0,05$ comparado com o grupo controle).

A **Figura 29** apresenta o percentual de redução do raio de migração celular a partir dos esferoides após tratamento de NPOC e OC nos tempos de 0h e 48h. Os grupos NPOC nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL apresentaram reduções significativas de 70% ($p < 0,05$) e 88% ($p < 0,05$), respectivamente, da atividade migratória quando comparadas com o controle (100%). Enquanto o grupo OC nas mesmas concentrações induziu redução de migração significativa em relação ao controle (52% e 25%, $p < 0,05$, respectivamente). Houve também diferença significativa entre NPOC e OC nas duas concentrações, indicando maior redução de raio de migração nos grupos de NPOC.

Figura 29. Análise de inibição de migração celular induzida NPOC e OC em cultura tridimensional de esferoides formados por células de câncer mamário humano MCF-7 em 48h de tratamento



Fonte: autoria própria.
Legenda: Percentual de migração em esferoides. Os dados estão expressos como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em duplicata analisados por Análise de Variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey. (* significa $p < 0,05$ comparado com os grupos controle; # e ✦ significam $p < 0,05$ comparado entre grupos NPOC e OC).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é um dos cânceres mais incidentes no Brasil e no mundo, além de possuir altas taxas de mortalidade (Ferlay *et al.,* 2021; INCA, 2023). Os tratamentos disponíveis na atualidade para esse tipo neoplásico incluem cirurgia, radioterapia e o uso de fármacos antineoplásicos, que possuem limitações quanto à resistência tumoral e efeitos tóxicos associados (Pajuelo-lozano *et al.*, 2018). Dessa forma, discute-se amplamente a necessidade de novas estratégias mais eficazes e melhoramentos terapêuticos para o câncer de mama.

Nanopartículas poliméricas (NP), com uma faixa de tamanho de 1-1000 nm (Dristant *et al.,* 2023), surgem, nesse sentido, como alternativa de melhoramento de biodisponibilidade, características físico-químicas, direcionamento e, consequentemente, incrementando a atividade farmacodinâmica de compostos com atividade antitumoral já conhecidas, como é o caso do óleo de copaíba (OC) (Neves *et al.,* 2022).

Dessa forma, o objetivo do desenvolvimento da formulação de NPOC foi obter um sistema com a maior quantidade de óleo de copaíba biodisponível para melhorar entrega do composto, superando sua volatilidade e lipofilicidade, além de tamanho reduzido, PDI (índice de polidispersão) desejado em relação à homogeneidade, e um elevado potencial zeta.

PCL é um polímero semicristalino, sintetizado a partir da ε-caprolactona, biodegradável e biocompatível, degradado lentamente por hidrólise das ligações ésteres no organismo e ideal para a liberação controlada de fármacos (Sinha; Trehan, 2023).

No estudo de pré-formulação, com relação ao PCL, houve variação em apenas uma amostra para avaliar o efeito desse polímero na resposta da formulação. Com redução do PCL, observou-se também redução do tamanho da partícula, com aumento do potencial zeta. Esse fenômeno pode ser explicado com a ideia de que a redução do polímero pode induzir a formação de uma estrutura mais compacta e menor da partícula, expondo hidroxilas na superfície. Quando hidroxilas ou outros grupos carregados negativamente são expostos na superfície, isso pode aumentar a densidade de carga superficial, resultando em um aumento do potencial zeta (Soriano *et al.,* 2018).

O potencial zeta é uma medida de carga elétrica na superfície de partículas, que influencia a estabilidade da suspensão, pois partículas com alto potencial zeta (geralmente acima de ±30 mV) tendem a se repelir, prevenindo a agregação. Dessa forma, a exposição de hidroxilas pode aumentar o potencial zeta, indicando uma maior repulsão entre as partículas e uma suspensão mais estável (Hunter, 1981).

A variação de tensoativos, como Tween80 e Lipoid, influenciam no tamanho de partícula, de maneira que quanto menor a quantidade, menor a partícula se apresenta, graças à maior estabilização das interfaces entre as fases, prevenindo a coalescência ou agregação das partículas. Além disso, uma quantidade adequada de tensoativos é necessária para minimizar o tamanho das partículas e garantir estabilidade (Mohanraj; Chen, 2006).

Todas as formulações desenvolvidas no estudo possuíram baixas concentrações de tensoativos, representando cerca de 2% em cada formulação final de 5 mL. Isso indica segurança da formulação, uma vez que tais tensoativos em concentrações mais elevadas podem causar efeitos citotóxicos devido à sua interação com membranas celulares, levando a ruptura ou permeabilização da membrana e morte celular (Lawrence, 2006).

Variações de óleo de copaíba também pareceram promover alterações de tamanho. Os resultados mostraram que maiores quantidades de óleo na formulação levaram ao aumento do tamanho do nanossistema, como é o caso das formulações NPOC5 e NPOC6.

Outro parâmetro analisado, o PDI, é uma medida de caracterização de nanopartículas em relação à distribuição do tamanho das partículas em uma suspensão, variando de 0 a 1. Valores de PDI próximos de 0 indicam partículas de tamanho mais homogêneo, enquanto valores mais próximos de 1 indicam maior polidispersidade, ou seja, distribuição mais ampla de tamanhos (Bhattacharjee, 2016). Além disso, para aplicações biomédicas, o PDI de uma formulação precisa estar abaixo de 0.35 (Deb *et al.,* 2023)

Nesse contexto, a formulação NPOC3 foi escolhida por apresentar grande quantidade de óleo de copaíba, porém um tamanho reduzido, PDI próximo de zero, indicando homogeneidade do tamanho das partículas, e potencial zeta elevado, representando boa estabilidade estérica. NPOC3 foi então chamada apenas de NPOC nos estudos subsequentes.

No contexto do câncer, tumores sólidos tem como característica a predominância de vasos sanguíneos irregulares e “vazados” devido à grande taxa de angiogênese, com aumento no processo de formação de novos vasos, para nutri-lo. Isso leva ao fenômeno conhecido como EPR (do inglês, *Enhanced Permeability and Retention,* ou aumento de permeabilidade e retenção) para nanopartículas, no microambiente tumoral (Maeda; Sawa; Konno, 2001).

Nanopartículas com tamanhos reduzidos (150 a 300 nm) são geralmente eficazes na exploração do efeito EPR, pois são grandes o suficiente para se acumularem no tumor, mas ainda pequenas o suficiente para atravessar de volta os vasos sanguíneos “vazados”, levando a melhora terapêutica do composto encapsulado (Neo *et al*., 2009). Ou seja, o tamanho de NPOC com aproximadamente 200 nm, foi escolhido como estratégia para a sua utilização futura em tumores sólidos como o câncer de mama.

A técnica de microscopia eletrônica permite a visualização direta do tamanho, forma e morfologia das nanopartículas, o que é essencial para confirmações desses parâmetros das formulações (Gupta *et al.,* 2024). Os resultados de MEV demonstraram que NPOC foram formadas por partículas esféricas, sem agregados, com superfície lisa e homogênea.

Esses resultados corroboram com informações da literatura de que superfícies lisas, homogêneas e com ausência de agregados indicam processo de formulação bem controlado e bem sucedido para facilitar a internalização das partículas pelas células, além de a forma esférica de partículas facilitar a distribuição homogênea em uma formulação (Vladár; Hodoroaba, 2020).

Para produção de uma nanopartícula efetiva, é necessária uma boa encapsulação de seu composto ativo. Dessa forma, foram realizados experimentos para analisar a eficiência de encapsulação e o doseamento do óleo de copaíba em NPOC. Inicialmente, realizaram-se estudos de infravermelho com transformada de Fourier (IFTR), no qual pode-se observar a ausência de bandas do espectro do óleo de copaíba no espectro de NPOC, além de presença, na formulação, de bandas dos componentes da cápsula polimérica. Esses dados sugerem uma encapsulação bem sucedida do óleo de copaíba no sistema polimérico.

A eficiência de encapsulação e doseamento de óleo de copaíba foram comprovados pelo método de CLAE, no qual obteve-se doseamento de 39,7 mg/mL

e eficiência de encapsulação de 99,6%. Tais resultados indicam que o óleo de copaíba estava presente em praticamente a sua totalidade na formulação, e que o óleo foi imediatamente difundido na fase interna das nanocápsulas, sendo aprisionado pela cápsula polimérica. Esses resultados podem ser comparados com o de Xavier *et al*. (2018), que ao produzirem nanocápsulas de ácido polilático (PLA) carregadas com óleo de copaíba, observaram uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 70%, que já foi considerada satisfatória. Já outro trabalho obteve eficiência de encapsulação do óleo de copaíba de 54% em partículas poliméricas de PCL (Rodrigues *et al.,* 2023).

Para a análise de estabilidade de NPOC sob condições de temperatura em diferentes tempos, foi feito o estudo no qual NPOC foi submetido à temperatura ambiente (25°C), temperatura de refrigeração (4°C) e temperatura de estufa (37°C), durante 60 dias. Nos resultados de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta, é possível observar que NPOC mostrou-se estável na maioria dos dias de análise, com variações maiores na temperatura de 37 ºC após 60 dias. Esse comportamento pode ser justificado pela volatilização do óleo de copaíba em temperaturas mais altas, causando desestabilização da partícula.

No entanto, a temperatura de refrigeração de 4 ºC mostrou maior capacidade de manter o nanossistema estável, indicando melhor forma de armazenamento da mesma. Esse resultado corrobora com Xu *et al.* (2023), que ao submeter nanopartículas de quitosana com óleo de *Cinnamon cassia* ao estudo de estabilidade, também relataram melhor estabilidade durante mais tempo na temperatura de 4 ºC.

Após caracterizações de NPOC, buscou-se avaliar a sua capacidade de internalização em células de câncer de mama humano MCF-7. A internalização é um processo de absorção das nanopartículas, no qual entram no citoplasma ou em compartimentos intracelulares específicos (Oh; Park, 2014).

Os resultados obtidos demonstraram que NPOC foi capaz de ser internalizada pelas células tumorais, acumulando-se, aparentemente, em regiões como o citoplasma e a membrana plasmática. Tal comportamento foi observado por outros estudos, como de Abriata *et al.* (2018), ao observarem que nanopartículas poliméricas de paclitaxel foram internalizadas por células de câncer de ovário SKOV-3, além de se acumularem no citoplasma e membrana plasmática. No entanto, estudos de

captação e localização precisam ser conduzidos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos durante a internalização de NPOC.

Após todos os resultados de formulação, caracterização e internalização celular de NPOC obtidos, é possível sugerir que a nanocápsula possui características ideais de formulação, encapsulamento eficiente e capacidade de penetrar em células de câncer de mama.

Já no contexto de produtos naturais, os óleos essenciais são derivados vegetais de grande impacto nas pesquisas científicas, principalmente devido a sua complexa e variada composição química (Piasecki *et al*., 2021). A literatura reporta a vantagem de obtenção de um efeito sinérgico dos componentes de óleos essenciais em comparação aos efeitos biológicos de seus constituintes individualmente (Baptista-Silva *et al*., 2020).

O óleo de copaíba, extraído de várias árvores do gênero *Copaifera,* é rico em sesquiterpenos e ácidos diterpênicos (Carvalho *et al.,* 2022), possuindo como uma de suas atividades, a ação antitumoral. Essa atividade foi demonstrada em trabalhos como de Abrãao *et al.* (2015), onde o óleo de uma *Copaifera* sp. contra linhagem de células tumorais de mama humano (MCF-7), obteve resultados que mostraram atividade antitumoral significativa. Adicionalmente, o ácido copálico (constituinte químico do óleo) foi avaliado nas mesmas condições experimentais, resultando em ação citotóxica. Esse mesmo composto já demonstrou regular negativamente o receptor de andrógeno (Idippily *et al.,* 2017), potencializando a ação anticâncer de mama. Outros trabalhos indicam que componentes como ácidos caurenóico, 3-hidroxi-copal e 3-acetoxi-copálico apresentaram citotoxicidade contra diversas linhagens tumorais (Vargas, 2015).

No entanto, assim como vários óleos essenciais com atividades farmacológicas, o óleo de copaíba pode ser volátil e quimicamente instável na presença de ar, luz, umidade e variações de temperatura. Com isso, a encapsulação em nanossistemas se apresenta como um procedimento promissor, fornecendo uma liberação mais eficaz do agente ativo, além de protegê-lo contra agentes degradantes (Costa, 2020).

Como demonstrado em experimentos anteriores, um nanossistema é capaz de transportar o óleo essencial através da membrana celular e liberar para atuar no lado interno da membrana citoplasmática. Portanto, as nanopartículas interagem com mais

eficiência com a célula (Prakash *et al*., 2018). O encapsulamento de óleos essenciais em nanopartículas poliméricas apresenta várias vantagens, como: liberação controlada, maior solubilidade, maior seletividade e atividade aprimorada (Pedro *et al.,* 2013).

Diante dos resultados de citotoxicidade obtidos nesse trabalho, pode-se inferir que a formulação NPOC foi capaz de aumentar a citotoxicidade nas duas linhagens câncer de mama, com maior sensibilidade na linhagem MCF-7, quando comparado com o OC isolado, demonstrando melhoramento da atividade farmacológica, principalmente no tempo de 48 h de tratamento. A nanocápsula com óleo inerte (NPMCT) apresentou baixa toxicidade, demonstrando segurança da formulação.

Tais resultados corroboram com os de Salehi *et al.* (2019), que ao testar o óleo essencial de *Zataria multiflora* encapsulado por nanocápsulas do polímero natural quitosana, encontrou uma atividade melhorada quando comparado com o óleo isolado (IC_{50} de 20 e 1,4 µg/mL para o óleo e a nanocápsula, respectivamente) na linhagem de câncer de mama T47D.

Outro estudo investigou os efeitos do óleo essencial de *Ferula gummosa* em nanopartículas do polímero alginato contra células de câncer de mama MDA-MB-231. A pesquisa observou que essas nanopartículas não só melhoraram a atividade antitumoral, com CI_{50} de 104 µg/mL do nanossistema e 184 µg/mL do óleo isolado, mas também influenciaram na expressão de genes relacionados à apoptose, como Bax e Bcl-2 (Osanloo *et al.,* 2023).

Apesar das diversas formas de tratamento para o câncer de mama, uma das mais usadas é a quimioterapia antineoplásica, mesmo com baixa seletividade e causando diversos efeitos colaterais por atingirem células sadias com altas taxas proliferativas (Muhamad *et al.,* 2018). Dessa forma, o desenvolvimento de terapias cada vez mais seletivas é uma estratégia de reduzir a toxicidade, como o caso de utilização de nanossistemas.

Diante disso, a avaliação da citotoxicidade de NPOC na linhagem de células sadias de mama MCF-10A permitiu a obtenção do índice de seletividade (IS). NPOC apresentou um melhor IS (4,4) do que OC isolado (1,2) e o controle positivo doxorrubicina (0,37), demonstrando maior atividade na célula tumoral em comparação com células não tumorais.

Esses dados corroboram com os de Zhaid *et al.* (2017), que investigaram a atividade antitumoral de nanopartículas contendo óleo essencial de cúrcuma em células de câncer de mama MCF-7. Os resultados demonstraram que as nanopartículas apresentaram atividade citotóxica significativa, além de mostrarem seletividade contra as células cancerígenas, preservando as células saudáveis.

Como explicação para a seletividade das nanopartículas, estudos têm apontado que nanossistemas podem penetrar nas células tumorais mais eficientemente do que em células normais, devido a diferenças na estrutura da membrana plasmática de células tumorais, como aumento de glicoproteínas, que interagem com grupos carregados das partículas, além de que as células neoplásicas podem ter um ambiente intracelular que favorece o acúmulo de nanopartículas, como pH mais ácido, o que favorece a integração de partículas na membrana. Células tumorais também apresentam endocitose mais ativa do que células não tumorais, o que facilita a internalização de nanopartículas (Luo, 2021).

Para melhor caracterizar o efeito anticâncer de mama de NPOC e comparar com OC, foram investigados os possíveis mecanismos de ação antitumorais desta nanoformulação na linhagem celular mais sensível a sua citotoxicidade, a MCF-7. Considerando que a CI_{50} após 48 h e 72 h se manteve a mesma (25 µg/mL), foram utilizadas nos demais experimentos o seu valor e a metade (12,5 µg/mL). Ainda, sabendo que 72 h é o tempo de observação do efeito final (morte celular), considerou-se, para a investigação do processo de indução de morte, um tempo de tratamento reduzido, de 48 h.

O impacto antitumoral de diferentes óleos essenciais e alguns de seus compostos bioativos é mediado por uma variedade de processos celulares. Esses processos incluem a interferência nas fases específicas do ciclo celular, a promoção da morte programada das células por apoptose e a modificação dos níveis de estresse oxidativo dentro das células tumorais (Di Martili *et al*., 2020).

A apoptose é um processo da homeostasia celular muito bem regulado e organizado caracterizado por alterações celulares distintas, como condensação de cromatina, clivagem de DNA e formação de *blebs* de membrana (Carneiro; El-Deiry, 2020). No câncer, as células apresentam resistência à apoptose para assim desenvolverem suas atividades proliferativas (Hanahan, 2022) e, desta forma, a

indução deste tipo de morte celular tem sido um dos principais objetivos na terapia antitumoral (Jan; Chaudhry, 2019).

Como observado no estudo de morte celular com LA/IP, o tratamento com o NPOC levou ao aumento de células em estágios de apoptose inicial e tardia. Já OC isolado obteve aumento inferior desses eventos, quando comparado com os grupos de NPOC. As imagens de microscopia confocal confirmam os achados apoptóticos, demonstrando formação dos *blebs* de membrana e condensação de cromatina. Dessa forma, é possível inferir que o óleo de copaíba induz apoptose celular e que tal indução é mais pronunciada quando utilizado na sua forma do nanossistema NPOC.

A indução de apoptose é comum a vários óleos essenciais. O óleo de copaíba, além de induzir citotoxicidade em células tumorais, ativa vias de sinalização de apoptose ao reduzir a viabilidade celular da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (Urasaki *et al.,* 2020).

No estudo conduzido por Domingues (2017), foi avaliada a taxa de apoptose utilizando os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. O trabalho examinou o óleo de copaíba e sua fração resina em cultivos de células epiteliais cancerígenas de pulmão de camundongo (E10). Os resultados mostraram que tanto o óleo *in natura* quanto a fração resina apresentaram significativa atividade apoptótica. Na análise do efeito apoptótico do óleo de *Copaifera reticulata* em linhagens de células cancerosas de pulmão humano, utilizando os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio, Ranieri (2015) observou que a concentração de 0,64 µg/mL induziu apoptose em mais de 80% das células.

A atividade do óleo de copaíba em induzir a célula à apoptose pode ser explicada principalmente pelos seus componentes químicos, a exemplo do óxido de cariofileno, que aumenta os níveis apoptóticos em células de câncer de próstata (PC-3) e mama (MCF-7) por diversos mecanismos (Park *et al.,* 2011). Em adição, o *α*-humuleno e β-cariofileno foi capaz de induzir 85%–90% de apoptose em linhagens celulares de linfomas (Amiel *et al.,* 2012).

Durante o processo de apoptose, alterações nucleares, como condensação e/ou fragmentação da cromatina e encolhimento nuclear (picnose), podem ser observadas (Kabakov; Gabai, 2018). Dessa forma, para confirmar a apoptose induzida por NPOC e OC, realizou-se o ensaio de marcação com Hoechst 34580, o qual demonstrou aumento da porcentagem de fluorescência nos grupos tratados, mais

acentuado em NPOC, assim como na metodologia anterior, o que confirma os eventos apoptóticos mais marcantes nesses grupos.

No contexto de nanopartículas, a maior atividade de NPOC em comparação ao OC na indução de apoptose pode ser explicada pelo fato que nanossistemas poliméricos podem ser mais eficazes na promoção de apoptose, pois oferecem mais reatividade pelo aumento da área de superfície, o que pode desencadear a cascata apoptótica (Mundekkad; Cho, 2022).

Em adição, no processo apoptótico, a mitocôndria desempenha um papel fundamental, uma vez que iniciadores de apoptose podem ativar proteínas pró-apotóticas, como Bax e Bak, que são responsáveis por organizar poros na membrana externa mitocondrial. A abertura desses poros promove liberação de várias proteínas, a exemplo do citocromo c, que conduz a célula à cascata apoptótica pela via intrínseca. A abertura de poros leva também a perda do potencial de membrana mitocondrial, sendo um dos eventos irreversíveis para o processo apoptótico e levando à desregulação celular, com danos e aumento de EROs (Zaib *et al.*, 2022).

Sob esta perspectiva, com a confirmação de apoptose como o tipo de morte induzido pelos tratamentos de NPOC e OC, buscou-se avaliar a via apoptótica envolvida, com análise do potencial de membrana mitocôndrial pelo corante JC-1. O JC-1 é um composto catiônico lipofílico verde que se apresenta como indicador sensível e confiável para a saúde mitocondrial e o estado apoptótico de células (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019). Em células saudáveis, com potencial de membrana mitocondrial mantido, o JC-1 é capaz de formar agregados no interior da organela, que emitem fluorescência vermelha; já em células comprometidas pela morte celular, com perda de potencial de membrana mitocondrial, apresenta-se como monômeros verdes no citoplasma celular (Smiley *et al.,* 1991).

Nos resultados obtidos percebe-se diminuição da razão de JC-1 na forma de agregados em relação à sua forma monomérica, indicando aumento de células com potencial de membrana mitocondrial comprometido nos grupos tratados com NPOC e OC. Ainda, o grupo NPOC demonstrou menor razão que OC, indicando mais uma vez melhora de atividade quando comparado ao óleo isolado. Dessa forma, tal resultado indica envolvimento da via intrínseca da apoptose no mecanismo de ação do óleo de copaíba na linhagem MCF-7. Já o CCCP, agente despolarizador da membrana mitocondrial que age como um controle positivo em experimentos com JC-1 por induzir

a perda do potencial da membrana mitocondrial (Sivandzade; Bhalerao; Cucullo, 2019), apresentou também redução da razão de agregados/não agregados JC-1.

Esses efeitos podem ser justificados pela composição química do óleo de copaíba. Park et al. (2011) descreveram que o óxido de cariofileno, composto presente no óleo, foi capaz de induzir apoptose, perda de potencial mitocondrial, ativação de caspase-3, além de afetar a expressão de vários produtos gênicos que medeiam a proliferação celular na linhagem MCF-7. Já Destryana *et al.* (2014) indicaram que β-cariofileno, outro componente do óleo, pode desempenhar papel importante na indução de apoptose pela geração de EROs e perda de potencial mitocondrial, culminando na liberação de citocromo c em várias linhagens tumorais.

Prosseguindo com o estudo dos mecanismos antitumorais do NPOC e OC, investigou-se a influência destes no estresse oxidativo de MCF-7. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas que, no câncer, apresentam papel dual: em altos níveis, podem levar à indução da proliferação celular e inibição de apoptose; já em níveis ainda mais altos podem levar à citotoxicidade por ativação de vias apoptóticas (Yang; Chen; Shi, 2019). Dessa forma, alguns agentes neoplásicos, como a doxorrubicina, possuem como mecanismo de ação a indução de estresse oxidativo para causar toxicidade às células tumorais (Albasher *et al*., 2019).

No contexto de indução de apoptose, estudos da literatura têm relatado que a produção EROs é um evento comum de mecanismo de ação de vários óleos essenciais (Thalappil *et al*., 2022). Estudos como de Poma *et al.* (2018) mostram que a citotoxicidade de óleos essenciais, como o de *Grevillea rosmarinifolia* (Proteaceae), em células MDA-MB-231 é dependente da produção de EROs e foi reduzida com pré-tratamento de NAC.

Os resultados obtidos do pré-tratamento com NAC de NPOC e OC mostram reversão dos efeitos citotóxicos dos grupos sem pré-tratamento, indicando envolvimento de estresse oxidativo no mecanismo de ação do óleo de copaíba na linhagem MCF-7.

Esses resultados corroboram com estudos sobre componentes do óleo de copaíba, *α*-humuleno e β-cariofileno, que se demonstraram agentes citotóxico, indutores de apoptose e iniciadores da produção de EROs em linhagens celulares de linfomas (Amiel *et al.,* 2012). Em adição, o uso de inibidor da geração de EROs na linhagem MCF-7 tratada com óxido de cariofileno inibiu significativamente a apoptose

(Park *et al.,* 2011). Tais compostos podem ser responsáveis pela atividade oxidante do óleo de copaíba na linhagem MCF-7, trabalhando de maneira sinérgica.

Portanto, a indução de apoptose mediada por EROs é um dos mecanismos fundamentais investigados na citotoxicidade causada por nanopartículas. Quando o estresse oxidativo se intensifica nas células devido à presença de nanopartículas, ele desencadeia a liberação de intermediários que causam danos ao DNA e às proteínas celulares, resultando em citotoxicidade. A presença aumentada de EROs, portanto, desempenha um papel central no processo de apoptose induzida por nanopartículas (Mundekkad; Cho, 2022).

Os estudos de citotoxicidade em modelos de cultivo celular de monocamada têm contribuído há séculos para a pesquisa antitumoral, no entanto, modelos de cultivo tridimensional superam as desvantagens que a 2D pode apresentar, a exemplo de não mimetizar o comportamento de um tumor sólido. Dessa forma, cultivos de células 3D são mais indicados por melhor mimetizarem à morfologia e comportamento tumoral *in vivo* (Coelho, 2020).

Além disso, características físico-químicas de nanossistemas poliméricos podem afetar sua capacidade de difusão em tumores e o método de avaliação mais preciso é com o uso de culturas tridimensionais de esferoides, que, graças a sua similaridade em morfologia e microambiente biológico com tumores sólidos, tem sido utilizada como triagem de nanopartículas no estudo antitumoral (Lazzari; Mura, 2017).

O tratamento com NPOC em esferoides de MCF-7 com média de 300 µm demonstrou citotoxicidade ao reduzir o tamanho dos esferoides nas concentrações testadas. Já o OC isolado não apresentou redução de tamanho significativo, o que corrobora com o fato de que nanopartículas, pelo seu tamanho reduzido e estabilidade físico-química melhorada, conseguem penetrar melhor em ambientes tumorais (Aslan *et al.,* 2013).

O tamanho de nanossistemas possui papel importante na capacidade de penetração do tumor, como discute Ni *et al.* (2015), ao testar nanocristais de paclitaxel com revestimento polimérico de Pluronic F127 em esferoides de câncer de mama 4T1, obtendo melhor capacidade de adentrar ao tumor em comparação com o paclitaxel livre. No entanto, nanocristais com tamanhos ainda mais reduzidos apresentaram vantagem em termos de profundidade de alcance tumoral.

Além do tamanho, as características da superfície das nanopartículas desempenham um papel crucial na sua distribuição dentro dos esferoides. Diversos estudos têm explorado como a carga superficial das nanopartículas afeta sua capacidade de penetração e absorção. Um estudo conduzido por Jin *et al.* (2012) demonstrou que nanopartículas com carga negativa foram capazes de penetrar profundamente em esferoides de MCF-7. Em contraste, nanopartículas com carga positiva tenderam a se acumular predominantemente na superfície externa dos esferoides, indicando diferenças significativas na distribuição com base na carga superficial.

Dessa forma, NPOC, apresentando um tamanho médio de 200 nm e carga negativa, demonstrou maior capacidade de penetrar no esferoide de MCF-7 formado, justificando sua maior atividade quando comparado ao OC livre.

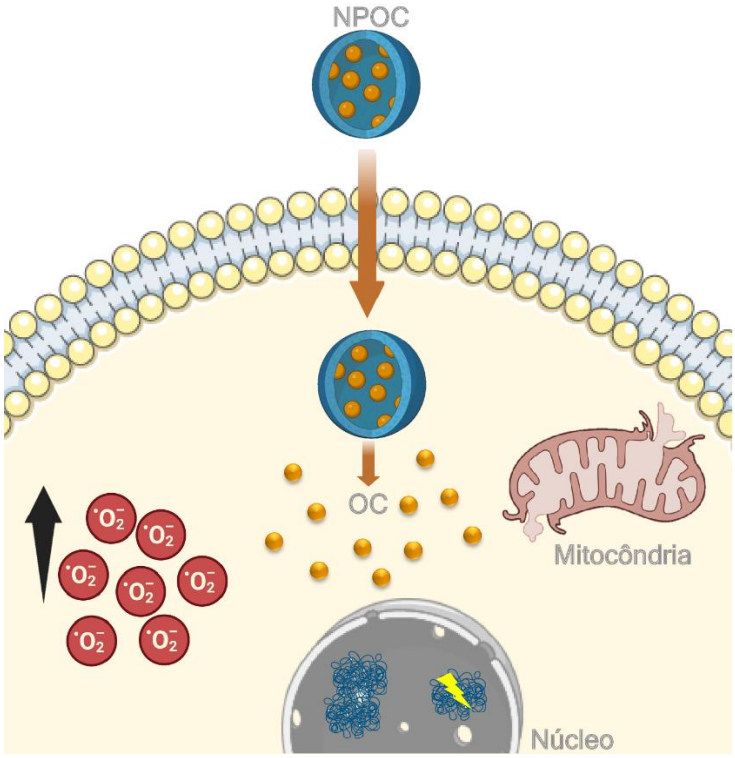
Modelos de esferoides também podem ser usados para estudos de migração celular, avaliando-se o potencial migratório de células tumorais pelo raio de migração do esferoide num tempo inicial e final (Coelho, 2020). Esse modelo é relevante, pois metástase, um traço característico do câncer, envolve a migração e invasão de células tumorais (Qian, Mei & Zhang, 2017). Como resultados de migração celular em esferoides de MCF-7, os esferoides foram capazes de aderir e as células migraram ao longo do tempo de cultura, independente do uso de substratos. Os grupos NPOC e OC nas duas concentrações testadas apresentaram redução de atividade migratória, havendo redução mais proeminente no grupo NPOC por sua capacidade de penetração no esferoide maior, demonstrando capacidade antimigratória do óleo de copaíba e melhorada na sua forma de nanossistema.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, inferimos que a nanopartícula polimérica de óleo de copaíba (NPOC) foi escolhida de acordo com os melhores parâmetros no estudo de pré-formulação e apresentou características estruturais e físico-químicas aptas para os estudos subsequentes, além de demonstrar estabilidade frente a várias temperaturas durante dois meses de análise. NPOC apresentou capacidade de ser internalizada por células tumorais de câncer de mama e apresentou citotoxicidade maior que o óleo isolado nas linhagens de neoplasia mamária, sendo mais sensível na linhagem MCF-7. Além disso, apresentou menor citotoxicidade em linhagens sadias, quando comparado com o óleo isolado e a droga padrão doxorrubicina, sendo então mais seletivo. NPOC mostrou efeito citotóxico maior que o óleo isolado em modelo de cultura celular tridimensional de esferoides de MCF-7, com atividade antimigratória. Em adição, demonstramos que NPOC apresentou efeito anticâncer de mama *in vitro* por ativação de apoptose envolvida com estresse oxidativo e perda de potencial de membrana das mitocôndrias, o que pode ter levado à ruptura de membrana da mitocondrial. Os mecanismos de internalização celular, das vias apoptóticas detalhadas e de marcadores tumorais por nanopartículas podem ser explorados em trabalhos posteriores.

Figura 30. Mecanismos de ação da nanopartícula de óleo de copaíba (NPOC) nas células MCF-7



Fonte: autoria própria.
Legenda: NPOC é capaz de penetrar na célula tumoral e o óleo de copaíba liberado é capaz é promover danos nucleares, estresse oxidativo, rompimento de membrana mitocondrial e apoptose em células de câncer de mama.

Referências

8 REFERÊNCIAS

ABDOLMALEKI, A. *et al.* Importance of nano medicine and new drug therapies for cancer. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 450, 2021.

ABRIATA, J. P. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para a otimização da terapia do câncer de ovário**. Tese de doutorado (doutor em ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo, 2018.

AHMAD, A.; AHSAN, H. Ras-mediated activation of NF-κB and DNA damage response in carcinogenesis. **Cancer Investigation**, v. 38, n. 4, p. 185-208, 2020.

ALBASHER, G. *et al.* Methotrexate-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cells via ROS-mediated bax/bcl-2-cyt-c release cascading. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 21, 2019.

AL-BEDEARY, S.; GETTA, H. A.; AL-SHARAFI, D. The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials. **Iraqi Journal of Hematology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2020.

AMARAL *et al.* Contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de tratamentos para o câncer. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT**, v. 5 n. 2, 2018.

AMARAL, R.G. **Estudo do potencial antitumoral do extrato das folhas da *passiflora alata curtis***. Tese de doutorado (doutorado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2018.

AMIEL E., O. R. *et al*. β-Caryophyllene, a Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (Commiphora gileadensis), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. **Alternative Medicinev**. 2012, 2012.

ARAÚJO JÚNIOR, F. A. *et al*. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n.1, p. 93-9, 2005.

ARRUDA C. *et al*. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on Copaifera genus: a review. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 109, p.1-20, 2019

ASLAN, B. *et al*. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal Drug Target**, v. 21, n. 10, p. 904-913, 2013.

BANKÓ, C. *et al*. Isocyanide substitution in acridine orange shifts DNA damage-mediated phototoxicity to permeabilization of the lysosomal membrane in cancer cells. **Cancers**, v. 13, n. 22, p. 5652, 2021.

BAPTISTA-SILVA, S. *et al.* The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, p. 279-295, 2020.

BARZAMAN, K. *et al*. Breast cancer: biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106535, 2020.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal Of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.

BODEGA, G. *et al*. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1626654, 2019.

BOUTRY, J. *et al*. The evolution and ecology of benign tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1877, n. 1, p. 188643, 2022.

BRANDÃO, H. N. *et al*. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

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.

BRITO, N. M. B. *et al*. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, n. 8, p. 489-93, 2001.

BUKOWSKI, K.; KCIUK, M.; KONTEK, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CARVALHO, C. *et al.* Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2009.

CARVALHO, F. V. *et al.* Docetaxel loaded in copaiba oil-nanostructured lipid carriers as a promising DDS for breast cancer treatment. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8838, 2022.

CAVALCANTI, B. C. *et al*. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388–392, 2006.

CHATTERJEE, R.; CHATTERJEE, J. ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness. **European Journal of Cell Biology**, p. 151073, 2020.

COELHO, L. L. **Utilização de esferoides tumorais mamários para o estudo in vitro do potencial metastático e de resposta terapêutica.** Tese de doutorado (doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

COSTA, I. C. **Nanopartículas poliméricas preenchidas com óleo essencial de Piper nigrum: caracterização química e morfológica**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2020.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al*. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRUZ, I. L. *et al*. Câncer de Mama em mulheres no Brasil: epidemiologia, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 2, p. 7579-7589, 2023.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DA TRINDADE, R. *et al*. Copaifera of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p.1511, 2018.

DAVALLI, P.; MARVERTI, G.; LAURIOLA, A.; D'ARCA, D. Targeting oxidatively induced DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-21, 2018.

DEB, N. *et al*. Enhanced specific loss power of hematite-chitosan nanohybrid synthesized by hydrothermal method. **Royal Society Open Science - Journals**, v. 10, n. 10, 2023.

DESTRYANA, R. A. *et al.* Antioxidant and Anti-inflammation Activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress Essential Oils in Vitro and in Vivo. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1531-1542, 2014.

DI MARTILI, M. *et al*. Essential oils and their main chemical components: The past 20 years of preclinical studies in melanoma. **Cancers**, v. 12, n. 9, p. 2650, 2020.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 303-336, 2012.

DIMER, F. A. *et al*. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DOMINGUES, P. S. **Estudo do efeito antitumoral do óleo de Copaifera reticulata Ducke e sua fração resina em cultivo de células epiteliais cancerosas de pulmão de camundongo.** Dissertação de mestrado (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

DRISTANT, U. *et al*. RETRACTED: An Overview of Polymeric Nanoparticles-Based Drug Delivery System in Cancer Treatment. **Technology in Cancer Research & Treatment.**, v. 22, 2023.

DUARTE, S. S. *et al*. Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. **Pharmacological Reports**, v. 74, p. 545-554, 2022.

DUMITRESCU, R. G.; SHIELDS, P. G. The etiology of alcohol-induced breast cancer. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p. 213-225, 2005.

DUVAL, K. *et al*. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Physiology, v. 32, n. 4, p. 266–277, 2017.

ELDEHNA, W. M. *et al*. Development of 2-oindolin-3-ylidene-indole-3-carbohydrazide derivatives as novel apoptotic and anti-proliferative agents towards colorectal cancer cells. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 319-328, 2021.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

FERLAY, J. *et al*. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778-789, 2021.

FIOCCHETTI, M. *et al*. Neuroglobin: A Novel Player in the Oxidative Stress Response of Cancer Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–9, 2019.

GAO, W. *et al*. A double staining method using calcofluor white and acridine orange to differentiate life stages of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) on hepatopancreatic sections. **Aquaculture**, v. 528, p. 735628, 2020.

GARCIA R. F.; YAMAGUCHI, M. H. Óleo de Copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde Pesquisa**, v. 5, n.1, p.137-146, 2012.

GIACOMELLO, M. *et al*. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 204–224, 2020.

GILMORE, A.; KING, L. Emerging approaches to target mitochondrial apoptosis in cancer cells. **F1000 Research**, v. 8, p. 1793, 2019.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de células: da teoria à bancada.** João Pessoa: Editora UFPB, 2020.

GOULART, M. O; PINTO, A. L. A. **Atividade antiproliferativa do oleoresina de Copaifera duckei em linhagem celular derivada de carcinoma gástrico**. Anais 16º CONGRESSO 20 NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2016, Guarulhos. Guarulhos: 2016. Disponível em < http://conic-semesp.org.br/anais/files/2016/trabalho-1000022173.pdf>. Acesso em agosto de 2024.

GUPTA, P. *et al*. Microscopy based methods for characterization, drug delivery, and understanding the dynamics of nanoparticles. **Medicinal Research Reviews**, v. 44, n. 1, p. 138-168, 2023.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HISADA, Y.; MACKMAN, N. Tissue Factor and Cancer: Regulation, Tumor Growth, and Metastasis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 45, n. 04, p. 385–395, 16 jun. 2019.

HUNTER, Robert J. Zeta potential in colloid science: principles and applications. **London: Academic Press**, 386 p., 1981.

IDIPPILY, N. D. *et al*. Copalic acid analogs down-regulate androgen receptor and inhibit small chaperone protein. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 11, p. 2292-2295, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Incidência de câncer no Brasil – estimativa 2023**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf> Acesso em agosto de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: < https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa > Acesso em agosto de 2024.

JAN, R.; CHAUDHRY, G. S. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205, 2019.

JOSHI, H.; PRESS, M. F. 22 - Molecular Oncology of Breast Cancer, **The Breast**, v. 5, p. 282-307, 2018.

KABAKOV, A. E.; GABAI, V. L. Cell Death and Survival Assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 1709, 2018.

KASHYAP, D. *et al.* Global Increase in Breast Cancer Incidence: risk factors and preventive measures. **Biomed Research International**, v. 2022, p. 1-16, 2022.

KATO, M.J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 621-623, 2001.

KLIESER *et al.* The Crosstalk of miRNA and Oxidative Stress in the Liver: From Physiology to Pathology and Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5266, 2019.

KRUK, J. *et al.* Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. **Free Radical Research**, v. 53, n. 5, p. 497-521, 2019.

LANGEVIN, M. C., KELSEY, K. Mechanisms of Environmental and Occupational Carcinogenesis. **Occupational Cancers**, 2020.

LAWRENCE, M. J. Surfactant systems: their use in drug delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 6, p. 417, 1994.

LAZZARI, G.; COUVREUR, P.; MURA, S. Multicellular tumor spheroids: a relevant 3d model for the in vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 34, p. 4947-4969, 2017.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, 2018.

LIMA, S. R. *et al.* In vivo and in vitro studies on anticancer activity of Copaifera multijuga Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, 2003.

LIU, Z. *et al.* Activation of reactive oxygen species-mediated mitogen-activated protein kinases pathway regulates both extrinsic and intrinsic apoptosis induced by arctigenin in Hep G2. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 29–43, 2020.

LLOYD, J. U. Copaifera officinalis Chicago. The Western Druggist, 13p.,1898.

LOPEZ, L. R.; BLEICH, R. M.; ARTHUR, J. C. Microbiota effects on carcinogenesis: initiation, promotion and progression. **Annual Review of Medicine**, v. 72, 2020.

LUO, X. *et al*. Smart Nanoparticles for Breast Cancer Treatment Based on the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

MACIEL, M. A. *et al*. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidiciplinares. **Quimica Nova**, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MAEDA, H.; SAWA, T.; KONNO, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. **Journal Of Controlled Release**, v. 74, n. 1-3, p. 47-61, 2001.

MAJUMDER, D. *et al*. Understanding the complicated relationship between antioxidants and carcinogenesis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, p. e22643, 2020.

MARCO, F.; FOTI, G.; CORSICO, A. Where are we with the use of N-acetylcysteine as a preventive and adjuvant treatment for COVID-19?. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 715-721, 2022.

MASSON, D. S. *et al*. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 664-669, 2013.

MATSUMURA, Y.; MAEDA H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, v. 46, n. 12, p. 6387-92, 1986.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022.

MENDONCA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba - Copaifera multijuga Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 19, n. 2b, p. 577-581, 2009.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, 2006

MOLEJON, M. I. *et al.* Glycoconjugation: An approach to câncer therapeutics. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 110–120, 2020.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.

MORANA, O.; WOOD, W.; GREGORY, C. D. The Apoptosis Paradox in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1328, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-53, 1983.

MUHAMAD, N.; PLENGSURIYAKARN, T.; NA-BANGCHANG, K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3921-3935, 2018.

MUNDEKKAD, D.; CHO, W. C.. Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1685, 2022.

NAGARAJU, G. P. *et al*. Nanoparticles guided drug delivery and imaging in gastric cancer. **Seminars in Cancer Biology. Academic Press**, 2021.

NENCLARES, P.; HARRINGTON, K. J. The biology of cancer. **Medicine (United Kingdom)**, v. 48, n. 2, p. 67–72, 2020.

NEO, A. E. *et al*. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NEVES, K. J. S. *et al.* Sistemas de entrega de drogas baseados em nanotecnologia: nanopartículas poliméricas para tratamento de câncer / nanotechnology-based drug delivery systems. **Brazilian Journal Of Development**, v. 8, n. 4, p. 24770-24787, 2022.

NI, D. *et al.* Superior intratumoral penetration of paclitaxel nanodots strengthens tumor restriction and metastasis prevention. **Small**, v. 11, p. 2518–2526, 2015.

NOLAN, E.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1708-1728, 2023.

OH, N.; PARK, J. H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. **International Journal Of Nanomedicine**, p. 51, 2014.

OLIVEIRA, E. C. P. *et al.* Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba *(Copaifera spp.)* no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais,** v.8, n.3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, J. G. **Funcionalização de nanossistemas com anticorpos monoclonais para o direcionamento ativo: estado da arte.** Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer Today. **Cancer Fact Sheets**, 2018.

OSANLOO, M. *et al.* Comparison effects of *Ferula gummosa* essential oil and Beta-pinene Alginate nanoparticles on human melanoma and breast cancer cells proliferation and apoptotic index in short term normobaric hyperoxic model. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 428, 2023.

PAJUELO-LOZANO, N. *et al*. XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. OCT, p. 1–11, 2018.

PAJUELO-LOZANO, N. *et al*. XPA, XPC, and XPD Modulate Sensitivity in Gastric Cisplatin Resistance Cancer Cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. OCT, p. 1–11, 2018.

PARK, K. R. *et al.* β-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters***,* v. 312, p. 178–188, 2011.

PEDRO, A. S. *et al.* The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, v. 2, p. 1363-1374, 2013.

PERILLO, B. *et al*. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, p. 1-12, 2020.

PIASECKI, B. *et al.* Composition, anti-MRSA activity and toxicity of essential oils from *Cymbopogon* species. **Molecules**, v. 26, p. 7542, 2021.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. Óleo de copaíba (Copaifera sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

POMA, P. *et al.* Chemical composition, *in vitro* antitumor and pro-oxidant activities of *Glandora rosmarinifolia* (Boraginaceae) essential oil. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0196947, 2018.

PRAKASH, B. *et al.* Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control,** v. 89, p. 111, 2018.

QIAN, C. N.; MEI, Y.; ZHANG, J. Cancer metastasis: issues and challenges. **Chinese Journal of Cancer Research**, 36, n. 1, p. 38, 2017.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fracão volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RANIERI, T. **Avaliação dos efeitos antineoplásicos do óleo da Copaifera reticulata Ducke em linhagens de células cancerosas de pulmão**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RECZEK C. R.; CHANDEL, N. S. The two faces of reactive oxygen species in cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, 2017.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.

RIGAMONTE AZEVEDO, O. C. et al. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: **EMBRAPA - MAPA**, 28p., 2004.

ROBSON, A. A. Nanotecnologias e Alimentos: 1º Relatório da Sessão 2009-10, vol. 2: Evidências. **Comitê de Ciência e Tecnologia da Câmara dos Lordes,** 2010.

ROCHA, B. B. **Imunoterapia para o câncer.** Monografia. Programa de Aprimoramento Profissional/CRH/SES-SP e FUNDAP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/Divisão de Assistência Farmacêutica. São Paulo, 2014.

RODRIGUES, V. M. *et al.* Copaiba Oil-Loaded Polymeric Nanocapsules: production and in vitro biosafety evaluation on lung cells as a pre-formulation step to produce phytotherapeutic medicine. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 161, 2023.

SALEHI, F. *et al*. Incorporation of Zataria multiflora essential oil into chitosan biopolymer nanoparticles: a nanoemulsion based delivery system to improve the in-vitro efficacy, stability and anticancer activity of zeo against breast cancer cells. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 382-392, 2020.

SAMBALE, F. *et al.* Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. **Journal Of Biotechnology**, v. 205, p. 120-129, 2015.

SANT'ANNA, L. S.; FERREIRA, A. P.; MARIA ALENCAR, M. S. M. Patents, drug delivery and public health protection: health risk management for nanopharmaceuticals. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 8, n.2, p.107-118, 2013.

SARTORI, A. C. N.; BASSO, C. S. CÂNCER DE MAMA: UMA BREVE REVISÃO DE LITERATURA. PERSPECTIVA, **Erechim**. v. 43, n.161, p. 07-13. 2019.

SAWADA, N. O.; DIAS, A. M.; ZAGO, M. M. F. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 323-329, 2006.

SBALQUEIRO, G. *et al.* Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde E Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 242–252, 2018.

SCHAFFAZICK, S. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHANKAR, E.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Dietary and Lifestyle Factors in Epigenetic Regulation of Cancer. **Epigenetics of Cancer Prevention**, p. 361–394, 2019.

SIES, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 852, 2020.

SILVA, G. R. **Estudo de formação e estabilidade de nanopartículas de poliácido lático para liberação controlada do óleo essencial de *Shinus Molle* L.** Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SILVA, L. A. **A nanotecnologia e suas aplicações na indústria farmacêutica: uma revisão.** Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação (Bacharel em Farmácia) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, 2019.

SILVA, M. C. **O óleo de copaíba (Copaifera spp.) e sua potencial ação antitumoral: uma revisão de literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Bacharel Interdisciplinar em Ciências Agrárias, Instituto de Biodiversidade e Florestas – Ibef, Universidade Federal do Oeste do Pará – Ufopa, Santarém - Pará, 2019.

SINHA, V.R.; TREHAN, Aman. Biodegradable microspheres for protein delivery. **Journal Of Controlled Release**, v. 90, n. 3, p. 261-280, 2003.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio-protocols**, v. 5, n. 9, 2019.

SMILEY S. T. *et al*. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences***,* v. 88, n. 9, p. 3671-3675, 1991.

SORIANO, María Laura; ZOUGAGH, Mohammed; VALCÁRCEL, Miguel; RÍOS, Ángel. Analytical Nanoscience and Nanotechnology: where we are and where we are heading. **Talanta**, v. 177, p. 104-121, 2018.

SOUZA, M. V. N. *et al*. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 02, p. 25-42, 2007.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAN, B.; NORHAIZAN, M. *Manilkara zapota* (L.) P. Royen leaf water extract triggered apoptosis and activated caspase-dependent pathway in HT-29 human colorectal cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 748-757, 2018.

THALAPPIL, M.A. *et al. Pinus mugo* essential oil impairs STAT3 activation through oxidative stress and induces apoptosis in prostate cancer cells. **Molecules**, v. 27, p. 4834, 2022.

TIBOLA, C. S. *et al.* Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminantes em Grãos. **EMBRAPA – MAPA**, Brasília, DF, 2018.

TOMULEASA, C. *et al.* Nanopharmacology in translational hematology and oncology. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3465–3479, 2014.

URASAKI, Y. *et al*. Fast-Acting and Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Signaling Pathways by Copaiba Essential Oil. **International Journal of Molecular Sciences***,* v. 21 p. 2259, 2020.

VARGAS, F.D.S. *et al.* Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from Copaifera spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, p. 6194–6210, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera L.* **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-86, 2002.

VENDITTI, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. **Journal of King Saud University - Science**. v. 31, n.3, p. 398-411, 2017.

VLADÁR, A. E.; HODOROABA, V. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. **Characterization Of Nanoparticles**, p. 7-27, 2020.

VOSS, A. K.; STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Research**, v. 9, 2020.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment. **Jama**, v. 321, n. 3, p. 288, 2019.

WHITE, N. D. Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. **American Journal Of Lifestyle Medicine**, v. 12, n. 3, p. 224-226, 2018.

XAVIER-JUNIOR, F. H. *et al*. Development of a Gas Chromatography Method for the Analysis of Copaiba Oil. **Journal Of Chromatographic Science**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017.

XAVIER-JUNIOR, F. H. *et al*. Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 251-258, 2018.

XU, X. *et al*. Cinnamon cassia oil chitosan nanoparticles: physicochemical properties and anti-breast cancer activity. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 224, p. 1065-1078, 2023.

YAN, G.; ELBADAWI, M.; EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their key features. **World Academy of Sciences Journal**, v. 2, n. 2, p. 39-48, 2020.

YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. **Chemical Reviews Journal**, v. 119, p. 4881-4985, 2019.

YU, W. *et al.* Acquisition of cisplatin resistance shifts head and neck squamous cell carcinoma metabolism toward neutralization of oxidative stress. **Cancers**, v. 12, p. 1670, 2020.

YU, Z. *et al.* Role of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (arc) in cancer (Review). **Oncology Letters**, p. 5691–5698, 2019.

YUAN, R. *et al.* Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 19-27, 2017.

ZAIB, S. *et al*. A meta-analysis and experimental data for multidrug resistance genes in breast cancer. **African Health Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1-9, 2022.

ZAID, O. A. *et al.* Protective role of new nanocomposite natural product (basic nano-curcumin) against breast carcinoma. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 33, n. 2, p. 107-116, 2017.

ZEFFERINO *et al.* Gap Junction Intercellular Communication in the Carcinogenesis Hallmarks: Is This a Phenomenon or Epiphenomenon? **Cells**, v. 8, n. 8, p. 896, 2019.

ZHANG, X. *et al.* Novel multiple agents loaded PLGA nanoparticles for brain delivery via inner ear administration: In vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 595–603, 2013.

Anexos

9 ANEXOS

Anexo 1

Componentes do óleo de copaíba detectados por cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EMS)

Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	5.084	35505	0.01		43.00
2	6.216	424498	0.15	1-Butanol, 3-methyl-, acetate (CAS)	43.05
3	6.265	171450	0.06	1-Butanol, 2-methyl-, acetate (CAS)	43.05
4	8.378	27028	0.01		280.95
5	8.906	22267	0.01	CYCLOPENTANE, (3-METHYLBUTYLIDENE)-	95.15
6	8.955	12992	0.00		119.05
7	9.015	123003	0.04	CYCLOHEXENE, 1-METHYL-4-(1-METHYLETHENY	68.05
8	9.120	29433	0.01		93.05
9	9.170	11355	0.00		147.05
10	10.170	23107	0.01		40.00
11	10.357	126551	0.04	1,3,6-OCTATRIENE, 3,7-DIMETHYL-	121.10
12	10.522	35509	0.01	Cyclopentasiloxane, decamethyl-	73.05
13	12.202	9762	0.00		73.05
14	12.429	97924	0.03	(-)-.beta.-Elemene	81.10
15	12.520	2148801	0.74	Elemene <delta->	121.10
16	12.628	2575729	0.89	Cubebene <alpha->	105.05
17	12.713	49146	0.02		95.10
18	12.777	76003	0.03		133.05
19	12.886	13671267	4.72	.alpha.-Copaene	105.10
20	12.985	3823889	1.32	(-)-.beta.-Elemene	93.05
21	13.150	1403385	0.48	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-oct	119.10
22	13.210	187266	0.06	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7-dimethyl-7-(4	94.10
23	13.301	196310097	67.84	TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE	41.05
24	13.429	1331471	0.46	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7-dimethyl-7-(4	94.10
23	13.301	196310097	67.84	TRANS(.BETA.)-CARYOPHYLLENE	41.05
24	13.429	1331471	0.46	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7-dimethyl-7-(4	94.10
25	13.548	27905311	9.64	.alpha.-Humulene (CAS)	93.05
26	13.606	1336474	0.46	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trime	93.05
27	13.661	5123931	1.77	Muurolene <gamma->	161.10
28	13.699	4081902	1.41	.beta.-Farnesene	69.05
29	13.818	8075887	2.79	.beta.-Bisabolene (CAS)	69.10
30	13.888	2138446	0.74	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-me	93.05
31	13.981	9123471	3.15	Cadinene <delta->	161.10
32	14.108	193565	0.07	Cadinene <alpha->	105.05
33	14.177	131245	0.05		157.10
34	14.274	298084	0.10	(-)-Caryophyllene oxide	43.05
35	14.416	1496619	0.52	Tricyclo[6.3.1.02,5]dodecan-8-ol <1,4,4-trimeth	111.05
36	14.506	2104137	0.73	Caryophyllene oxide	43.05
37	14.602	796528	0.28	4-(2',6',6'-TRIMETHYLCYCLOHEX-1'-EN-1'-YL)BU	82.05
38	14.679	342886	0.12	Humulene epoxide II	67.10
39	14.754	824413	0.28	Humulane-1,6-dien-3-ol	109.10
40	14.848	1269378	0.44	Torreyol	161.10
41	14.920	704382	0.24	Cadin-4-en-10-ol	95.10
42	15.042	321220	0.11	.alpha.-Bisabolol	43.05
43	15.238	124158	0.04	junipercamphor	43.05
44	15.523	177457	0.06		252.95
45	16.121	27708	0.01		326.90
46	17.342	24254	0.01		55.05
47	17.765	21696	0.01		281.00
48	21.927	22783	0.01		44.00
		289393373	100.00		

Fonte: Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (BiotecFarm)

Anexo 2

ARTIGOS PUBLICADOS COM TEMÁTICA RELACIONADA

CHEMISTRY & BIODIVERSITY

Research Article

Assessment of the *in Vitro* Antimelanoma Potential of *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae) Essential Oil

Ana Luiza de Oliveira Lopes, Camyla Caroliny Neves de Andrade, Sâmia Sousa Duarte, Karinne Kelly Gadelha Marques, Ramon Ramos Marques de Souza ... See all authors

First published: 23 October 2023 | https://doi.org/10.1002/cbdv.202300717

Read the full text > PDF TOOLS SHARE

Abstract

Essential oils stand out among natural products for their complex composition, frequently described in the literature with a range of biological effects. This study evaluated the cytotoxic activity against several human cancer cell lines of essential oils extracted from the leaves of *Lippia microphylla* (EO-LM) Cham. (Verbenaceae). The melanoma cell line SK-MEL-28 was the most sensitive to the EO-LM, presenting an IC_{50} of 33.38±1.16 μg/mL. Afterward, the effects of EO-LM on the cell cycle, induction of apoptosis, and production of reactive oxygen species (ROS) were evaluated. We stated a significant increase in the sub-G1 population, indicating apoptosis, later confirmed by an increase of SK-MEL-28 cells labeled with Annexin V-FITC and by the formation of apoptotic bodies and membrane blebs, observed by confocal microscopy. Additionally, EO-LM reduced the production of ROS, indicating antioxidant activity. Therefore, EO-LM exhibits anti-melanoma activity *in vitro*, suggesting its potential as an anticancer agent.

BioNanoScience
https://doi.org/10.1007/s12668-024-01557-z

RESEARCH

Synthesis of Polyglycerol/PolyCaprolactone Nanocopolymers as Innovative Architectures for Drug Delivery

Diego Botelho Campelo Leite[1,2] · Edmilson Miranda de Moura[1] · Edvani Curti Muniz[1] · Edson Cavalcanti da Silva Filho[1] · Anderson Nogueira Mendes[3] · Lívia Alves Filgueiras[3] · Adegildo Rolim de Abreu Júnior[4] · Juan Carlos Ramos Gonçalves[4] · Karinne Kelly Gadelha Marques[4] · Marianna Vieira Sobral[4] · André Luis Menezes Carvalho[5] · Carla Verônica Rodarte de Moura[1]

Accepted: 20 July 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract
Nanoparticles represent an innovative class of drug delivery systems that have gained increasing interest in nanotechnology applied to medicine. This study focused on the development of two Polyglycerol/PolyCaprolactone Nanocopolymers to be able to carry pharmaceuticals. The copolymers were characterized by FTIR, NMR, TG, DSC, MALDI, SEM, and DLS techniques. Two monomer initiators (glycerol and 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane) have been used, and the polymerization was obtained by anionic ring-opening polymerization of the glycerol carbonate, with CO_2 liberation leading to a branched polyether. The hyperbranched polymer was employed as a macroinitiator to initiate the ring-opening polymerization of ε-caprolactone, resulting in the multiarm star copolymers. The structures for the nanocopolymers were proposed based on nuclear magnetic resonance results. Hemolytic studies revealed that the copolymers do not have hemolytic activity. The copolymers were tested for safety against human cells and toxicity in cancer cells. The tests indicated that they are safe for in vivo applications and do not have anti-cancer efficiency, corroborating their purpose as a polymeric support for drug delivery.

Keywords Polyglycerol · PolyCaprolactone · Nanocopolymers · Drug delivery

Open Access Article

The Essential Oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae) Exerts an In Vitro Antimelanoma Effect by Inducing Apoptosis and Modulating the MAPKs, NF-κB, and PKB/AKT Signaling Pathways

by **Rafael Carlos Ferreira**, **Sâmia Sousa Duarte**, **Valgrícia Matias de Sousa**, **Ramon Ramos Marques de Souza**, **Karinne Kelly Gadelha Marques**, **Renata Albuquerque de Abrantes**, **Yuri Mangueira do Nascimento**, **Natália Ferreira de Sousa**, **Marcus Tullius Scotti**, **Luciana Scotti**, **Josean Fechine Tavares**, **Juan Carlos Ramos Gonçalves**, **Marcelo Sobral da Silva** and **Marianna Vieira Sobral** *

Postgraduate Program in Natural Products and Bioactive Synthetics, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil

* Author to whom correspondence should be addressed.

Pharmaceuticals **2023**, *16*(11), 1553; **https://doi.org/10.3390/ph16111553**

Submission received: 5 October 2023 / Revised: 21 October 2023 / Accepted: 25 October 2023 / Published: 2 November 2023

Abstract

The characterization and cytotoxicity of the essential oil from *Conyza bonariensis* (L.) aerial parts (CBEO) were previously conducted. The major compound was (*Z*)-2-lachnophyllum ester (EZ), and CBEO exhibited significant ROS-dependent cytotoxicity in the melanoma cell line SK-MEL-28. Herein, we employed the Molegro Virtual Docker v.6.0.1 software to investigate the interactions between the EZ and Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs), the Nuclear Factor *kappa* B (NF-κB), and the Protein Kinase B (PKB/AKT). Additionally, in vitro assays were performed in SK-MEL-28 cells to assess the effect of CBEO on the cell cycle, apoptosis, and these signaling pathways by flow cytometry and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay using MAPKs inhibitors. CBEO induced a significant increase in the sub-G1 peak, as well as biochemical and morphological changes characteristic of apoptosis. The in-silico results indicated that EZ interacts with Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1), c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1), p38α MAPK, NF-κB, and PKB/AKT. Moreover, CBEO modulated the ERK1/2, JNK, p38 MAPK, NF-κB, and PKB/AKT activities in SK-MEL-28 cells. Furthermore, CBEO's cytotoxicity against SK-MEL-28 cells was significantly altered in the presence of MAPKs inhibitors. These findings support the in vitro antimelanoma effect of CBEO through apoptosis induction, and the modulation of ERK, JNK, p38 MAPK, NF-κB, and PKB/AKT activities.

Keywords: **natural products**; **essential oil**; **antitumor effect**