



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SANDRO DA SILVA BORGES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOFORMULAÇÃO BASEADA NA ASSOCIAÇÃO ENTRE FIBROINA DA SEDA
E AMIDAS DE ÁCIDOS GRAXOS**

Macapá

2024

SANDRO DA SILVA BORGES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOFORMULAÇÃO BASEADA NA ASSOCIAÇÃO ENTRE FIBROINA DA SEDA
E AMIDAS DE ÁCIDOS GRAXOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira

Macapá

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

B732 Borges, Sandro da Silva.

Desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de nanoformulação baseada na associação entre fibroína da seda e amidas de ácidos graxos / Sandro da Silva Borges. - Macapá, 2024.

1 recurso eletrônico. 68 folhas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Macapá, 2024.

Orientadora: Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira.

Coorientador: Irlon Maciel Ferreira.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Bombyx mori. 2. Câncer de mama. 3. Canabinóides. I. Oliveira, Anna Eliza Maciel de Faria Mota, orientadora. II. Ferreira, Irlon Maciel. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 615

BORGES, Sandro da Silva. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de nanoformulação baseada na associação entre fibroína da seda e amidas de ácidos graxos**. Orientadora: Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira. Co-orientador: Irlon Maciel Ferreira. 2024. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2024.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
NANOFORMULAÇÃO BASEADA NA ASSOCIAÇÃO ENTRE FIBROINA DA SEDA
E AMIDAS DE ÁCIDOS GRAXOS**

Esta dissertação de mestrado foi submetida ao processo de avaliação pela banca examinadora e julgadora adequada para defesa.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira

Presidente



Prof. Dr. Sued Eustáquio Mendes Miranda

Membro



Prof. Dr. Fábio Rodrigues de Oliveira

Membro

Macapá

2024

Dedico este trabalho a minha amada mãezinha, a minha esposa e minha filha, que nas conquistas vibraram comigo, que nos momentos difíceis me sustentaram, e quando mais precisei, compreenderam minhas impaciências e ausências. A vocês, minha eterna gratidão e amor.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida, pela saúde (física e mental), por me capacitar e ter dado forças para chegar ao final dessa jornada.

À minha família, que é o meu bem maior, quero agradecer por compreender minhas ausências e impaciências durante esse processo. Foi, é e sempre será por vocês que luto cada batalha, obrigado pelo amor, pelo apoio e por sempre acreditarem que sou capaz. As mulheres da minha vida (mãe, esposa e filha), meu muito obrigado!

À minha orientadora, Profa. Dra. Anna Eliza, obrigado pela oportunidade de aprender contigo, obrigado porque nos momentos difíceis desta caminhada esteve comigo e nunca soltou a minha mão, obrigado pela amizade construída e pelas conversas de incentivo, cobranças e conselhos, obrigado por ter tornado essa jornada mais leve e sei que foi Deus quem reservou você para ser minha orientadora. Obrigado porque me ensinastes que não importam as circunstâncias, as coisas sempre irão dar certo e como você mesma sempre diz “Tá joia!”

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Irlon Maciel, obrigado por todo o suporte e apoio que destes nos momentos bons e ruins, obrigado pelo laço de amizade fortalecido durante essa pesquisa, obrigado pelo acolhimento, pelos conselhos e pelo incentivo. Peço permissão para me apropriar do seu bordão e dizer que trabalhar contigo foi “Show do milhão!”

Ao meu amigo Dr. Victor Hugo Marinho, obrigado pela paciência em ensinar, obrigado pelo apoio, obrigado por ter estado disponível durante toda essa jornada, a você fica minha admiração.

Ao Dr. Sued Miranda, quero gentilmente externar meu sincero agradecimento por todo apoio e suporte. Obrigado por ter doado um pouco do seu valioso tempo em prol desse projeto, sem a vossa ajuda não teríamos chegado até aqui. Obrigado!

À toda família BIORG (Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada), quero agradecer pelas trocas de conhecimento, pelos momentos de descontração e pelas amizades construídas.

À Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), através do Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica (PPGCF) quero agradecer pela oportunidade de capacitação.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta neste trabalho, muito obrigado!

“Entrega o teu caminho ao SENHOR, confia nEle, e o mais Ele fará”. Salmos 37:5

Introdução: Mundialmente, o câncer de mama apresenta elevada incidência e mortalidade para a população feminina, tanto os tumores primários quanto os metastáticos são tratados com drogas quimioterápicas, muitas vezes pouco seletivas, que resultam na destruição do câncer e das células saudáveis; afim de melhorar a adesão e reduzir os efeitos adversos aos tratamentos, inúmeras pesquisas vêm desenvolvendo metodologias baseadas em produtos naturais, como alternativa terapêutica, neste contexto, as amidas de ácidos graxos ou amidas graxas surgem como uma opção terapêutica, por exemplo, a literatura aponta efetiva atividade anticancerígena de oleamidas e anandamidas (amidas de ácidos graxos) contra o câncer, somando-se a isso as nanoformulações são capazes de aumentar a biodisponibilidade e a concentração dos princípios ativos nos tumores mamários. **Objetivos:** Conhecer o potencial antitumoral *in vitro* do carreador lipídico nanoestruturado contendo amidas de ácidos graxos e fibroína da seda (CLN/FAA-FS) em linhagens de células de câncer de mama murino 4T1 e fibroblastos saudáveis. **Materiais e métodos:** Para a obtenção das amidas de ácidos graxos, foi a reação de amidação direta a partir do óleo de andiroba, em seguida, as amidas graxas foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas (CG-MS, FT-IR e RMN ^{13}H), depois foram incorporadas em carreador lipídico nanoestruturado contendo fibroína da seda - como fase surfactante; para determinar o tamanho da gotícula, perfil do índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (PZ) do carreador nanoestruturado foram realizados ensaios de estabilidade físico-química e coloidal em diferentes meios biológicos, por último a viabilidade celular contra linhagens celulares 4T1 e fibroblastos foi determinada através de ensaio de citotoxicidade. **Resultados e discussão:** Os resultados obtidos da semi-síntese mostraram que N-isobutiloleamida foi o principal produto da reação (44%), sendo posteriormente confirmado em espectrometria de massa (MS) por impacto de elétrons (70 eV) com íon molecular de 337 m/z e pico base de 115 m/z ; a avaliação físico-química da formulação mostrou baixos valores de índice de polidispersão ($\leq 0,3$) e tamanho médio de partícula ideal; os resultados encontrados para CLN-FAA/FS em relação ao tamanho médio das partículas foi de $136,9 \pm 23,6$ nm, PZ foi de $-6,37 \pm 7,27$ mV e PdI de $0,19 \pm 0,04$, mostrando distribuição monodispersa, por último o ensaio colorimétrico Sulforodamina B detectou uma redução na viabilidade celular para culturas de células 4T1 incubadas com $0,18 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ de sistema nanoestruturado contendo amidas de ácidos graxos e fibroína de seda (CLN-FAA/FS). **Conclusão:** O óleo da andiroba é rico em triglicerídeos e ácidos graxos e essa característica o torna uma excelente fonte lipídica para a semi-síntese de amidas graxas, estas amidas de ácidos graxos quando incorporadas em carreador lipídico nanoestruturado apresentam elevada atividade citotóxica frente as células de câncer de mama murino 4T1 e nenhuma citotoxicidade para fibroblastos saudáveis, assim, diante destes achados, o sistema CLN/FAA-FS tem potencial para tornar-se um candidato a fármaco, contudo estudos futuros precisam ser realizados, afim de que se possa conhecer a farmacocinética e farmacodinâmica.

Palavras-Chave: *Bombyx mori*; Câncer de mama; Andiroba; Canabinóides; Biomateriais, Citotoxicidade

Introduction: Worldwide, breast cancer has a high incidence and mortality for the female population, both primary and metastatic tumors are treated with chemotherapy drugs, often not very selective, which result in the destruction of cancer and healthy cells; in order to improve adherence and reduce adverse effects to treatments, numerous researches have been developing methodologies based on natural products, As a therapeutic alternative, in this context, fatty acid amides or fatty amides emerge as a therapeutic option, for example, the literature points to effective anticancer activity of oleamides and anandamides (fatty acid amides) against cancer, adding to this nanoformulations are able to increase the bioavailability and concentration of active ingredients in breast tumors. **Objectives:** To know the *in vitro* antitumor potential of the nanostructured lipid carrier containing fatty acid amides and silk fibroin (CLN/FAA-FS) in 4T1 murine breast cancer cell lines and healthy fibroblasts. **Materials and methods:** To obtain the fatty acid amides, it was the direct amidation reaction from andiroba oil, then the fatty amides were characterized by spectroscopic techniques (CG-MS, FT-IR and ^{13}H NMR), then were incorporated into nanostructured lipid carrier containing silk fibroin - as surfactant phase; to determine the droplet size, polydispersion index (PDI) and zeta potential (PZ) profile of the nanostructured carrier physicochemical and colloidal stability tests were performed in different biological media, finally the cell viability against 4T1 cell lines and fibroblasts was determined through cytotoxicity assay. **Results and discussion:** The results obtained from the semi-synthesis showed that N-isobutyloleamide was the main product of the reaction (44%), being later confirmed in mass spectrometry (MS) by electron impact (70 eV) with a molecular ion of 337 m/z and a base peak of 115 m/z ; the physicochemical evaluation of the formulation showed low values of polydispersion index (≤ 0.3) and ideal mean particle size; the results found for CLN-FAA/FS in relation to the mean particle size were 136.9 ± 23.6 nm, PZ was -6.37 ± 7.27 mV and PoI of 0.19 ± 0.04 , showing monodisperse distribution, and finally the Sulforodamine B colorimetric assay detected a reduction in cell viability for cell cultures of 4T1 cells incubated with 0.18 ± 0.06 $\mu\text{g/mL}$ nanostructured system containing fatty acid amides and silk fibroin (CLN-FAA/FS). **Conclusion:** Andiroba oil is rich in triglycerides and fatty acids and this characteristic makes it an excellent lipid source for the semi-synthesis of fatty amides, these fatty acid amides when incorporated into a nanostructured lipid carrier have high cytotoxic activity against 4T1 murine breast cancer cells and no cytotoxicity to healthy fibroblasts, Thus, in view of these findings, the CLN/FAA-FS system has the potential to become a drug candidate, but future studies need to be carried out in order to know the pharmacokinetics and pharmacodynamics.

Key words: *Bombyx mori*; Breast cancer; Andiroba; Cannabinoids; Biomaterials, Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de metástase tumoral _____	19
Figura 2 - Imagens de mamografia com mama normal, mama com um cisto benigno e com um câncer de mama, respectivamente _____	20
Figura 3 - Estrutura química das amidas de ácidos graxos primários (oleamida) e amidas de ácidos graxos etanolamidas (anandamida). _____	26
Figura 4 - Estruturas químicas dos principais representantes de cada um dos três grupos de FAA _____	27
Figura 5 - Exemplificação da anandamida (AEA) ligando-se a um receptor canabinóide ____	29
Figura 6 - Compostos fitocanabinóides da planta Cannabis sativa _____	30
Figura 7 - Compostos canabinóides endógenos _____	32
Figura 8 - Processo de biossíntese e degradação das três principais aciletanolamidas: Anandamida (AEA), oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA) _____	34
Figura 9 - Estrutura molecular de diferentes FAA _____	35
Figura 10 - Representação da acumulação de um nanocarreador por direcionamento passivo (A) e ativo (B) em tecido tumoral _____	38
Figura 11 - Representação dos nanosistemas entregadores de fármacos neoplásicos _____	40
Figura 12 - Espectro de massa (70 eV) da N-isobutiloleamida _____	50
Figura 13 - Espectro infravermelho de OA (preto) e FAA (vermelho) _____	51
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹³ C de OA (a) e FAA (b) _____	52
Figura 15 - Representação gráfica da estabilidade físico-química em relação ao tamanho, polidispersão e potencial zeta do CLN na presença e ausência de FAA e FS para os tempos 0, 3, 7, 15 e 30 dias _____	53
Figura 16 - Distribuição de tamanho e polidispersão do CLNb na ausência de FAA e SF para os tempos 0, 60, 120, 240, 480 e 1440 minutos, em diferentes meios biológicos _____	54
Figura 17 - Distribuição de tamanho e polidispersão do CLN-FAA/FS para os tempos 0, 60, 120, 240, 480 e 1440 minutos, em diferentes meios biológicos _____	55
Figura 18 - Viabilidade em células de câncer de mama murino 4T1 _____	57
Figura 19 - Viabilidade em fibroblastos humanos saudáveis _____	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos quimioterápicos para tratar o câncer de mama primário e metastático _____	22
Tabela 2 - Localização dos Receptores canabinóides _____	28
Tabela 3 - Características farmacodinâmicas do CBD em diferentes receptores _____	31
Tabela 4 - Medicamentos comercialmente disponíveis que utilizam nanosistemas de distribuição de fármacos _____	39
Tabela 5 - Primeira e segunda geração de nanopartículas lipídicas contendo paclitaxel e sua atividade citotóxica em linhagens celulares de cancers _____	42
Tabela 6 - Formulação dos sistemas nanoestruturados _____	45
Tabela 7 - Tamanho médio e PDI de CLNb e CLN-FAA/FS _____	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: ácido araquidônico

AEA: N-araquidonoiletanolamina

AMT: transportador de membrana de aciletanolamidas

AO: ácido oleico

CBR: Receptor canabinóide

CBD: Canabidiol

CDCl₃: clorofórmio deuterado

CLN: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

CLNb: Carreador lipídico nanoestruturado branco

CLN-FAA/FS: Carreador lipídico nanoestruturado contendo amidas de ácidos graxos com fibroína da seda

CM: câncer de mama

DCNT: doença crônica não transmissíveis

DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium

DOX: dexorubicina

eCB: sistema endocanabinóide

eth: etanolamina

FAA: amidas de ácidos graxos

FAAH: amida hidrolase de ácido graxo

FS: fibroína da seda

FTIR: Infravermelho com Transformada de Fourier

GPR: Receptor acoplado a proteína G

LCR: Líquido cefalorraquidiano

LPF: Amano lipase from pseudomonas fluorescens

LPS: lipossomos

MAGL: lipase monoacilgliceróis

MGL: monoacil glicerol

NAAA: N-aciletanolamina ácido amidase

NAES: N-aciletanolaminas não canabinoide

NAPE-PLD: N-acil fostatidiletanolamina fosfolipase D seletiva

NAT: N-aciltransferase

NC: Nanocarreadores

NLS: Nanopartículas Lipídicas Sólidas

OA: Óleo da andiroba

OEA: N-oleoiletanolamina

PA: ácido palmítico

PBS: tampão fosfato

PdI: Índice de polidispersão

PEA: palmitoiletanolamina

PPAR γ : Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PZ: Potencial zeta

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RMN ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear

SEA: N-estearoiletanolamina

SFB: Soro fetal bovino

THC: Tetrahidrocannabinol

TM: Tamanho médio

TRPM: Receptor potencial transitório do canal catiônico subfamília M membro

TRPV: Receptor transiente potencial do canal catiônico subfamília V

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

5-HT $_{1A}$: Receptor de serotonina 1A

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 CÂNCER.....	18
<i>3.1.1 Câncer, um problema de saúde pública</i>	<i>18</i>
<i>3.1.2 Câncer de mama.....</i>	<i>19</i>
<i>3.1.3 Terapias farmacológicas para câncer de mama</i>	<i>20</i>
3.2 AMIDAS GRAXAS.....	26
3.2.1 Fitocanabinóides	29
<i>Δ-9-THC (Tetrahidrocannabinol).....</i>	<i>30</i>
<i>Canabidiol (CBD)</i>	<i>30</i>
3.2.2 Endocanabinóides.....	31
3.2.3 N-aciletanolaminas não canabinoide (NAES).....	34
3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS DE FÁRMACOS A BASE DE LIPÍDEOS E SEU PAPEL NO CÂNCER.....	37
4 MATERIAIS E METODOS	44
4.1 Reagentes	44
4.2 Obtenção dos compostos.....	44
<i>4.2.1 Semi-síntese das amidas de ácidos graxos.....</i>	<i>44</i>
<i>4.2.2 Degomação da Fibroína da Seda.....</i>	<i>44</i>
<i>4.2.3 Preparo do Carreador Lipídico Nanoestruturado</i>	<i>45</i>
4.3 Ensaios para caracterização espectroscópica	45

4.3.1 Cromatografia em Fase Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS)	45
4.3.2 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	46
4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹³ C).....	46
4.4.1 Estabilidade físico-química	46
4.4.2 Estabilidade coloidal frente aos meios biológicos	46
4.4.3 Cultivo das linhagens celulares.....	47
4.4.4 Avaliação da Viabilidade das linhagens Celulares.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Avaliação da semi-síntese e das caracterizações espectroscópicas.....	49
5.2 Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química do CLNb e CLN-FAA/FS	52
5.3 Avaliação da estabilidade coloidal frente aos meios biológicos.....	54
5.4 Avaliação da viabilidade em linhagem de células de câncer de mama murino 4T1 e fibroblastos humanos saudáveis.....	56
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	60
7 REFERENCIAS	61
ANEXOS E APÊNDICE	68
Artigo submetido	68

O câncer é uma doença crônica não transmissíveis (DCNT) que apresenta alta taxa de prevalência e mortalidade em todo o mundo, sendo ele responsável pela segunda causa de mortes por DCNT no Brasil para ambos os sexos. O estadiamento tardio aumenta a taxa de incidência para todas as idades, além disso, o câncer afeta todas as classes sociais, sobretudo os grupos mais vulneráveis como idosos, pessoas com baixa escolaridade e renda.

Dentre os mais de 100 tipos de câncer existentes, o câncer de mama é o segundo tipo que mais acomete a população feminina e o tratamento varia conforme o agravo da doença. Assim, os medicamentos quimioterápicos que são empregados na terapia tanto para o câncer primário quanto o metastático, além de combaterem as células cancerígenas, podem destruir células saudáveis. Diante deste cenário, inúmeros estudos têm-se voltado à descoberta de novos compostos sintéticos ou naturais, que tenham menos efeitos adversos, cujo intuito é melhorar a adesão e auxiliar no tratamento.

Nesta conjuntura surgem as amidas de ácidos graxos (FAA) que são moléculas estruturalmente simples constituídas por uma cabeça polar e uma cauda de ácidos graxos, podendo essa extremidade ser oriunda de fontes naturais como o óleo da andiroba (OA). Os estudos bioquímicos e farmacológicos mostraram que as FAA são moléculas endocanabinóides e canabinomiméticas que podem desencadear diversas respostas fisiológicas, quando interagem com os receptores CB₁R e CB₂R do sistema endocanabinóide. Dependendo da interação com o tipo de receptor canabinóide as respostas fisiológicas podem incluir analgesia, atividade anti-inflamatória, anticancerígenas, entre outras.

Registra-se que a primeira amida de ácido graxo isolada foi a palmitoiletanolamida e que ficou conhecida devido sua atividade anti-inflamatória. Ela foi inicialmente isolada em 1957 do óleo do amendoim, gema do ovo e da lecitina de soja. Historicamente, as FAA mais conhecidas e estudadas são a anadamida e oleanamida, sendo que essa última, está presente em diversos fluidos biológico e até mesmo no câncer de mama onde atua como protetor autócrino contra a proliferação celular, além destas, mais de 90 amidas de ácidos graxos são conhecidas no organismo.

As FAA são divididas em 3 grupos distintos, sendo eles:

1. as derivadas de planta exclusivos da espécie *Cannabis sativa* que tem como representante o canabidiol e THC;

2. os canabinóides endógenos ou endocanabinóides que tem como representantes a anandamida, 2-araquidonil glicerol, palmitoiletanolamida e a oleiletanolamida;
3. as N-aciletanolaminas não-canabinóides que são representadas pela *N-palmitoiletanolamina* (PEA), *N-oleoiletanolamina* (OEA), *N-araquidonoiletanolamina* (AEA), *N-estearoiletanolamina* (SEA), neste grupo, encontram-se também os canabinóides semissintéticos.

Tendo em vista que, a busca por metodologias e produtos farmacêuticos com potenciais quimioterápicos que sejam ativamente análogos as substancia endógenas faz-se necessário, uma vez que, por similaridade no processo de estimulação fisiológica, a utilização de produtos canabinomimeticos semissintéticos causa expectativa quanto a minimização de efeitos adversos e potenciais efeitos terapêuticos.

Assim, o foco desta pesquisa foi realizar o estudo da atividade antitumoral das amidas de ácidos graxos semi-sintetizadas a partir do óleo da andiroba, encapsuladas em um sistema de distribuição de fármacos nanoestruturado contendo fibroína da seda (FS), aplicados em linhagem de células de câncer de mama murina 4T1 e fibroblastos humanos saudáveis.

2.1 Objetivo Geral

- Conhecer o potencial antitumoral do carreador lipídico nanoestruturado contendo fibroína da seda e amidas de ácidos graxos semi-sintetizadas a partir do óleo de andiroba (CLN/FAA-FS).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar semi-síntese e identificar as principais amidas de ácidos graxos semi-sintetizadas a partir do óleo de andiroba.
- Caracterizar as formulações CLN/FAA-FS quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e Índice de Polidispersão.
- Avaliar a estabilidade coloidal do sistema CLN/FAA-FS.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do CLN/FAA-FS em linhagem celular de câncer de mama (4T1) e fibroblastos humanos saudáveis.

3.1 CÂNCER

3.1.1 Câncer, um problema de saúde pública

Em termos conceituais a palavra câncer é utilizada para descrever um grupo de mais de 100 doenças que resultam em crescimento celular desordenado e com capacidade de se espalhar em diversos tecidos e órgãos (BATISTA; MATTOS; SILVA, 2015).

Já no contexto epidemiológico, o câncer é classificado como uma Doença Crônica Não Transmissível (DCNT) com tendência de aumento na prevalência e elevação da taxa de mortalidade, de modo que no ano de 2016 vitimou 9 milhões de pessoas no mundo, o que representou 22% de todas as mortes causadas por DCNT naquele ano. Além disso a tendência estimada para o ano de 2030 é que haverá 26 milhões de novos casos e desses 17 milhões irão evoluir para óbitos em decorrência da doença (ALVES et al., 2021).

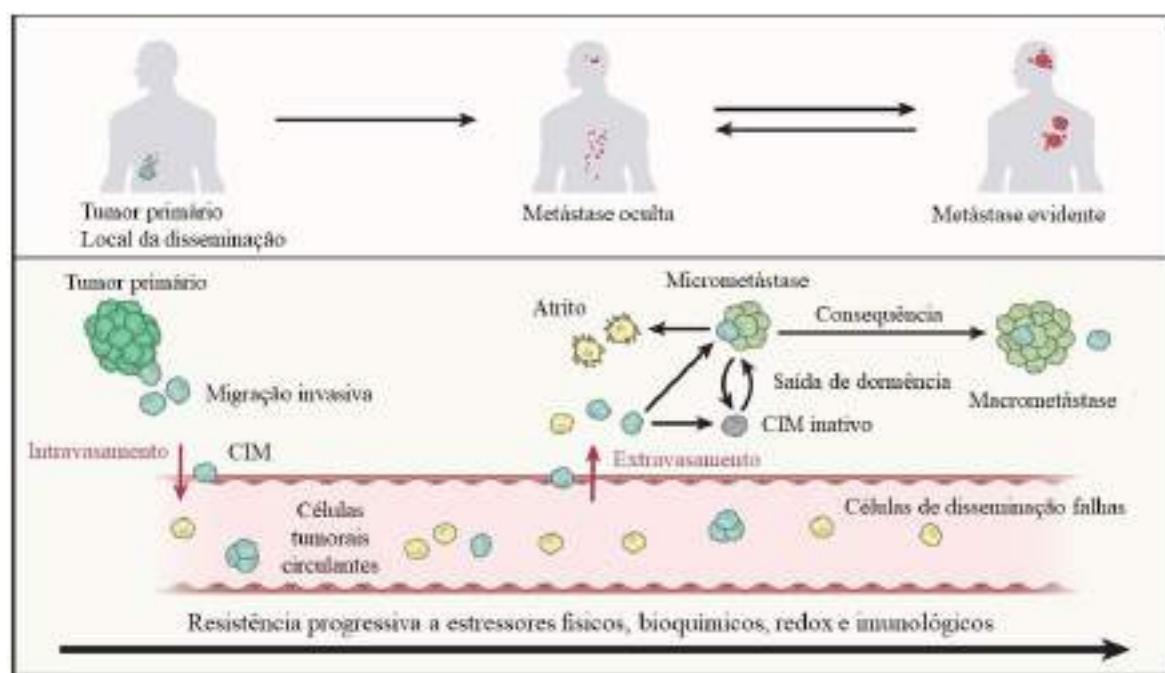
O segundo tipo de câncer com mais diagnósticos no mundo é o câncer de mama (CM) com aproximadamente 2,08 milhões de novos casos por ano, sendo este um dos principais responsáveis pelas causas de óbitos por câncer da população feminina (ARNOLD et al., 2022).

O cenário brasileiro é semelhante ao cenário mundial, ou seja, o Brasil possui alta taxa de mortalidade e a incidência relacionada ao CM é de aproximadamente 74 mil novos casos previstos para 2025. Isso coloca o CM na quinta posição do ranking das causas de mortes no país por DCNT, ficando atrás apenas das mortes causadas por infarto agudo do miocárdio, pneumonia, *Diabetes Mellitus* (DM) e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (BESSA, 2021).

O processo no qual a célula perde a capacidade de diferenciação, com proliferação acentuada podendo ultrapassar os tecidos normais na adjacência é conhecido como neoplasias ou tumores. São classificados em benignos ou malignos de acordo com suas características morfológicas, crescimento celular e comportamento biológico. As neoplasias benignas possuem crescimento lento e estrutura semelhantes ao tecido originário, além de não possuírem a capacidade de invadir outros tecidos ou órgãos, causando as metástases. Por sua vez, no caso de neoplasias malignas, o crescimento celular é acelerado, desordenado e menos diferenciado. Pode haver perda da função original do tecido, além de alta invasibilidade e capacidade de disseminar por meio de metástases (INCA, 2011).

A metástase é a principal característica dos tumores malignos (Figura 1) e 90% das mortes causadas por câncer estão relacionadas ao processo de metástase do tumor. Durante o processo, a célula cancerígena se desprende do tumor primário, se infiltra no microambiente circundante, atravessa vaso sanguíneo caindo na corrente sanguínea conseguindo escapar do sistema imunológico do hospedeiro e sobreviver a hemodinâmica sanguínea até extravasar em órgãos secundários onde se colonizam (ZIBARA et al., 2015).

Figura 1 - Mecanismo de metástase tumoral



Nota: CIM – células iniciadoras de metástase

Fonte: Adaptado (GERSTBERGER; JIANG; GANESH, 2023)

Em decorrência da sua dimensão social, econômica e epidemiológica, o câncer é um desafio a ser enfrentado pelos sistemas de saúde no mundo; sobretudo no fortalecimento ao acesso dos diversos níveis de atenção à saúde como medidas de prevenção, diagnóstico e tratamento, ou seja, o diagnóstico adequado e precoce é um fator importante para o bom prognóstico da doença, pois quando descoberto no estágio inicial há maior chance de cura (BATISTA; MATTOS; SILVA, 2015).

3.1.2 Câncer de mama

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontou que para cada ano do triênio 2020-2022 a estimativa para o risco em se ter CM foi de 61,6 casos para cada 100 mil brasileiras, isso

colocou o CM como prioridade na agenda de saúde no que tange às DCNT. Já para o triênio 2023-2025 serão esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano, com incidência de 10,5% para o CM. A doença se configura como a neoplasia maligna mais comum em todo o mundo, além de ser a primeira em número de mortes (INCA, 2023a, 2023b; RODRIGUES et al., 2021).

O CM é definido como uma neoplasia em forma de nódulo que pode ser indolor ou não e que acomete as mamas ou por vezes as axilas. Nas mamas podem ocorrer secreções, vermelhidão, dor e alteração da pele, as ínguas das axilas ficam constantemente inchadas. Outra característica é em relação a prevenção, no CM há métodos de prevenção primária e secundária. A primária está relacionada ao autoexame das mamas, subtração de amostra e componentes cancerígenos, já os métodos de prevenção secundária baseiam-se no Exame Clínico das Mamas (ECM) realizado por médicos e enfermeiros treinados e do rastreio de nódulos por mamografia (Figura 2) (DIAS; MAIA; LOPES, 2021).

De forma geral o câncer é caracterizado por mutações no DNA, contudo no CM essas mutações podem desencadear-se ou agravar-se em decorrência dos fatores de crescimento (FC) e hormônios sexuais. Nesse último caso, ocorre pela exposição ao estrogênio e seus metabólitos que desencadeiam mutações em genes que codificam proteínas da via fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K), responsável pela regulação celular como: proliferação e sobrevivência das mesmas (ZILLI; SIMAS, 2019).

Figura 2- Imagens de mamografia com mama normal, mama com um cisto benigno e com um câncer de mama, respectivamente



Fonte: (ADES, 2021)

3.1.3 Terapias farmacológicas para câncer de mama

A terapia antineoplásica incluem uma ampla gama metodológica que inclui cirurgia, radioterapia, endócrino terapia e quimioterapia, neste último caso, tanto o câncer primário e o

metastático são tratados com drogas quimioterápicas que inibem a proliferação celular, que são extremamente citotóxicas, que em muitos casos agem de forma inespecífica atingindo tanto células malignas como normais, causando prejuízos no corpo das pacientes, como supressão do sistema imunológico, supressão da medula óssea, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade entre outros (Tabela 1). Isso se torna um grande obstáculo para a terapia e a fim de melhorar a adesão das pacientes ao tratamento e minimizar as reações adversas, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas baseadas em produtos naturais (KEFAYAT et al., 2020).

Neste sentido, há uma vasta literatura sobre estudos e ensaios *in vivo* e *in vitro* envolvendo amidas de ácidos graxos (FAA) naturais e/ou sintéticas, que vem sendo exploradas em decorrência do potencial anticancerígeno (LOPES, 2010).

Tabela 1 - Medicamentos quimioterápicos para tratar o câncer de mama primário e metastático

Primário/ Metástase	Medicamento	Subtipo	Ações	Efeitos adversos
Primário	Paclitaxel	Taxanos	Inibir a proliferação de células cancerígenas, promovendo a polimerização de microtúbulos nas células	Desordens do sangue e do sistema linfático; do sistema imunológico; do metabolismo e nutrição; desordens psiquiátricas; do sistema nervoso e do cardíaco; desordens vasculares; gastrointestinais; hepatobiliares e musculoesquelético.
	Belinostate	Inibidor da histona deacetilase (HDACi)	Tratamento do linfoma periférico de células T	Diminuição da contagem de células do sangue; infecções graves; problemas no fígado; síndrome de lise tumoral; náuseas, vômito e diarreia.
	5-azacitidina	Inibidor da DNA metiltransferase (DNMTi)	Tratamento da síndrome mielodisplásica	Anemia, neutropenia, trombocitopenia, creatina sérica elevada, insuficiência renal, acidose tubular renal, hipocalemia, coma hepático.
	Tocilizumabe (actemra)	Anticorpo Monoclonal	Inibidores de IL-6; inibir a formação de células-tronco cancerígenas em células TNBC	Infecções graves; perfuração do estômago ou intestinos; problemas hepáticos (hepatotoxicidade); desordem no sistema imunológico.
Metástase	Doxorrubicina	Antraciclinas	Interferindo com os efeitos apoptóticos diretos e a ação da isomerase II local do DNA	Infecção, alterações hematológicas, desordens hepáticas, desordens cardíacas e vasculares.

Ciclofosfamida	Agentes alquilantes	Alterações nos metabolitos ativos ou inativos no organismo e efeitos anticancerígenos da mostada fosforamida	Desordens geniturinárias, gastrointestinais, hematopoiéticas; cistite hemorrágica, infecções secundárias, potencial oncogênico e neoplasias secundárias, alteração na pele e suas estruturas, problemas no sistema respiratório.
Vorinostat	Inibidor da histona desacetilase (HDACi)	Epidroga; tratamento do linfoma cutâneo de células T	Alteração gastrointestinal, hematológica, alteração no paladar, boca seca e cansaço.
Tazemetostat	Inibidor da metiltransferase de histona (HMTi, EZH1i)	Epidroga. Tratamento do sarcoma epitelióide. Linfoma folicular recidivante ou refratário	Fadiga, dor oncológica, desordem gastrointestinal, sangramento e infecção.
Atezolizumabe+ Paclitaxel	Anticorpo Monoclonal	Prolonga a sobrevida livre de progressão em pacientes com câncer de mama PD-L1-positivo; inibição do TNBC metastático visando PD-L1.	Alopecia, fadiga e náusea, pneumonia, dispneia e pirexia, inflamação no fígado, tireoide hipoativa.
Metotrexato	Antimetabólitos	Inibir a síntese de nucleotídeos; aumentar a concentração de AICAR	Sepse, síndrome de lise tumoral, distúrbios do sistema linfático e sangue, distúrbios do sistema imune, do sistema nervoso, do metabolismo e nutrição, distúrbios psiquiátricos, transtornos oculares, cardíacos e distúrbios vasculares, respiratório, torácicos e do mediastino, distúrbios gastrintestinais e hepatobiliares, distúrbios renais e urinários.

Tivozanib	Inibidor de tirosina quinase (TKI)	Inibidor de VEGF/VEGFR; inibe a angiogênese	
Trastuzumabe	Anticorpo monoclonal	Tem como alvo o receptor HER2/neu em células cancerosas	Distúrbios dos sistemas sanguíneo e linfático, sistema imune, distúrbio oculares, cardíacos, respiratórios, torácico e do mediastino, distúrbios renais e urinários, distúrbios de gravidez, puerpério e perinatal.
Lapatinibe	Inibidor de tirosina quinase (TKI)	Inibidores da transdução de sinal do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do receptor epidérmico humano tipo 2 (HER2)	Arritmia ventricular, alteração na atividade elétrica do coração e respiração ofegante devido a diminuição do volume sanguíneo bombeado; icterícia, urina escura, hepatotoxicidade, desordens gastrointestinais.
Palbociclibe	Inibidor CDK4/6	Inibidor de CDK4/6; impedir que as células se movam da fase do ciclo celular G1 para a fase S durante a divisão	Desordens hematológicas, gastrointestinais, redução de apetite, estomatite, alopecia, astenia, pirexia, rash, fadiga.
Pertuzumabe	Anticorpo monoclonal	Tem como alvo o receptor HER2/neu; induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC)	Distúrbios de pele e do tecido subcutâneo, distúrbios respiratórios, torácicos e mediastinais; distúrbios cardíacos; distúrbios do sistema imune; distúrbios hematológicos e linfático; distúrbios do sistema nervoso; distúrbios respiratórios e oculares.
Epirrubicina	Antraciclinas	Um epímero de doxorubicina; bloqueia a síntese de ácidos nucleicos e proteínas inserindo anéis planares entre pares de bases de nucleotídeos	Cardiotoxicidade, toxicidade hematológica; leucemia secundária, distúrbios gastrointestinais; alterações hematológicas e renal, síndrome de lise tumoral, efeitos

imunossupressores/aumento da
suscetibilidade a infecções, prejuízo na
fertilidade.

Fonte: Adaptado de (PARK et al., 2022; PRODOCTOR, 2024).

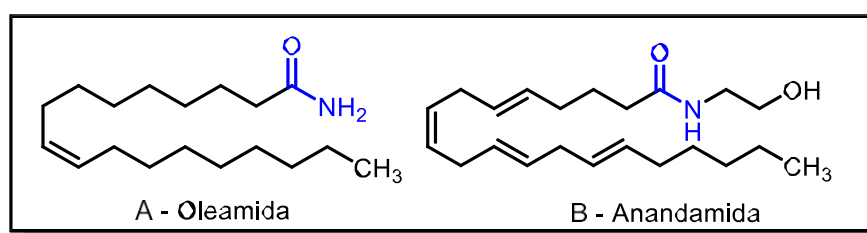
3.2 AMIDAS GRAXAS

O interesse pelas amidas de ácidos graxos (FAA) iniciou na década de 1950 com a descoberta da palmitoiletanolamida, substância com atividade anti-inflamatória identificada no óleo do amendoim, na gema do ovo e na lecitina de soja, que em 1957 foi isolada como a primeira amida graxa. Com o passar do tempo, os estudos bioquímicos e farmacológicos mostraram que as FAA fazem parte de um grupo especial de lipídios biologicamente ativos, que podem ser encontradas em diversas matrizes biológicas, como vegetais terrestres e aquáticos, animais, microrganismos, organismos unicelulares e até mesmo em cânceres (LOPES, 2010).

Em relação a estrutura química, as FAA com cadeias longas podem ser divididas em dois grupos: as amidas de ácidos graxos primários que tem como principal representante a oleamida (Figura 3A) e amidas de ácidos graxos etanolamidas representadas principalmente pela anandamida (Figura 3B) (TAO et al., 2022).

No caso da matriz biológica do câncer citado anteriormente, vale destacar que, no processo de interrupção de proliferação celular do câncer de mama, embora a FAA oleamida, não possua afinidade com nenhum subtipo de receptor canabinóide, ela pode elevar o efeito antiproliferativo da anandamida por inibição competitiva com a FAAH (amida hidrolase de ácido graxo), dessa forma evita a degradação da anandamida e aumenta a concentração endógena desta (JONES; HOWL, 2003).

Figura 3 - Estrutura química das amidas de ácidos graxos primários (oleamida) e amidas de ácidos graxos etanolamidas (anandamida).



Fonte: Autoria própria.

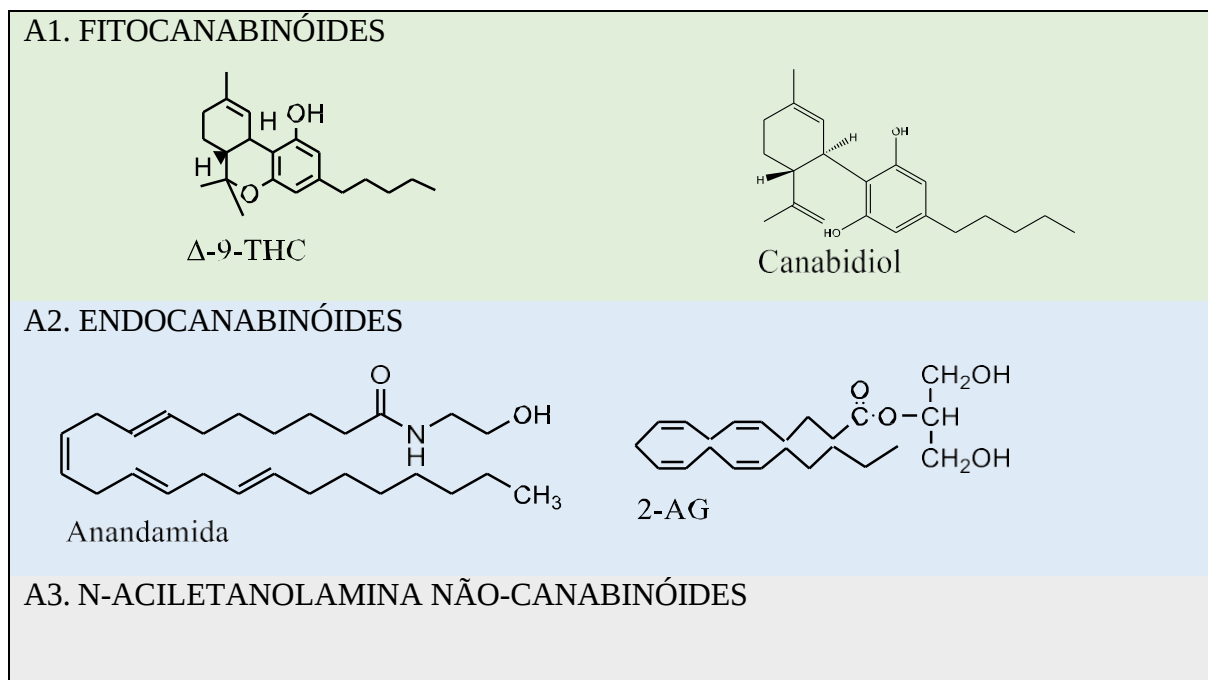
De forma geral as amidas de ácidos graxos podem ser classificadas em três grupos distintos (Figura 4) sendo eles: os fitocanabinóides, os endocanabinóides e *N*-aciletanolamina não-canabinóides, como os canabinóides sintéticos ou canabinominéticos (LESSA et al., 2016).

Estes grupos de FAA interagem com o sistema endocanabinóide (eCB) que se encontra vastamente distribuído no corpo (Tabela 2) e que é capaz de modular inúmeros processos fisiológicos como ingestão de alimentos, aprendizado, motivação, memória, ciclo de sono/vigília e percepção da dor, fazendo com que o eCB desperte grande interesse científico e seja um promissor alvo terapêutico (PROSPÉRO-GARCÍA et al., 2019).

Neste sentido, os principais alvos terapêuticos do eCB incluem os receptores endocanabinóides, como o CB₁R descoberto em 1988 e CB₂R descoberto em 1993, ambos fazem parte da família das proteínas de membranas celular acopladas a proteína Gi/0. Esses receptores possuem interações e afinidades para reconhecer e responder aos três diferentes grupos de agonistas canabinóides e é essa interação que gera as respostas fisiológicas, imunológicas, hormonais e neurais (GROSSO, 2020).

Estudos em fase pré-clínica evidenciam que a dor aguda ou crônica podem ser bloqueadas através dos agonistas de receptores canabinóides CB₁R e CB₂R com possível redução da inflamação, isso acontece porque ambos os agonistas tem papel na atividade antinociceptiva, no caso da dor crônica neuropática o CB₂R desempenha atividade em células micróglias com liberação de dopamina limitando os mecanismos neuroinflamatórios (BRUNI et al., 2018).

Figura 4 - Estruturas químicas dos principais representantes de cada um dos três grupos de FAA





Fonte: (TSUBOI et al., 2018)

No sistema nervoso central encontram-se os receptores CB₁R enquanto que os receptores CB₂R estão abundantemente presentes no sistema imune. CB₂R são os principais receptores do sistema endocanabinóide envolvidos no processo de regulação da resposta imune devido sua variada expressão nas células imunológicas. Em níveis distintos de RNAm o CB₂R pode distribuir-se da seguinte forma: linfócitos B > células Natural Killer > monócitos > polimorfonucleares neutrófilos > células T CD8 > células T CD 4 (RODRÍGUEZ MESA et al., 2021).

Tabela 2 - Localização dos Receptores canabinóides

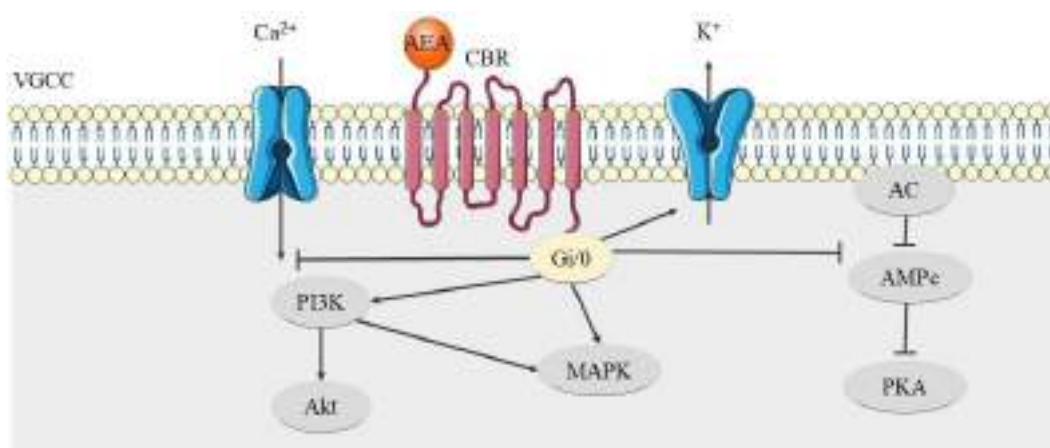
CB₁R	•Córtex, Hipocampo •Gânglios da Base •Hipotálamo •Cerebelo •Medula espinhal •Gânglios da Medula Dorsal •Sistema Nervoso Entérico •Adipócitos •Células Endoteliais •Hepatócitos •Músculo •Trato Gastrointestinal	CB₂R	• Sistema Imunológico: • Células T • Células B • Baço • Amígdalas • Células Microgliais Ativadas
------------------------	--	------------------------	---

Fonte: (GODOY-MATOS et al., 2006)

Ainda de acordo com Godoy-Matos *et al.*, os receptores do tipo endocanabinóides acoplados a proteína G, quando ativados inibem a adenilato-ciclase fechando os canais de cálcio (Ca²⁺) sensível a voltagem e abrem o os canais de potássio (K⁺) retificador interno (MAP quinase) estimulando as proteínas quinases (Figura 5) ativadas por mitógenos (MAPKs) e recrutam beta-arrestinas. A variabilidade da sinalização do CB₁R está voltada a sua propensão

em dimerizar-se com a GPCRs e receptores opioides, já os receptores CB₂R são voltados a regulação da imunidade e inflamação (LU; MACKIE, 2021).

Figura 5 - Exemplificação da anandamida (AEA) ligando-se a um receptor canabinóide



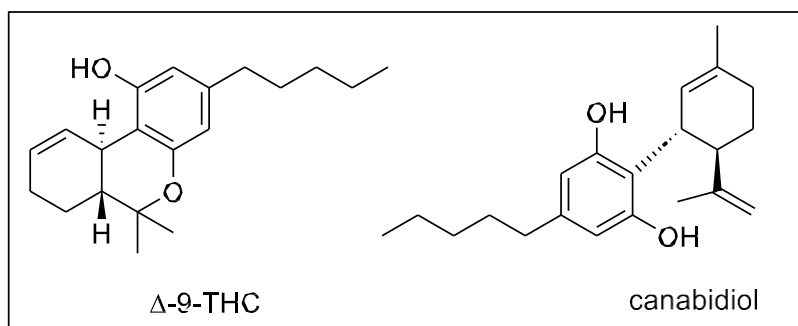
Anandamida (AEA) liga-se ao Receptor Canabinóide (CBR) acoplado a Proteína Gi/o desencadeando algumas vias de sinalização, como a ativação do canal de Potássio (K⁺), ativação da Proteína quinase Ativada por Mitôgênio (MAPK) e inibindo de Adenilato Ciclase (AC), da AMP ciclico (AMPe) e da proteína quinase A (PKA), estimulação da via Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt), além do bloqueio do Canal de Cálcio dependente de voltagem (VGCC).

Fonte: Adaptado de (LIMA, 2020).

3.2.1 Fitocanabinóides

A *Cannabis sativa* L. é uma planta com propriedades psicotrópicas, mas que é exaustivamente estudada devido seu potencial terapêutico, além disso existem relatos históricos de sua utilização para os mais diversos fins, que vão desde rituais religiosos, alimentação e práticas medicinais. A Pen-Ts'ao Ching (considerada mundialmente como sendo a primeira farmacopéia) aponta que por volta de 2000 anos atrás os chineses já utilizavam a *Cannabis* na medicina com finalidade terapêutica, já na farmacopéia dos assírios a *Cannabis* era considerada o principal medicamento. Por volta de 300 anos atrás, a nomenclatura da planta diferencia-se de acordo com o uso, nos rituais religiosos a planta era chamada de *qunnabu*, no uso medicinal *azallu* ou simplesmente *gan-zi-gun-nu* para a “a droga que suga a mente” (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006).

Figura 6 - Compostos fitocanabinóides da planta *Cannabis sativa*



Fonte: Autoria própria.

Δ-9-THC (*Tetrahydrocannabinol*)

O Δ-9-THC é um fitocanabinóide que possui a capacidade de interagir com os receptores canabinóides CB₁R e CB₂R (MESA *et al.*, 2021), ele é o principal componente psicoativo da *Cannabis*, que foi isolado na forma pura e identificado por Raphael Mechoulam e Yechiel Gaoni em 1964. Mais tarde, por volta dos anos 70, outros canabinóides foram sintetizados e isolados tendo sua biossíntese e principais rotas elucidadas. Isso abriu portas para compostos canabinóides sintéticos baseados na estrutura THC como o Cesamet[®] (Nabilona) e Marinol[®] (Dronabinol, (-)-Δ-9-THC). Ambos são comercializados como medicamentos antieméticos utilizados durante o tratamento do câncer e como estimulantes de apetite em pacientes soro positivos anoréxicos (HONÓRIO; ARROIO; SILVA, 2006).

Canabidiol (CBD)

O canabidiol é um componente não-psycoativo da *Cannabis* que foi isolado em 1940 por Roger Adams, mas que teve sua completa elucidação somente em 1963. Seu caráter não-psicotrópico está no fato do canabidiol não possuir ação nos receptores de endocanabinóides CB₁R e CB₂R como o THC, mas na de aumentar a atividade do receptor 5-HT_{1a}, sendo assim conhecido como droga “multi-alvo”, resultando em benefícios farmacológicos, nos modelos clínicos e experimentais (YOCHIMURA, 2019).

Ainda que o CBD não se ligue no sítio ortostática com os receptores CB₁R e CB₂R, sua interação ocorre através da ligação alostérica com esses receptores (Tabela 3), de modo que no receptor CB₁R o CBD possui atividade agonista/antagonista inverso com Ki de 3,3 a 4,8 nM. Já no receptor CB₂R o CBD funciona como antagonista e o Ki é de 4,3 nM. Além disso, o CBD possui alta afinidade com os alvos moleculares de TRPVs (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4) e possui também afinidade com alvos GPR55, PPAR_γ, receptor GABA_A, receptor TRPM8 (PENG *et al.*, 2022).

O Nabiximols (Sativex[®]) é um medicamento que foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento analgésico adjuvante da dor intratável e persistente de câncer avançado em pacientes adultos que não respondem as maiores doses toleradas de opioides, além da dor neuropática, a formulação do Sativex[®] apresenta-se na proporção de 1:1 do CBD e Δ -9-THC (BOIVIN, 2021; PAGANO et al., 2022).

Tabela 3 - Características farmacodinâmicas do CBD em diferentes receptores

Receptor	Ação	Afinidade
CB ₁ R	Antagonista inverso/agonista Modulador alostérico negativo	K _i = 3,3 ~4,9 nm IC ₅₀ = 0,27-0,96 nm
CB ₂ R	Antagonista Agonista inverso Modulador alostérico negativo	K _i = 4,3 μ M CE ₅₀ = 503 nm IC ₅₀ = 3 nm
GPR55	Antagonista	IC ₅₀ = 445 nm
TPPA1	Agonista	CE ₅₀ = 110 nm
TRPV1	Agonista	CE ₅₀ = 1000 nm
TRPV2	Agonista	CE ₅₀ = 1250 nm
TRPV3	Agonista	CE ₅₀ = 3700 nm
TRPV4	Agonista	CE ₅₀ = 800 nm
TRPM8	Antagonista	IC ₅₀ = 160 nm
5-HT _{1A}	Agonista indireto	N.D.
PPAR γ	Agonista	CE ₅₀ = 2010 nm
FAAH	Inibidor	27,5 μ m
D2	Agonista parcial	K _i = 11 nm em D2 _{alto} K _i = 2800 nm em D2 _{baixo}

Fonte: Adaptado de (PENG et al., 2022)

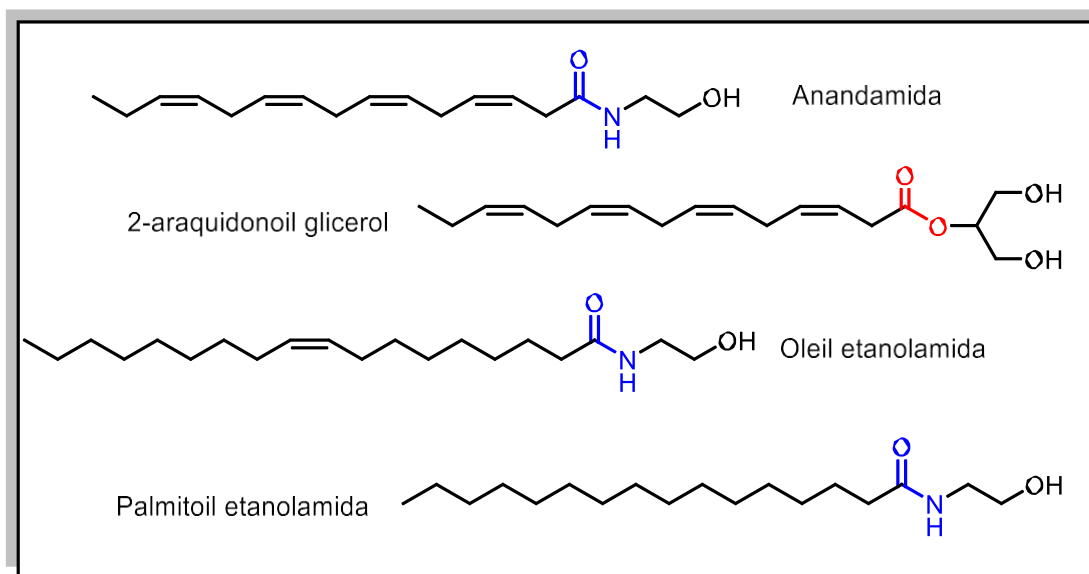
3.2.2 Endocanabinóides

Os endocanabinóides atuam como mediadores lipídicos que exercem atividades quando ligados aos receptores canabinóides CB₁R e CB₂R ou receptores não canabinóides como receptores acoplados a proteína G (GPCRs) isso inclui o GPR18, GPR55 e GPR119; receptores transitórios de potencial vanilóide tipo 1 (TRPV1) e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs); após demanda dos precursores fosfolipídicos de membrana os endocanabinóides são liberados para exercerem as atividades (CAMMAROTA et al., 2023).

O conjunto das reações bioquímicas dos endocanabinóides devem ser precisas, uma vez que os endocanabinóides apresentam tempo de meia-vida de 15 minutos, assim, essa cinética e dinâmica faz com que os endocanabinóides sejam reconhecidos como neurotransmissores preponderantemente retrógrados, onde a síntese e liberação vai depender dos estímulos nocivos transmitidos aos neurônios pós-sináptico ou seja são regulados por vias nociceptivas (ARAÚJO; ALMEIDA; ARAÚJO, 2023).

Em relação a atividade antitumoral os lipídios endocanabinóides que se ligam aos receptores CB₁R e CB₂R ativam diversas vias de sinalização molecular regulando importantes funções como crescimento e proliferação das células, isso é importante frente as células cancerígenas, visto que possuem mecanismo de apoptose desregulado, logo a sinalização regulada pela ligação dos endocanabinóides com os receptores canabinóides podem regular a proliferação dessas células tumorais induzindo a apoptose (SANTOS, 2014).

Figura 7 - Compostos canabinóides endógenos.



Fonte: Autoria própria.

Anandamida (AEA)

A anandamida (N-aracdonoil-etanolamida, AEA) é um composto de caráter lipofílico que deriva do ácido araquidônico (AA), e foi descoberto em 1992 presente no tecido cerebral de suíno, a AEA é o endocanabinóide mais estudado em todo o mundo por ser responsável pela modulação de diferentes processos fisiológicos como aprendizagem, memória, apetite, ansiedade, nocicepção e inflamação. As concentrações séricas variam nos fluidos biológicos e se alteram de acordo com a estimulação patológica, fisiológica e farmacológica sendo produzidos e liberados “sob demanda”, no LCR de pacientes saudáveis a concentração é de aproximadamente 0,83 ng.mL⁻¹ e no plasma a concentração é de 0,14 ng.mL⁻¹ (MARCHIONI, 2018; OLIVEIRA; MARCHIONI; QUEIROZ, 2019).

A síntese da anandamida inicia pelo seu precursor *N*-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), *n*-aciltransferase (NAT) e pela enzima *N*-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD). Após sintetizada, a AEA é liberada para o meio extracelular e possui afinidade

por diferentes alvos. Além de se ligar à receptores canabinóides pode se ligar a outros diferentes receptores como os receptores do tipo TRPV1, além disso a AEA por ser estruturalmente semelhante aos ácidos graxos poli-insaturados faz com que a torne-se um substrato para as vias lipoxigenases (LOXs) e ciclooxygenase 2 (COX-2) (FONSECA et al., 2013).

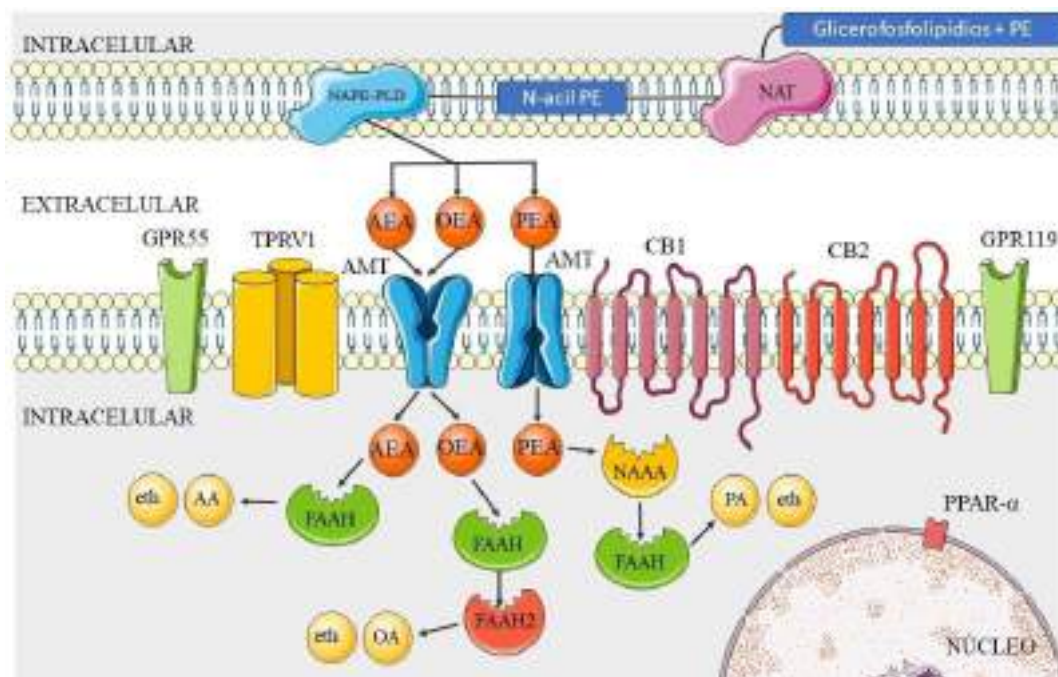
2-araquidonoilglicerol (2-AG)

Quando a anandamida e 2-araquidonoil glicerol são liberados eles passam pelo processo de recaptação neuronal e em seguida são metabolizadas em compostos inativos, a amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) é uma enzima pós-sináptica que hidrolisa a AEA enquanto o monoacil glicerol (MGL) é uma enzima pré-sináptica capaz de hidrolisa o 2-AG em ácido araquidônico e glicerol assim que ele finaliza sua atividade no receptor CB₁R (LESSA; CAVALCANTI; FIGUEIREDO, 2016).

Inicialmente descobriu-se que a função da lipase monoacilgliceróis (MAGL) era hidrolisar os monoglicerídeos (MAGs) presente em tecido adiposo e intestino de ratos em glicerol. Quarenta anos depois foi descoberto que a MAGL também era responsável por hidrolisar o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) em ácido araquidônico (AA) (DENG; LI, 2020).

Isso acontece porque MAGL é especificamente responsável por regular e controlar os níveis séricos do 2-AG através da degradação desse endocanabinóide. Com isso o MAGL é capaz de regular o sistema canabinóide, a atividade do MAGL torna essa enzima alvo para o desenvolvimento de novos compostos cujo objetivo é controlar sua atividade catalítica, uma vez que o 2-AG está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos (GIL-ORDÓÑEZ et al., 2018).

Figura 8 - Processo de biossíntese e degradação das três principais aciletanolamidas: Anandamida (AEA), oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA).



NAT: N-aciltransferase; NAPE-PLD: N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D seletiva; AMT: transportador de membrana de aciletanolamidas; FAAH: amida hidrolase de ácido graxo; NAAA: N-aciletanolamina ácido amidase; AA: ácido araquidônico; OA: ácido oleico; PA: ácido palmítico; eth: etanolamina; PPAR- α : receptor- α ativado por proliferador de peroxissoma; TRPV1: receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1; GPR55: receptor acoplado a proteína G 55 e GPR119: receptor acoplado a proteína G 119.

Fonte: Adaptado de (BORRELLI; IZZO, 2009).

3.2.3 N-aciletanolaminas não canabinoide (NAES)

NAEs são lipídios bioativos endógenos que possuem a cadeia acil ligada a etanolamina, mas que se diferenciam pelo grau de insaturação e pelo comprimento da cadeia acil. Apresentam inúmeras atividade biológicas e isso faz com que participem de diversos processo fisiopatológicos como inflamação e dor, como é o caso da *N-palmitoiletanolamina* (PEA), *N-oleoiletanolamina* (OEA), *N-araquidonoiletanolamina* (AEA), *N-estearoiletanolamina* (SEA) (ALHOUAYEK et al., 2017).

Também existem NAEs com cadeia acil derivada de ácido graxo ω -3 como o ácido eicosapentaenóico (20:5) ou ácido docosahexaenóico (22:6), o *N-docosahexaenoiletanolamina* (DHEA) sendo a última a mais estudada (ALHOUAYEK et al., 2017).

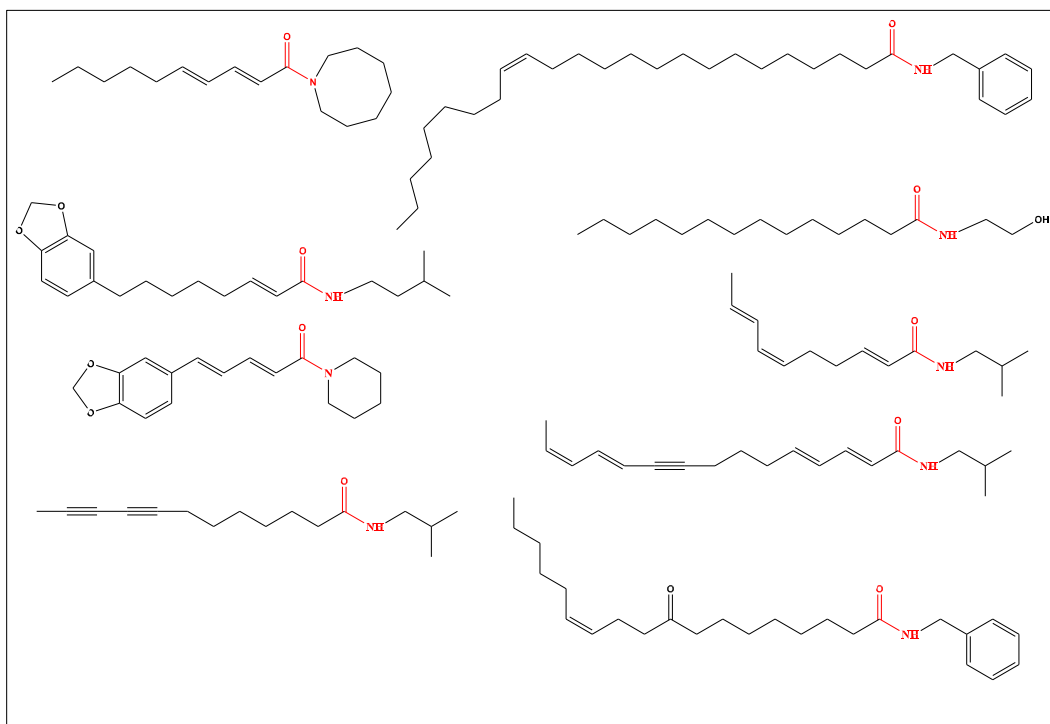
Vale destacar que estudos envolvendo as etanolamidas de ácidos graxos poliinsaturados com fonte de Ômega 3 demonstraram que estas estimulam a autofagia de células de CM

exercendo efeito antiproliferativo e atuando como ligantes naturais de PPAR γ que medeiam os efeitos das funções celulares (ROVITO et al., 2013).

Além disso, as etanolamidas de ácidos graxos monoinsaturados e saturados estão em maior concentração no organismo quando comparados com a anandamida. Outra característica importante dessas etanolamidas é o fato de não se ligarem aos receptores canabinóides, contudo para exercerem suas atividades ligam-se a diversos receptores como GPR55, PPAR α , GPR119 *in vitro* (TSUBOI et al., 2018).

Neste grupo encontram-se também os agentes farmacológicos sintéticos agonistas de receptor canabinóides, (RIBEIRO; NOCETTI; BAPTISTA, 2019) e a síntese desses canabinóides sintéticos pode ocorrer por diferentes metodologias que envolvem reações químicas e enzimáticas, o que resulta em uma vasta gama de produtos (Figura 9). Estruturalmente esses canabinóides diferenciam-se apenas pela presença das cadeias graxas e pela combinação do átomo de nitrogênio ligado a diferentes substituintes (LOPES, 2010).

Figura 9 - Estrutura molecular de diferentes FAA



Fonte: (GERTSCH, 2008)

Neste sentido esta pesquisa centrou-se na semi-síntese de amidas de ácidos graxos a partir do óleo da andiroba como alternativa para o tratamento do câncer de mama, uma vez que, o óleo da Andiroba é uma excelente fonte lipídica para a semi-síntese de novas amidas graxas

porque possui elevadas concentrações de ácido oleico/ômega 9 (C18:1) 51,81%, ácido palmítico (C16:0) 25,76%, linoleico/ômega 6 (C18:2) 8,3%, além de concentrações menores de ácido linolênico/ômega 3 (C18:3), ácido esteárico (C18:0) entre outros (SILVA, 2018).

A *Carapa guanensis* Aubl é o nome científico da andiroba, árvore encontrada predominantemente em áreas da floresta amazônica. O óleo extraído das suas nozes é conhecido como óleo de andiroba e, historicamente, é utilizado na medicina popular como anti-inflamatório, analgésico e remédio para câncer, além disso o óleo é rico em ácidos graxos, alcalóides e terpenóides, principalmente limonóides que são marcadores quimiotaxonômicos da família *Meliaceae* (AMBROZIN et al., 2006; SILVA et al., 2023a, 2023b).

Nessa perspectiva a importância da química verde corrobora e reforça essa busca por metodologias sintéticas sustentáveis e o anseio por produtos medicinais derivados de plantas aumentou consideravelmente no mundo (BARATA et al., 2020). Atualmente 60% dos países do mundo utilizam plantas como alternativas para tratar enfermidades e 85% dos países em desenvolvimento e subdesenvolvimento usam a medicina tradicional, principalmente em comunidades rurais (SHUAIB et al., 2023).

Pacheco et al. (2022) reforçam que o Brasil possui cinco regiões com imensa biodiversidade vegetal (sendo o Pantanal de Mato Grosso, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica), isso torna possível a descoberta de novos compostos bioativos dos quais ainda não se conhece os efeitos toxicológicos e farmacológicos.

Ensaios envolvendo a avaliação do potencial citotóxico, apoptótico e mutagênico do óleo da andiroba em linhagem de células de adenocarcinoma gástrico ACP02 com baixa taxa de resposta à quimioterapia ou radioquimioterapia, mostram significativa redução da viabilidade das células ACP02, com indução de morte celular por apoptose, sem exercer efeitos mutagênicos, corroborando com o potencial terapêutico da andiroba (PORFÍRIO-DIAS et al., 2020a).

Outro estudo, neste caso *in vivo*, envolvendo o pré-tratamento com óleo de andiroba puro mostrou eficácia na redução da severidade causada por dexorubicina (DOX) no organismo - DOX é um antibiótico antraciclina utilizado como agente antineoplásico na terapia de vários tipos de cânceres, como o de mama – além disso os achados do estudo revelaram também que em sistema de nanopartículas há melhora na farmacocinética e na eficácia do óleo, atuando como um complemento aos benefícios gerais do óleo não processado, além de potencializar os efeitos biológicos da andiroba em muitos aspectos (MELO et al., 2021).

3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS DE FÁRMACOS A BASE DE LIPÍDEOS E SEU PAPEL NO CÂNCER

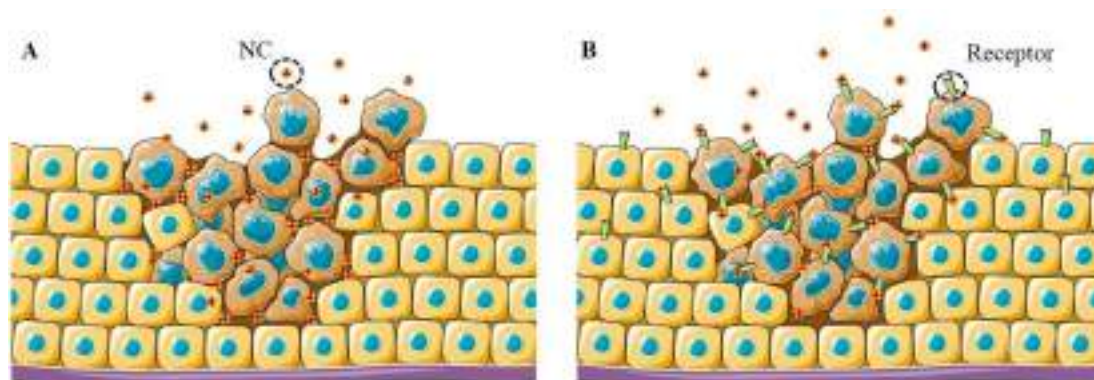
As drogas quimioterápicas empregadas em terapias tumorais são responsáveis por uma vasta lista de efeitos adversos, esta inclui toxicidade renal, hepática, medular, gastrointestinal, pulmonar e cardíaca, isso é resultado da baixa especificidade do fármaco, indução de resistência aos medicamentos e elevada toxicidade, por esta razão, a nanomedicina surge como um sistema eficaz anticâncer nos tumores, uma vez que explora a fisiopatologia do microambiente tumoral, o que gera resultados terapêuticos mais satisfatórios que as terapias oncológicas convencionais (DIN et al., 2017).

Neste prisma, a nanotecnologia ganhou significância e interesse no setor farmacêutico a partir da perspectiva da criação de “*Drug Delivery Systems*” em escalas nanométricas, cuja finalidade promete melhorar a distribuição de fármacos e/ou potencializar seus efeitos, aumentar a seletividade e reduzir a toxicidade, facilitar a absorção dos compostos e prevenir resistências aos fármacos. Neste contexto, a nanofarmacologia tem aplicação promissora na nanomedicina voltada ao câncer, indo além das terapias convencionais (PEREIRA et al., 2022).

Desta forma, a tecnologia dos nanocarreadores (NC) foi projetado para criar moléculas extremamente pequenas (tipicamente menores que 500 nm) e desenvolvidas para apresentarem propriedades físico-químicas únicas que podem ser exploradas de diversas formas no tratamento oncológico, esta tecnologia possibilita a otimização na liberação de fármacos, apoiando assim o diagnóstico e terapia do câncer. (NEUBERT, 2011).

Isso acontece devido a estrutura e tamanho dos NC que podem carregar uma grande quantidade de fármacos e reduzir as doses administradas durante o tratamento, outro ponto é a versatilidade química das superfícies dos nanosistemas podendo ser vetorizados/direcionados para atuarem seletivamente reconhecendo as células de câncer (Figura 10). Ademais, como exemplo os NC podem ser configurados para superar e impedir a repulsão aos fármacos que carregam, enquanto, as plataformas multifuncionais podem ser projetadas para atuarem simultaneamente (teranóstica) no diagnóstico e terapia do processo tumoral (ROJAS-AGUIRRE; AGUADO-CASTREJÓN; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, 2016).

Figura 10 - Representação da acumulação de um nanocarreador por direcionamento passivo (A) e ativo (B) em tecido tumoral



Fonte: Adaptado de (RANSON et al., 2001)

A acumulação por direcionamento passivo é caracterizada pelo acúmulo de nanopartículas nos tumores em decorrência da fisiologia anormal dos neovasos presente nos tumores sólidos com fenestrações que variam de 100 a 780 nm, ou seja, bem maiores que o endotélio vascular normal (5 a 10 nm). Assim, NC com tamanho médio de até 200 nm conseguem aprisionar-se nestas fenestrações e liberar o fármaco antineoplásico, o que melhora a terapia através do efeito de permeabilidade e retenção aprimorado (EPR), como os carregados com Doxorrubicina e análogo da Capecitabina estudados na terapia do câncer de mama (OLIVEIRA et al., 2012; TENCHOV et al., 2021).

Já o direcionamento ativo dá-se com o uso de ligantes nas superfícies das nanopartículas, com isso tem-se a capacidade de interação com células específicas como as tumorais. Alguns nanossistemas lipossomais carregados com medicamentos como Paclitaxel, Doxorrubicina, Rituximab são acumulados de forma ativa, mas em alguns casos por direcionamento passivo (OLIVEIRA et al., 2012).

Nos NC do tipo lipossomos (LPS) são utilizados os mecanismos de direcionamento passivo e/ou ativo e são empregados como sistema de distribuição de medicamentos citotóxicos baseado em três parâmetros farmacológicos, sendo eles: em primeiro lugar os lipossomos liberam o medicamento de forma lenta, em segundo lugar alteram a biodistribuição do fármaco encapsulado e em terceiro lugar, podem atuar para elevar a concentração de fármacos nos tumores. Contudo, as desvantagens podem incluir atraso da biodisponibilidade do medicamento o que pode limitar a rápida obtenção de níveis elevados dos mesmos (RANSON et al., 2001).

Os lipossomos são estruturas vesiculares com diâmetro de 5,0 nm e que possuem o interior aquoso, são revestidos por uma camada lipídica constituída por colesterol e

fosfolipídios, a camada pode ser do tipo multilamelar ou unilamelar, dependendo da composição do LPS a carga superficial podem varia, sendo positiva, negativa ou neutro; os LPS podem encapsular compostos anfifílicos, hidrofóbicos e hidrofílicos o que lhes garante uma ampla aplicação como nanoentregadores de medicamentos neoplásicos (MELO et al., 2020; SANDOVAL-YAÑEZ; CASTRO RODRIGUEZ, 2020), podem ser vistos na tabela 4 alguns medicamentos que utilizam nanosistemas de distribuição de fármacos.

Tabela 4 - Medicamentos comercialmente disponíveis que utilizam nanosistemas de distribuição de fármacos

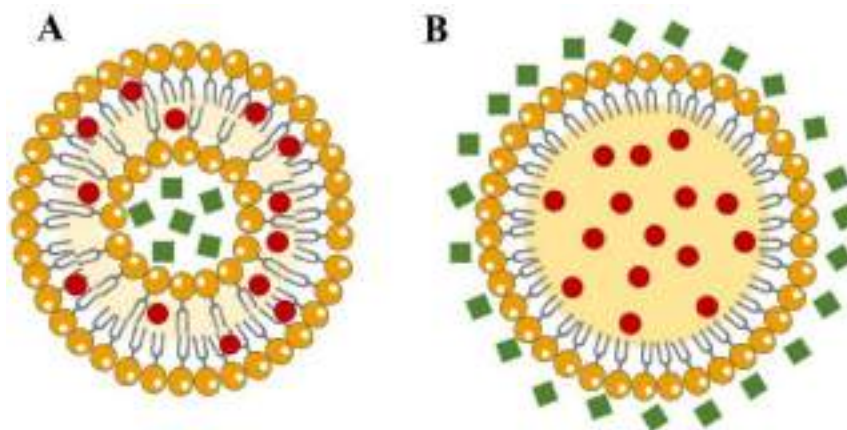
Medicamento	Composição	Indicação
Doxil/Caelyx	Doxorrubicina lipossomal PEGuilada	Mieloma, sarcoma de Kaposi, câncer de mama e de ovário
DaunoXome	daunorrubicina lipossomal	Sarcoma de Kaposi
Myocet	doxorrubicina lipossomal	Câncer de mama
Abraxane	paclitaxel ligado à albumina	Câncer de mama, pulmão de células não pequenas e pâncreas
Lipusu	paclitaxel lipossomal	Câncer de mama e de pulmão de células não pequenas
Oncaspar	Conjugado de L-asparaginase	Leucemia linfoblástica aguda
DepoCyt	citarabina lipossomal	Linfoma, Leucemia
Genexol-PM	paclitaxel micelar	Câncer de mama, pulmão de células não pequenas, ovário e gástrico
Mepact	mifamurtida lipossomal	Sarcoma osteogênico
NanoTherm	Nanopartículas de óxido de ferro	Tumores cerebrais
Marqibo	Sulfato de vincristina lipossomal	Leucemia linfoblástica aguda
Myocet	doxorrubicina encapsulada em lipossomas	câncer de mama metastático
ONIVYDE	irinotecano lipossomal	Câncer de pâncreas avançado
DHP107	nanopartículas lipídicas de paclitaxel (administração oral)	Câncer de intestino
Vyxeos	daunorrubicina lipossomal e citarabina	Leucemia mieloide aguda de alto risco
Apelo	paclitaxel micelar	Câncer de ovário, peritoneal e trompas de falópio
Hensificar	nanopartículas de óxido de háfnio	Sarcoma de partes moles localmente avançado

Fonte: (BARENHOLZ, 2012; BATIST et al., 2002; O'BRIEN et al., 2004; SALVIONI et al., 2019; SCHILLER et al., 2015; ZHANG et al., 2022)

Somada aos lipossomos (Figura 11A) a nanomedicina utiliza-se também das nanopartículas lipídicas (Figura 11B), que podem ser classificadas em primeira geração sendo representada pelas Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e de segunda geração cujos

representantes são os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018; PARDEIKE et al., 2011).

Figura 11 - Representação dos nanosistemas entregadores de fármacos neoplásicos



Nota: (A) Lipossomo encapsulando fármaco antineoplásico hidrofílico (quadrados verdes) e lipofílico (esferas vermelhas) na matriz lipídica dos fosfolípidios) e (B) nanopartícula lipídica adsorvendo em sua superfície antineoplásico hidrofílico (quadrados verdes) e encapsulando fármaco antineoplásico lipofílico (esferas vermelhas).

Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2012).

As nanopartículas lipídicas não são tão eficazes no encapsulamento de elevadas concentrações de fármacos hidrofílicos, contudo são vantajosas quando se trata de liberação sustentada para o receptor e tempo de meia vida, são mais estáveis, com boa tolerabilidade e fáceis de serem produzidas em escala industrial, além disso são nanoentregadores capazes de atravessar a barreira hematoencefálica sem causar dano (BEZERRA et al., 2022).

Na primeira geração, as NLS são nanoesferas de sistemas de liberação de fármacos compostos e tem a matriz constituída por lipídeos sólidos em temperatura ambiente como ácidos graxos, triglicerídeos, esteróis, glicídios parciais e ceras; as principais vantagens incluem a não utilização de solventes orgânicos e atoxicidade dos componentes, estabilidade dos fármacos carregados, liberação controlada e direcionada aos alvos específicos (COLA et al., 2016).

Já na segunda geração, os CLN surgem como uma modificação das NPS, cujo objetivo é melhorar o tempo de retenção do fármaco durante o armazenamento e melhorar a eficiência do encapsulamento, neste caso há a presença de lipídios sólidos e líquidos à temperatura ambiente, isso acontece porque a incorporação do lipídio líquido na matriz sólida eleva o número de imperfeições na matriz sólida que faz com que o fármaco fique aprisionado em maior

quantidade e não seja expulso facilmente da matriz como ocorre com a NPS (APOLINÁRIO et al., 2020).

A Tabela 5 exemplifica uma série de aplicações *in vitro* em linhagens variadas de células tumorais envolvendo a primeira e segunda geração de nanopartículas lipídicas carregados com o fármaco antitumoral Paclitaxel (PTX), na atividade citotóxica é possível comparar a superioridade em relação a efetividade das nanopartículas (NLS-PTX e CLN-PTX) contra o PTX livre.

Tabela 5 - Primeira e segunda geração de nanopartículas lipídicas contendo paclitaxel e sua atividade citotóxica em linhagens celulares de cânceres

Matriz lipídica	Concentração de PTX	Teor de encapsulamento (%)	Atividade Citotóxica
1ª GERAÇÃO: NLS			
Tripalmitina Hemissuccinato de colestera Epikuron 200® Taurocolato de sódio Butanol	1,17 nm	-	HT-29 24h – IC ₅₀ 81,46 ± 0,26 mM 48 h – IC ₅₀ 47,16 ± 1,87 mM 72 h – IC ₅₀ 37,36 ± 6,41 mM 24 h > 48 h > 72 h
Trimiristina Fosfatidilcolina de ovo	6 mg/mL	25	OVCAR-3 e MCF-7 NLS-PTX ≈ PTX livre.
Compritol® ATO 888 Poloxamer 188	1 mg/mL	77,4 ± 1,05	A549 NLS-PTX > PTX livre (IC ₅₀ 1,45 ± 0,12 µg/mL vs. 2,36 ± 0,13 µg/mL)
Lecitina Poloxamer 188 Ácido esteárico	0,05 mmol 0,25 mmol	72,18 ± 3,7 89,0 ± 2,4	HepG2 NLS-PTX > PTX livre.
Precirol® ATO5 Polissorbato 80	82,5 – 125 µg/mL	Todos acima de 97	MXT-B2 NLS-PTX > PTX livre (IC ₅₀ 1,69 µM vs 39,70 µM)
Trilaurina Fosfatidilcolina de ovo	6 mg/mL	5,1 ± 0,6 mg/mL	SKOV-3 NLS-PTX ≈ PTX livre (IC ₅₀ 2,4 ± 1,9 mM vs 3,7 ± 5,1 mM)
Tristearina Estearilamina	0,1 p/v%	84 ± 1,4	A549 NLS-PTX > PTX livre (Inibição de 54,4% vs 42,8%)
2ª GERAÇÃO: CLN			
Monoestearato de glicerol Ácido oléico Poloxamer 188	0,5 mg/mL	68, 7 ± 4,5	CLN-PTX > PTX livre MCF-7 IC ₅₀ 0,075 ± 0,010 µg/mL SKOV3 IC ₅₀ 0,053 ± 0,006 µg/mL.
Monoestearato de glicerol	0,1 mg/mL	90, 1 ± 0,7	B16, CT26 e HCT116

Óleo de soja Lecitina de soja Brometo de cetiltrimetilamônio			CLN-PTX > PTX livre Após 24 horas de tratamento
Monoestearato de glicerol Poloxamer 188 Polissorbato 80 Ácido oléico Capryol™ 90	0,58 mM	89,1 ± 1,5	MCF-7 CLN-PTX > PTX livre (IC ₅₀ 3,53 ± 0,11 µg/ml)
Compritol® 888 ATO TCM Colesterol	0,1 mg/mL	90	CLN-PTX > PTX livre MCF-7 IC ₅₀ 25,33 ± 3,17 nM MDA-MB-231 IC ₅₀ 2,13 ± 0,21 nM PTX livre (IC ₅₀ > 500 nM)

Nota: * Epikuron 200 (fosfatidilcolina de soja 95%); Precirol® ATO5 (palmitoestearato de glicerila); TCM (triglicerídeos de cadeia média); Poloxamer 188 (co-polímero de polioxipropileno e polioxietileno); Capryol™ 90 (monocaprilato de propilenoglicol). ** HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano); OVCAR-3 e SKOV3 (adenocarcinoma de ovário humano); MCF7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano); A549 (adenocarcinoma pulmonar humano); HEPG2 (carcinoma hepatocelular humano); HT1080 (fibrosarcoma humano); HCT116 (câncer colorretal humano); CT26 (carcinoma de cólon murino); MXT-B2 (câncer de mama murino); B16 (melanoma murino).

Fonte: (PEDRO, 2018)

4.1 Reagentes

Os materiais utilizados neste ensaio, foram a Isobutilamina (99,5%), *Amano lipase from pseudomonas fluorescens* (LPF) (20.000 U g⁻¹, CAS No. 9001 – 62-1), hexano (98%), foram adquiridas pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil), etanol (99%) foi comprado da Solven (São Paulo, Brasil); clorofórmio deuterado (CDCl₃) foi cedido pelo Laboratório de Isótopo de Cambridge. O óleo de andiroba foi comprado da AmazonOil The Rainforest Company, (Pará, Brasil). Soro fetal bovino (SFB), meios de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), e *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), gentamicina, penicilina e estreptomicina comprados da *Invitrogen* (São Paulo, Brasil).

4.2 Obtenção dos compostos

4.2.1 Semi-síntese das amidas de ácidos graxos

Realizou-se uma reação de amidação direta entre o óleo de andiroba (1,0 mL) e etanolamina (3,0 mL), com 10 % da LPF, empregada como catalisador. A reação permaneceu sob agitação magnética (300 rpm, 40 ± 2 °C) por período de 24h. Ao final do período, filtrou-se a enzima e a mistura foi lavada com acetato de etila (3x1,0 mL). Sob pressão reduzida o filtrado foi evaporado, a purificação das FAA ocorreu diretamente por cromatografia em coluna de sílica de gel utilizando como diluente n-hexano:acetato de etila (8:2). O produto da reação foi posteriormente caracterizado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Ressonância Magnética Nuclear ¹H e ¹³C.

4.2.2 Degomação da Fibroína da Seda

A degomagem dos casulos do bicho-da-seda ocorreu a partir de 3,0 g do casulo picotado, transferido para uma solução em fervura de Na₂CO₃ (2%, p/v), por 30 minutos em agitação magnética., após esse período foram filtradas as fibras resultantes e lavadas com água destilada (3x500 mL). Em seguida as fibroína foi solubilizada em uma solução ternária (50mL) de H₂O:EtOH:CaCl₂ nas proporções molares (8:2:1) a 40°C, até completa dissolução da fibra. A mistura passou por diálise em tubo de celulose com limite de exclusão de 16kDa (Viskase, Brasil) durante 72h à temperatura ambiente, com troca de água a cada intervalo de 24h, pôr fim a solução de FS foi centrifugada (6000 rpm por 10 min.) para remover partículas maiores e impurezas, a concentração da solução final da FS foi ajustada para 2.

4.2.3 Preparo do Carreador Lipídico Nanoestruturado

Através de homogeneização em agitação por aquecimento foram preparadas duas formulações de nanocarreadores, uma contendo amidas de ácidos graxos com fibroína da seda (CLN-FAA/FS) e outra branca (CLNb) amidas de ácidos graxos com fibroína da seda, para isso foi utilizado chapa aquecedora (SL-140/R), a formulação está representada na Tabela 6. As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente, mas ambas a 65°C, a fase aquosa foi aquecida em banho-maria enquanto a fase oleosa foi aquecida na chapa aquecedora, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa, em seguida a formulação permaneceu por agitação e aquecimento por 45 min., por fim e sem aquecimento a formulação permaneceu em agitação por 24 h, no CLNb não foi adicionado FAA (SAFWAT et al., 2017).

Tabela 6 - Formulação dos sistemas nanoestruturados

<i>Formulação do CLN-FAA/FS</i>			
Aditivo	Quantidades (g)	Porcentagem (%)	Fase
Água destilada	4,835	96,5	Aquosa
Solução de fibroína (2%)	0,04	1	Aquosa
Tween 80	0,05	1	Aquosa
FAA	0,05	1	Oleosa
Ácido Mirístico	0,025	0,5	Oleosa
Total q.s.p.	5	100	O/A
<i>Formulação do CLNb</i>			
Aditivo	Quantidades (g)	Porcentagem (%)	Fase
Água destilada	4,885	97,5	Aquosa
Solução de fibroína (2%)	0,04	1	Aquosa
Tween 80	0,05	1	Aquosa
Ácido Mirístico	0,025	0,5	Oleosa
Total q.s.p.	5	100	O/A

4.3 Ensaios para caracterização espectroscópica

4.3.1 Cromatografia em Fase Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS)

As análises cromatográficas das FAA, a partir do óleo de andiroba, foram realizadas em um cromatógrafo de gás (GCMS-QP 2010) equipado com um auto-amostrador de injeção AOC-20i (Shimadzu). Detecção de impacto eletrônico usando como detector (Shimadzu MS2010 Plus), impacto eletrônico de 70 eV e detectados fragmentos de 50 a 550 Da. A

separação foi realizada numa coluna capilar de sílica fundida (RTX-5MS com $d_i = 0,25$ mm, comprimento = 30 m e espessura do filme = 0,25) num fluxo de hélio $1,03 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. A amostra foi solubilizada em diclorometano ($2 \text{ } \mu\text{g/ml}$) e foi submetida as seguintes condições experimentais: temperatura do injetor 210°C ; temperatura do detector, 250°C ; gás portador, hélio; caudal $3,0 \text{ ml/min}$; injeção dividida com relação de divisão 1/15. A temperatura da coluna foi programada a partir de 90°C , com um aumento de 6°C/min a 250°C , terminando com 5 min isotérmicos a esta temperatura, o tempo total de análise foi de aproximadamente 33,67 min..

4.3.2 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram registrados em amostras de espectrômetros Shimadzu IRAffinity (OA e FAA) e foram preparados como filmes finos em discos KBr. A transmitância foi expressa em cm^{-1} de banda entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C (OA e FAA) foram registados em um espectrômetro Agilent Technologies 500/54 Premium Shielded. Cada amostras foi solubilizada em $600 \mu\text{L}$ de CDCl_3 e os deslocamentos químicos expressos em ppm em relação ao padrão interno TMS ou solventes deuterados.

4.4.1 Estabilidade físico-química

Para determinar as características físico-química, foi avaliado o TM e PdI utilizando-se a técnica de espalhamento da luz (DLS do inglês *Dynamic Light Scattering*), o ângulo de incidência do laser de 90° e temperatura ambiente de 25°C , para a obtenção do PZ também foi utilizada a mesma técnica de DLS e condições como ângulo de incidência de 90° e temperatura 25°C , mas associada à mobilidade eletroforética.

As medidas de TM, PdI e PZ foram obtidas utilizando-se o equipamento Zetasizer NanoZS90 (*Malvern Instruments*, Inglaterra), as amostras foram diluídas 100 vezes em água MilliQ® (MIRANDA et al., 2021).

4.4.2 Estabilidade coloidal frente aos meios biológicos

Investigou-se a estabilidade do CLNb e CLN-FAA/FS frente a distintos fluidos biológicos com o intuito de prever o comportamento no sistema *in vivo*. Para isso o CLN-FAA/FS foi diluído 4 vezes em NaCl ($0,9\% \text{ p/v}$), tampão PBS (pH 7,4), plasma murino ou Soro

Fetal Bovino (SFB), Dulbecco modified Eagle Medium (DMEM). Após as diluições as soluções foram mantidas a 37°C por 144 minutos, sob agitação de 150 RPM, as alíquotas foram coletadas em tempos pré-determinados (MALCOLM et al., 2018).

4.4.3 Cultivo das linhagens celulares

As culturas das células foram mantidas em garrafas T-75, em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37°C, a linhagem tumoral de câncer de mama murino 4T1 foi mantida em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e os fibroblastos foram mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino.

4.4.4 Avaliação da Viabilidade das linhagens Celulares

A avaliação do efeito proliferativo foi feita pelo ensaio colorimétrico Sulforodamina B, baseado na medida do conteúdo de proteína nas células (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). A avaliação foi realizada entre os compostos CLN-FAA/FS, CLN Branco, óleo da andiroba e fibroína diluídas em 5mg.mL⁻¹ de DMSO e testadas em concentrações distintas. Para isso as células de câncer de mama (4T1) e fibroblastos saudáveis humanos, foram semeadas em cada cavidade de uma placa de 96 poços em meio de cultura DMEM e incubadas a 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas, depois desse período foram adicionadas nas cavidades da placa as substâncias de interesse em várias concentrações além dos grupos controles preparados em meio de cultura.

Em seguida a placa foi novamente incubada durante 48 horas a temperatura de 37°C e 5% CO₂, após esse período sem remover o sobrenadante, foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v) em cada poço e as placas foram novamente incubadas a 4°C durante 60 minutos para a fixação das células, em seguida, as placas foram lavadas cuidadosamente com água destilada por quatro vezes consecutivas, após isso foram secadas completamente à temperatura ambiente, 100,0 µL de solução de Sulforodamina B a 0,057% (p/v) foram adicionados em cada cavidade e as placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Em seguida as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com ácido acético 1% (v/v) e novamente mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 100 µL de solução Tris Base a 10 mM e pH 10,5.

Foi realizada leitura da absorbância em um leitor de microplacas (Versamax Genius®, MA-EUA) a 510 nm e a porcentagem da inibição do crescimento celular foi calculada em relação à absorção das células mantidas somente em meio de cultura (sem nenhum tratamento).

Os dados foram expressos como a porcentagem de proliferação celular para três experimentos independentes em triplicata, sendo representados como média $\pm$ desvio padrão. Em seguida, determinou-se a concentração das substâncias (diferentes tratamentos) necessárias para promover 50% de inibição da viabilidade celular (IC_{50}).

5.1 Avaliação da semi-síntese e das caracterizações espectroscópicas

A reação de amidação direta segue os princípios de uma reação de transesterificação, ocorrendo em três etapas consecutivas, formando amidas graxas e o glicerol como subproduto (ARAÚJO et al., 2018). O sucesso da reação é dependente das condições reacionais (temperatura, catalisador, tempo e proporção molar e a espécie nucleofílica (KUMAR; ALI, 2015). A isobutilamina, como amina primária apresenta boa reatividade no processo de transamidação direta. Por isso, relaciona-se que a proporção da cadeia graxa (saturados/insaturados) presente no respectivo óleo de andiroba, não é alterada após a reação de transamidação. Com objetivo de avaliar o potencial de toxicidade das amidas graxas em células de 4T1, estimulamos uma melhor compreensão da influência da cadeia graxa (insaturadas/saturadas) obtidas a partir do processo de amidação direta, neste caso tendo como fonte da cadeia alquílica, os ácidos graxos presentes no óleo de andiroba. Há de considerar que este processo de obtenção de amidas graxas, via método semi-sintético, é considerado o mais viável para obtenção do conjunto de amidas graxas, desta forma podendo desonerar o custo de produção e o torna atrativo para maiores escalas de produção (CITOLER et al., 2022; JAMIL et al., 2019).

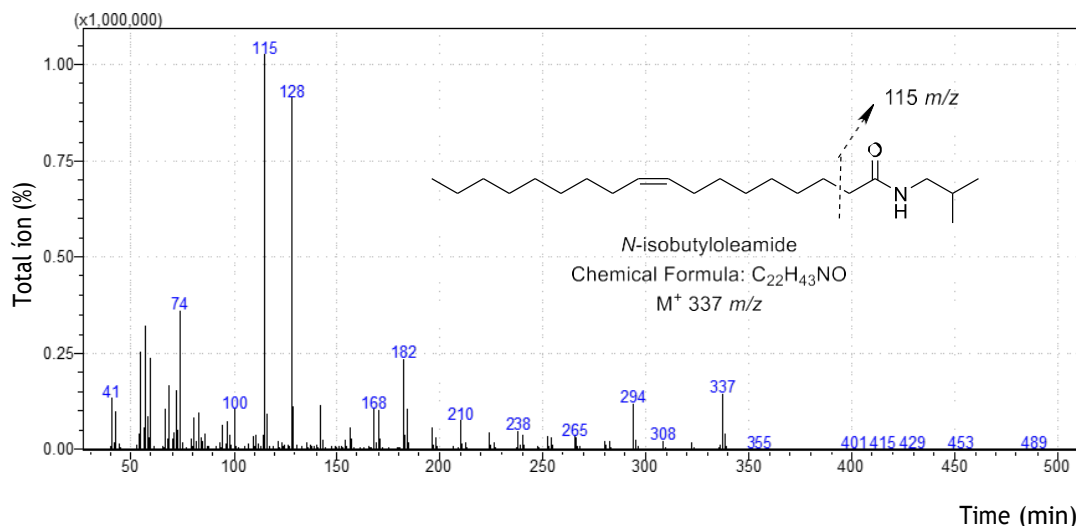
A importância de avaliar o comportamento de substâncias isoladas, é imprescindível, em sistemas biológicos, no entanto, ressalta-se que este trabalho amplia perspectivas de *screen* no estudo de toxicidade celular de 4T1 amidas graxas.

Após reação e purificação, os triglicerídeos presentes no óleo de andiroba foram convertidos nas respectivas FAA. As principais FAA identificadas foram *N*-isobutilpalmitamida (40%) e *N*-isobutilestearamida (4%), amidas de cadeias saturadas, e *N*-isobutiloleamida (44%) e (9Z,12Z)-*N*-isobutiloctadeca-9,12-dienamida (2%), derivada do ácido linoleico, como amidas de cadeias insaturadas. A percentagem relativa de FAA foi calculada a partir da área integradora dos picos correspondente e identificada utilizando uma base de dados MS (NIST 5.0) e literatura (OLIVEIRA et al., 2020).

O perfil de fragmentação, das isobutilamidas graxas foram identificadas por espectrometria de massa (MS) por impacto de elétrons (70 eV) e apresentaram como principal característica o pico base a fragmentação de 115 m/z, resultante do rearranjo de McLafferty,

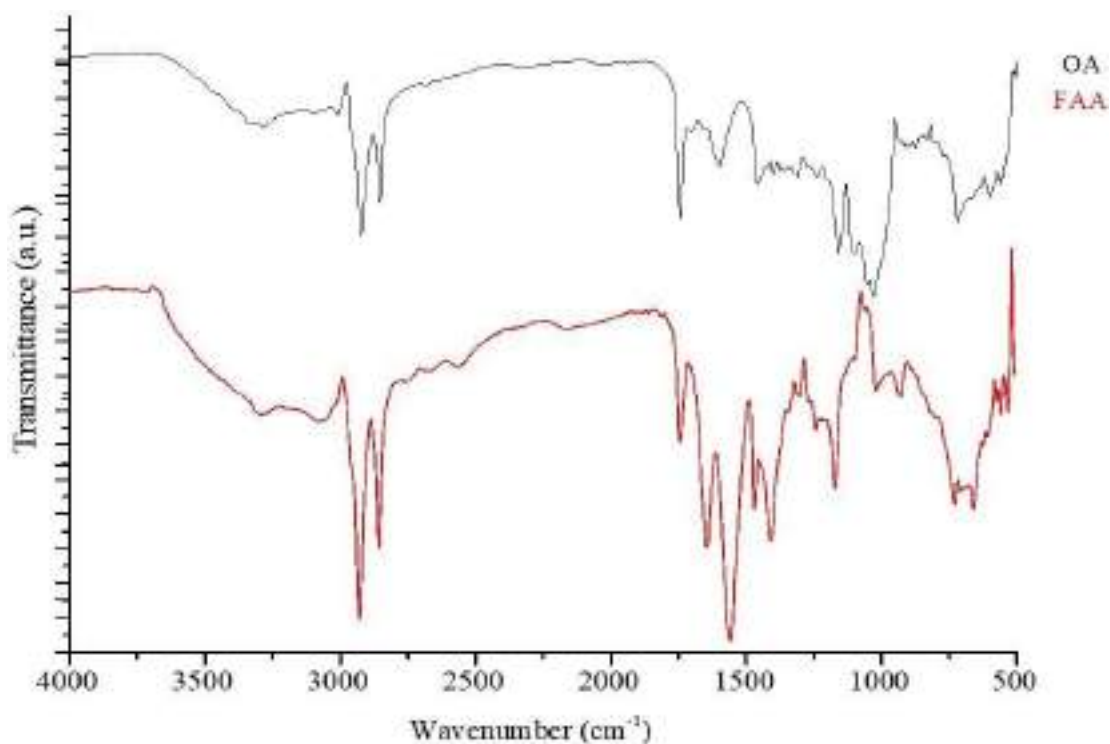
como pode ser observado no espectro de fragmentação da N-isobutiloleamida, que apresentou o íon molecular de 337 m/z e pico base de 115 m/z (Figura 12).

Figura 12 - Espectro de massa (70 eV) da N-isobutiloleamida



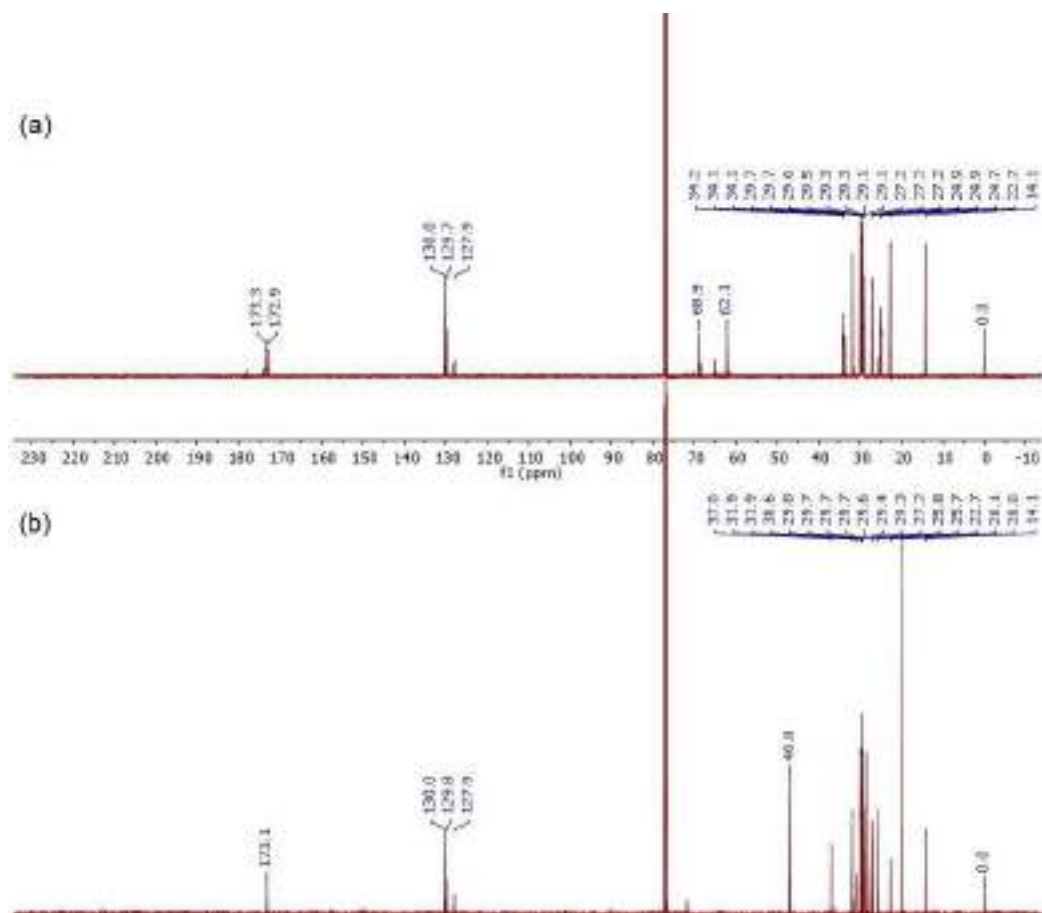
Os espectros correspondentes das análises no infravermelho são mostrados na Figura 13. Tais espectros apresentam alta similaridade, pois são as cadeias alquílicas saturadas e insaturadas derivadas dos triglicerídeos AO. O pico em 3005 cm^{-1} corresponde ao estiramento do $-C-H$ (sp^2) e 2924 e 2854 cm^{-1} ao estiramento da ligação $-C-H$ (sp^3), outro pico característico dos compostos derivados dos triglicerídeos apareceu em 1745 cm^{-1} , relacionado ao estiramento da ligação $-C=O$ do AO, e para o FAA. Os sinais do composto amidado são listados como os picos em 3385 e 3304 cm^{-1} que correspondem ao trecho $-NH_2$ e o pico em 1647 e 1658 cm^{-1} correspondem ao dobramento da ligação $-N-H$, características da amida gordurosa sintetizada. No passado, o pico para a banda dupla em 3385 cm^{-1} refere-se ao agrupamento $-NH$ livre em amidas e o pico 1558 cm^{-1} referindo-se a $-NH_2$ correspondente à deformação angular simétrica no plano, confirmando o resultado do composto.

Figura 13 - Espectro infravermelho de OA (preto) e FAA (vermelho)



O OA e FAA apresentaram sinais de RMN de ^{13}C muito semelhantes (Figura 14), devido à não alteração da cadeia alquila presente no material de partida (OA) e sua manutenção nos produtos obtidos. A maior diferença do espectro de RMN de ^{13}C é observada em 62,1 e 68,9 ppm, característica dos carbonos do glicerol, presentes no OA. Entretanto, o espectro de RMN de ^{13}C da mistura de FAA apresentou, como característica principal, o carbono da ligação -N-CH₂ sinalizando 46,8, e a ausência de sinais de glicerol também indicou a formação de uma nova substância a partir do OA.

Figura 14 - Espectro de RMN de ^{13}C de OA (a) e FAA (b)

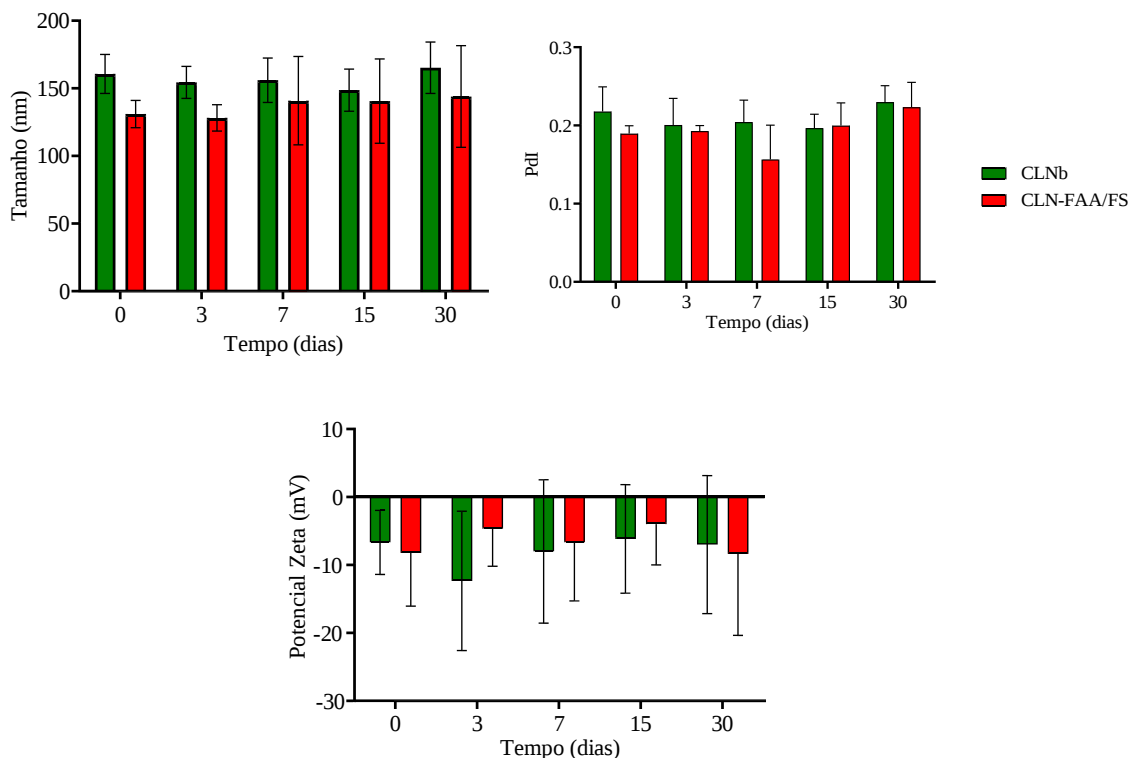


5.2 Caracterização e avaliação da estabilidade físico-química do CLNb e CLN-FAA/FS

O perfil de estabilidade físico-química das amostras de CLNb e CLN-FAA/FS foram avaliadas nos dias 0, 3, 7, 15 e 30 após o preparo e durante esse período não houve variação significativa (Figura 15) do tamanho médio de partícula, PDI e potencial zeta.

Os resultados encontrados para o CLNb foram o tamanho médio de partícula de $157,2 \pm 14,4$ nm, PZ de $-8,03 \pm 7,95$ mV e PDI de $0,20 \pm 0,04$, para o CLN-FAA/FS o tamanho médio de partícula foi de $136,9 \pm 23,6$ nm, o PZ de $-6,37 \pm 7,27$ mV e PDI de $0,19 \pm 0,04$.

Figura 15 - Representação gráfica da estabilidade físico-química em relação ao tamanho, polidispersão e potencial zeta do CLN na presença e ausência de FAA e FS para os tempos 0, 3, 7, 15 e 30 dias



Os resultados da avaliação físico-química das formulações propostas de CLN com e sem FAA/FS, demonstraram que ambas formulações apresentam baixos valores de índice de polidispersão ($\leq 0,3$) e baixo tamanho médio de partículas, o que indica que as formulações apresentam distribuição monodispersa (RIBEIRO et al., 2021).

Vale salientar que para uma possível administração endovenosa é preferível sistemas com tamanho médio variando na faixa de 50 a 200 nm, uma vez que a biodistribuição é fortemente influenciada pelo tamanho das partículas (DANAEI et al., 2018), de modo que partículas menores que 10 nm podem ser rapidamente eliminadas e sujeitas a filtração glomerular, enquanto que partículas maiores que 300 nm são passíveis de serem identificadas pelo sistema fagocitário mononuclear, que as opsonizam e as retira de circulação (LE MOS, 2021). Neste contexto o tamanho médio de partículas quando maiores que 200 nm devem ser evitadas porque tem efeito significativo no tempo de circulação, isso ocorre em virtude da dimensão capilar do sistema circulatório (CHENTHAMARA et al., 2019).

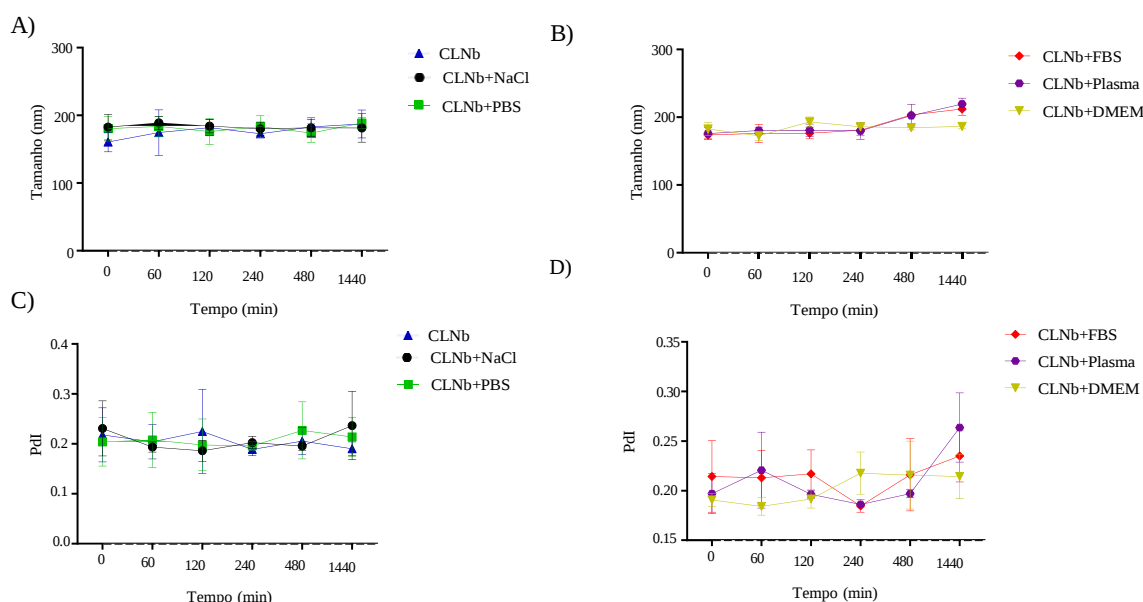
Além disto, vale destacar que os valores obtidos do PZ em todos os testes se mantiveram inferiores a -20 mv, o que indica estabilidade na dispersão, ou seja, o potencial zeta avalia a repulsão eletrostática das partículas igualmente carregadas (QU et al., 2022). As cadeias

orgânicas longas como no caso das FAA presentes na formulação podem criar um impedimento estérico que evita a interação entre as nanopartículas (MELO JR. et al., 2012), neste caso, o nanossistema ficar com carga negativa quando as cadeias orgânicas são revestidas com surfactante não iônico como o Tween 80 utilizado na formulação devido ácidos graxos livres do surfactante, além disso durante o processo de obtenção da formulação as hidroxilas aniônicas da água da fase aquosa podem aprisionar-se na superfície da fase oleosa (LI et al., 2012; MIRANDA et al., 2021; SAMIRA J. FAYAD, 2009).

5.3 Avaliação da estabilidade coloidal frente aos meios biológicos

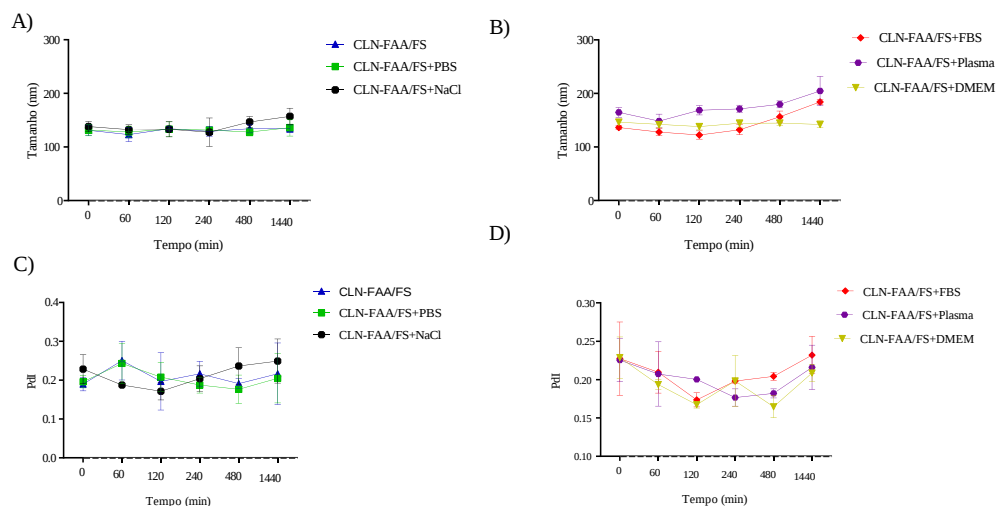
A estabilidade coloidal é um importante parâmetro a ser avaliado em relação a uma possível administração *in vivo* visto a necessidade de se buscar novas alternativas farmacológicas, para isso o CLNb e CLN-FAA/FS foram expostos aos seguintes meios: tampão fosfato (PBS), solução salina de NaCl 0,9%, soro fetal bovino (SFB), plasma murino e meio de cultura (DMEM), no período de 1440 minutos.

Figura 16 - Distribuição de tamanho e polidispersão do CLNb na ausência de FAA e SF para os tempos 0, 60, 120, 240, 480 e 1440 minutos, em diferentes meios biológicos



A distribuição média do tamanho e do PDI do CLNb sem FAA e FS em função do tempo foram obtidas em triplicatas (n=3), utilizando-se o teste ANOVA para analisar as variações significativas, considerando significância de $p < 0,05$.

Figura 17 - Distribuição de tamanho e polidispersão do CLN-FAA/FS para os tempos 0, 60, 120, 240, 480 e 1440 minutos, em diferentes meios biológicos



A distribuição média do tamanho e do PDI do CLN-FAA/FS em função do tempo foi obtida em triplicatas (n=3), utilizando-se o teste ANOVA para analisar as variações significativas, considerando significância de $p < 0,05$.

Os resultados obtidos em relação ao tamanho das partículas e PDI no período de 1440 minutos para o CLNb e CLN-FAA/FS podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7 - Tamanho médio e PDI de CLNb e CLN-FAA/FS

Carreador lipídico nanoestruturado	Tamanho (nm)	PDI
CLN-FAA/FS	130,90 ± 08,61	0,21 ± 0,04
CLN-FAA/FS+NaCl	139,20 ± 16,51	0,21 ± 0,04
CLN-FAA/FS+PBS	131,40 ± 09,77	0,20 ± 0,04
CLN-FAA/FS+DEMDEM	142,90 ± 08,86	0,19 ± 0,03
CLN-FAA/FS+Plasma	172,80 ± 26,71	0,20 ± 0,03
CLN-FAA/FS+FBS	141,30 ± 24,42	0,20 ± 0,04
CLNb	176,70 ± 18,07	0,20 ± 0,04
CLNb+NaCl	183,10 ± 12,50	0,20 ± 0,03
CLNb+PBS	181,00 ± 13,93	0,20 ± 0,04
CLNb+DEMDEM	184,20 ± 11,05	0,20 ± 0,03
CLNb+Plasma	189,80 ± 22,60	0,21 ± 0,04
CLNb+FBS	187,20 ± 19,76	0,21 ± 0,04

A avaliação da estabilidade coloidal em meios biológicos demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa quando comparada com a avaliação físico-química, porém o leve aumento coloidal observado resultante da exposição de ambas as formulações de

CLN incubados em plasma murino e FBS pode ser explicado em decorrência das características destas matrizes biológicas complexas, ou seja, a interação do CLN com os componentes das matrizes biológicas como: proteínas séricas, biomoléculas, sais iônicos e aminoácidos, pode ter influenciado o comportamento hidrodinâmico dos CLN tornando-os levemente instáveis através da adsorção destes componentes das matrizes, o que leva a formação de agregados que podem influenciar o comportamento *in vitro* (CHENTHAMARA et al., 2019), vale salientar que tais resultados ainda estão dentro dos valores aceitáveis pela Farmacopeia Americana, no tocante a uma possível administração intravenosa relacionada as formulações lipídicas injetáveis com faixa inferior a 500 nm ou 0,5 µm (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2020).

5.4 Avaliação da viabilidade em linhagem de células de câncer de mama murino 4T1 e fibroblastos humanos saudáveis

A avaliação da viabilidade celular é um importante parâmetro utilizado de forma intrínseca para mensurar a capacidade de um determinado material na produção de alterações metabólicas nas linhagens celulares de interesse, podendo este resultar ou não na morte das células (WANG et al., 2015), em vista disso, a avaliação do potencial antitumoral foi realizado utilizando-se as células da linhagem de câncer de mama murino 4T1 (como linhagem de células alvo) e para a linhagem de células saudáveis, foi utilizado fibroblasto humanos saudáveis.

O modelo da linhagem de células de câncer de mama murino 4T1 é utilizado na pesquisa de novos fármacos antineoplásicos e foi isolado originalmente em 1983 por Fred Miller e colaboradores do *Karmonas Cancer Institute*, a linhagem teve suas aplicações em modelos experimentais aumentadas em decorrência de sua elevada propensão a metástase para osso e outros locais (TAO et al., 2008).

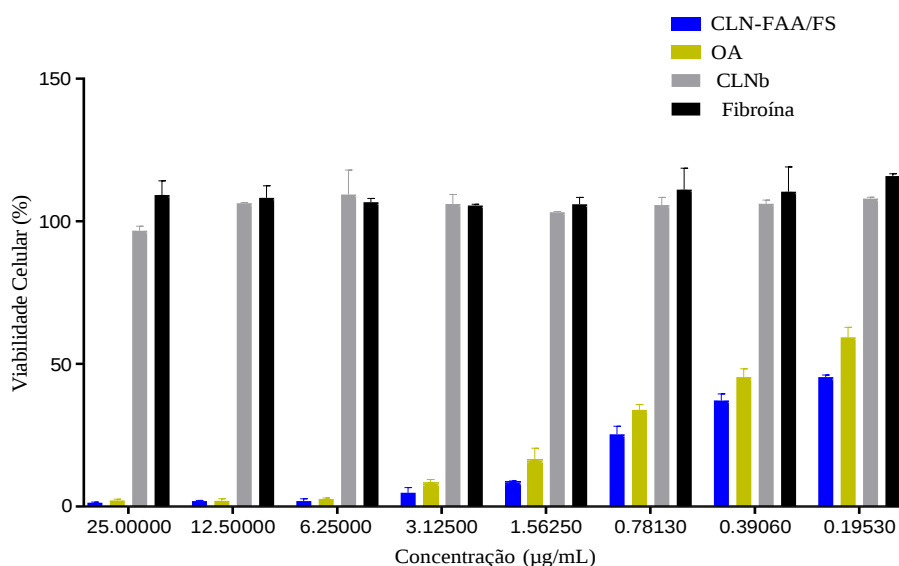
As células de câncer de mama murino 4T1 possuem características que as tornam um modelo experimental adequado para estudar o câncer de mama, uma vez que tal linhagem é pouco imunogênica, altamente tumorigênica e capaz de desenvolver metástase de forma parecida com o que ocorre nas glândulas mamárias humanas em diversos sítios como linfonodos, pulmão, fígado e cérebro (SCHIRMER et al., 2018).

Apesar das células 4T1 possuírem fenótipo invasivo, quando cultivadas de forma confluyente expressam elevado nível de e-coderina (moléculas envolvidas na adesão celular), contudo células 4T1 com crescimento avulso o nível de e-coderina é regulado negativamente de maneira que as células formam aglomerados soltos interconectados onde cada célula dentro

desse aglomerado tem liberdade para migra isoladamente, assim sua saída do grupo se limita pela ligação. Essas células também podem ser utilizadas como modelo animal de câncer de mama devido ao alto potencial metastático pois quando infiltradas na gordura da mama ou na corrente sanguínea desenvolvem metástase em diversos órgãos como fígado pulmão e osso (ELISHA et al., 2018).

Neste caso, o ensaio colorimétrico Sulforodamina B detectou redução na viabilidade celular para as culturas de células 4T1 incubadas com CLN-FAA/FS ($0,18 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$), essa redução foi significativa em relação ao AO puro ($0,32 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$) como demonstrado na figura 18, isto pode ser explicado possivelmente pela quantidade de FAA disponível e entregue pelo CLN às células, uma vez que as nanopartículas lipídicas podem encapsular e aumenta a biodisponibilidade de substancias lipofílicas, como as FAA (VARDANEGA et al., 2024). Também foi testado o CLNb sem FAA/FS e fibroína isolada, contudo, ambas não tiveram influência sobre a viabilidade celular, de modo que não foi possível estimar a IC_{50} .

Figura 18 - Viabilidade em células de câncer de mama murino 4T1



Nota: CLN-FAA/FS - Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo amida de ácidos graxos e fibroína de seda; OA – Óleo de Andiroba, CLNb – Carreador Lipídico Nanoestruturado Branco.

In vitro o CLN-FAA/FS demonstrou ser uma formulação com potencial para tratar tumores mamários, uma vez que a IC_{50} da viabilidade em células de câncer de mama murino 4T1 foi alcançada com concentração do CLN-FAA/FS 56,25% menor que a do óleo de andiroba. A literatura relata que potencial antitumoral do óleo de andiroba está relacionado com o teor de ácidos graxos que influenciam nos mecanismos de morte celular por apoptose, o que

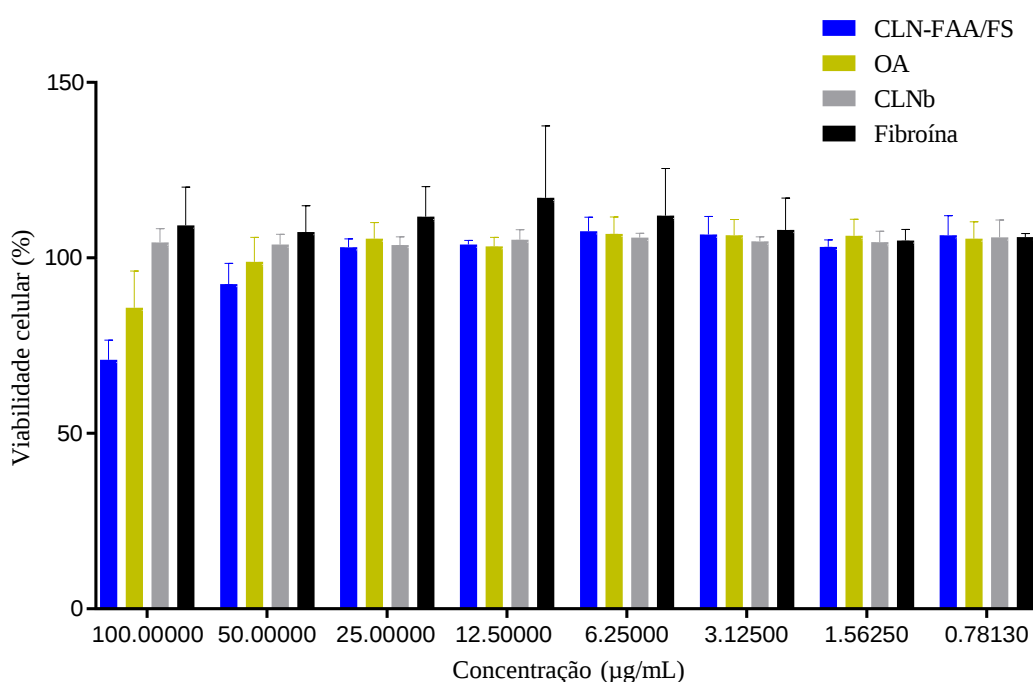
leva a diminuição da viabilidade das células (PORFÍRIO-DIAS et al., 2020b) corroborando com nossos achados.

Em nosso estudo, por ser tratar de um *pool* de FAA encapsuladas no CLN, podemos sugerir que a diminuição da viabilidade do CLN-FAA/FS pode acontecer por dois caminhos, o primeiro deve-se a características das isobutilamidas canabinomiméticos que interagem com o receptor CB₂R, que estão expressamente aumentados no câncer de mama, independente do subtipo (DOBOVIŠEK et al., 2020), sendo este um importante *upregulated* para muitos tumores mamários.

O segundo caminho, sugere-se que a *N*-isobutiloleamida, principal isobutilamida semi-sintetizada a partir do óleo da andiroba, estruturalmente assemelhasse à *N*-oleoiletanolamina sendo a oleamida um protetor autócrino contra a proliferação celular do câncer de mama humano (JONES; HOWL, 2003).

Outro achado importante foi em relação aos fibroblastos (Figura 19), de modo que, mesmo com as concentrações mais elevadas acima de 100 µg/mL, para o CLN-FAA/FS (137,8 ± 9,9 µg/mL) e OA (147,7 ± 7,9 µg/mL) não foi possível calcular o IC₅₀, de forma semelhante, em todas as concentrações testadas do CLNb sem FAA/FS e fibroína também não houve redução da viabilidade celular dos fibroblastos saudáveis.

Figura 19 - Viabilidade em fibroblastos humanos saudáveis



Nota: CLN-FAA/FS - Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo amida de ácidos graxos e fibroína de seda; OA – Óleo de Andiroba, LCNb – Carreador Lipídico Nanoestruturado Branco.

A baixa toxicidade do CLN já é bem definida (LÜDTKE et al., 2022), já em relação a FS, ensaios envolvendo nanopartículas de fibroína corroboram com estes achados, uma vez que, as nanopartículas com FS podem ser facilmente difundidas para dentro das células, mas com quase nenhuma toxicidade para elas, mesmo variando a concentração da FS nas nanoformulações, isto é importante, no tocante a substituição de surfactantes sintéticos dos nanosistemas por FS (HOLANDA et al., 2023; KUNDU et al., 2010).

A fibroína da seda (FS) ou simplesmente seda como é conhecida comercialmente trata-se de uma proteína natural extraída do casulo produzido pela larva do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). (LINARDI; ZIBORDI; LOPES, 2020).

Esta proteína é utilizada como biomaterial e possui características interessantes de biodegradabilidade, estabilidade térmica e biocompatibilidade. A literatura aponta que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a fibroína da seda quando comparada com outros polímeros biodegradáveis apresenta menor resposta inflamatória. Outro atributo que merece destaque é a capacidade de regulação da estrutura e morfologia polimérica da seda que em um processo aquoso torna a FS um candidato de suporte para aplicações de liberação de fármacos (RESTREPO, 2019).

Em matrizes de biomateriais a FS potencializa a eficácia das substâncias ativas, o que resulta em melhoria do efeito terapêutico nos processos de *Drug delivery*, uma vez que aumenta a biodisponibilidade e a biodistribuição (QUEIROZ-SOUZA et al., 2024).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A reação de síntese de amidação direta a partir do óleo da andiroba foi bem sucedida, uma vez que o óleo é uma excelente fonte de triglicerídeos para a síntese de FAA, além disso, como já era de se esperar, a principal molécula sintetizada teve sua concentração proporcional ao componente majoritário presente no óleo, que foi confirmado através das análises espectroscópicas do FTIR, RMN ^{13}C e GC-MS.

Os produtos da reação de síntese foram as isobutilamidas, estas quando estão em temperatura ambiente apresentam-se como verdadeiras “graxas” o que dificulta seu aprisionamento em um sistema nanoestruturado com baixa afinidade lipofílica, sendo necessário aquece-las até se tornarem líquidas para incorpora-las em nanopartículas lipídicas como o CLN, isso justifica a escolha desta plataforma de nanoentrega, além disso, para melhorar a eficiência do encapsulamento foi incorporado a FS, afim de utiliza-la com surfactante e suporte de entrega de fármaco.

No estudo da estabilidade físico-química o sistema CLN/FAA-FS se manteve dentro dos parâmetros esperados em relação ao tamanho médio das partículas, potencial zeta e PDI, mostrando-se apto para uma possível administração endovenosa em um ensaio *in vivo*, neste sentido a avaliação da estabilidade coloidal corroborou mostrando que o sistema não sofre alterações significativas em meios biológicos.

No ensaio *in vitro* do sistema CLN/FAA-FS demonstrou ter potencial citotóxico em células de câncer de mama murino 4T1, superior ao óleo puro, além disso, mostrou segurança para células saudáveis como fibroblastos humanos, demonstrando maior afinidade pelas células alvo tumorais.

Nesta conjuntura, através deste *screening* o CLN/FAA-FS tem potencial para tornar-se um candidato a fármaco para tratar tumores mamários como demonstrado, contudo, outros ensaios futuros que contemplem a farmacocinética e a farmacodinâmica precisam ser realizados, bem como conhecer o mecanismo de ação farmacológico e o mecanismo de morte celular.

ADES, F. **CÂNCER DE MAMA – RECOMENDAÇÕES PARA DETECTAR A DOENÇA EM ESTÁGIO PRECOCE**. Disponível em: <<http://drfelipeades.com/2014/11/03/ditretrizes-e-recomendacoes-para-o-rastreamento-e-deteccao-precoce-do-cancer-de-mama>>. Acesso em: 18 abr. 2024.

ALHOUAYEK, M. et al. N -acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase and fatty acid amide hydrolase inhibition differentially affect N -acylethanolamine levels and macrophage activation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 5, p. 474–484, maio 2017.

ALVES, M. R. et al. Spatial and temporal distribution of cancer mortality in a Brazilian Legal Amazon State between 2000 and 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, n. suppl 1, 2021.

AMBROZIN, A. R. P. et al. Limonoids from andiroba oil and Cedrela fissilis and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, jun. 2006.

APOLINÁRIO, A. et al. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS ‘ESPAÇO LÁ EMBAIXO. **Química Nova**, 2020.

ARAÚJO, M.; ALMEIDA, M. B.; ARAÚJO, L. L. N. The cannabinoids mechanism of action: an overview. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 6, 2023.

ARAÚJO, P. H. F. et al. Direct and Solvent-Free Aminolysis of Triglyceride from Oenocarpus bataua (Patawa) Oil Catalyzed by Al₂O₃. **Catalysis Letters**, v. 148, n. 3, p. 843–851, 2 mar. 2018.

ARNOLD, M. et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. **The Breast**, v. 66, p. 15–23, dez. 2022.

BARATA, P. et al. Chemoenzymatic Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Fatty Acid Amides Prepared from Bertholletia excelsa (Brazil Nut) Triglycerides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

BARENHOLZ, Y. (CHEZY). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, jun. 2012.

BATIST, G. et al. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 12, p. 1739–1751, 25 dez. 2002.

BATISTA, D. R. R.; MATTOS, M. DE; SILVA, S. F. DA. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 5, n. 3, 1 out. 2015.

BESSA, J. DE F. Breast imaging hindered during covid-19 pandemic, in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 55, p. 8, 26 abr. 2021.

BEZERRA, T. P. W. et al. A nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos: revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e99111436115, 20 out. 2022.

BOIVIN, M. Nabiximols (Sativex®). Em: **Cannabinoids and Pain**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 119–126.

- BORRELLI, F.; IZZO, A. A. Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 33–49, fev. 2009.
- BRUNI, N. et al. Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2478, 27 set. 2018.
- CAMMAROTA, M. et al. Combined targeting of fatty acid amide hydrolase and melatonin receptors promotes neuroprotection and stimulates inflammation resolution in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 180, n. 10, p. 1316–1338, 6 maio 2023.
- CHENTHAMARA, D. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. **Biomaterials Research**, v. 23, n. 1, p. 20, 21 dez. 2019.
- CITOLER, J. et al. Direct Enzymatic Synthesis of Fatty Amines from Renewable Triglycerides and Oils. **ChemBioChem**, v. 23, n. 2, 19 jan. 2022.
- COLA, D. et al. LIPID NANOSTRUCTURED CARRIERS SYSTEMS FOR IVERMECTIN AND METHOPRENE AIMING PARASITE CONTROL. **Química Nova**, 15 jul. 2016.
- DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.
- DENG, H.; LI, W. Monoacylglycerol lipase inhibitors: modulators for lipid metabolism in cancer malignancy, neurological and metabolic disorders. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 4, p. 582–602, abr. 2020.
- DIAS, R. S.; MAIA, E. DOS S.; LOPES, G. DE S. Câncer de mama: percepções frente à mastectomia. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e322101624109, 5 dez. 2021.
- DIN, F. UD et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 7291–7309, out. 2017.
- DOBOVIŠEK, L. et al. Cannabinoids and Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Treatment. **Cancers**, v. 12, n. 3, p. 525, 25 fev. 2020.
- ELISHA, Y. et al. Dual role of E-cadherin in the regulation of invasive collective migration of mammary carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4986, 21 mar. 2018.
- FONSECA, B. M. et al. The Endocannabinoid System in the Postimplantation Period: A Role during Decidualization and Placentation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- GERSTBERGER, S.; JIANG, Q.; GANESH, K. Metastasis. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1564–1579, abr. 2023.
- GERTSCH, J. Immunomodulatory Lipids in Plants: Plant Fatty Acid Amides and the Human Endocannabinoid System. **Planta Medica**, v. 74, n. 6, p. 638–650, maio 2008.
- GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p. 288, 2018.
- GIL-ORDÓÑEZ, A. et al. Monoacylglycerol lipase (MAGL) as a promising therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, v. 157, p. 18–32, nov. 2018.
- GODOY-MATOS, A. F. DE et al. O sistema endocanabinóide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 390–399, abr. 2006.

GROSSO, A. F. Cannabis: from plant condemned by prejudice to one of the greatest therapeutic options of the century. **Journal of Human Growth and Development**, v. 30, n. 1, p. 94–97, 27 mar. 2020.

HOLANDA, F. H. et al. Development of nanostructured formulation from naringenin and silk fibroin and application for inhibition of lipoxygenase (LOX). **RSC Advances**, v. 13, n. 33, p. 23063–23075, 2023.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. DA. Aspectos terapêuticos de compostos da planta Cannabis sativa. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 318–325, abr. 2006.

INCA. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. 1. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], v. 1

INCA. **Estimativa 2023 – Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/inca-lanca-a-estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil/>>. Acesso em: 3 jan. 2024a.

INCA. **Dados e números sobre câncer de mama: Relatório anual 2023**. Disponível em: <www.inca.gov.br/mama>. Acesso em: 18 mar. 2024b.

JAMIL, MD. A. R. et al. Selective Transformations of Triglycerides into Fatty Amines, Amides, and Nitriles by using Heterogeneous Catalysis. **ChemSusChem**, v. 12, n. 13, p. 3115–3125, 5 jul. 2019.

JONES, S.; HOWL, J. Cannabinoid receptor systems: therapeutic targets for tumour intervention. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 7, n. 6, p. 749–758, 2 dez. 2003.

KEFAYAT, A. et al. Spirulina extract enriched for Braun-type lipoprotein (Immulina®) for inhibition of 4T1 breast tumors growth and metastasis. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 2, p. 368–378, 5 fev. 2020.

KUMAR, D.; ALI, A. Direct synthesis of fatty acid alkanolamides and fatty acid alkyl esters from high free fatty acid containing triglycerides as lubricity improvers using heterogeneous catalyst. **Fuel**, v. 159, p. 845–853, nov. 2015.

KUNDU, J. et al. Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 242–250, mar. 2010.

LEMOES, J. D. A. **PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOEMULSÕES O/A PARA CO-ENTREGA DE DOXORRUBICINA E OLEORRESINA DE SUCUPIRA EXTRAÍDAS DOS FRUTOS DE Pterodon emarginatus Vogel**. Belo Horizonte, 2021.

LESSA, M. A.; CAVALCANTI, I. L.; FIGUEIREDO, N. V. Cannabinoid derivatives and the pharmacological management of pain. **Revista Dor**, v. 17, n. 1, 2016.

LI, Yan et al. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. **Food Hydrocolloids**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 517–528, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.017>.

LIMA, P. A. **ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINOIDE NAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS CRÔNICAS**. Belo Horizonte, 2020. Disponível em: <<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3832609>>. Acesso em: 18 jan. 2024

LINARDI, L. H.; ZIBORDI, E. R.; LOPES, J. R. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NPsAg) EM SOLUÇÃO AQUOSA DE BIOPOLÍMERO. **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, v. 5, p. 81–103, 2020.

LOPES, C. R. Synthesis of new fatty acids amides from aminolysis of fames. **Quím. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1335–1341, 2010.

LU, H.-C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607–615, jun. 2021.

LÜDTKE, F. L. et al. High oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil nanostructured lipid carriers: Development and characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 654, p. 130039, dez. 2022.

MALCOLM, D. W. et al. The Effects of Biological Fluids on Colloidal Stability and siRNA Delivery of a pH-Responsive Micellar Nanoparticle Delivery System. **ACS Nano**, v. 12, n. 1, p. 187–197, 23 jan. 2018.

MARCHIONI, C. **Determinação de endocanabinóides e canabinóides em amostras biológicas de pacientes com a doença de Parkinson por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem**: Doutorado. Ribeirão Preto: [s.n.].

MELO, V. F. DE et al. PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE DRUGS. **Amadeus International Multidisciplinary Journal**, v. 5, n. 9, p. 124–128, 30 jul. 2020.

MELO JR., M. A. et al. Preparation of silver and gold nanoparticles: a simple method to introduce nanotechnology into teaching laboratories. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MELO, K. M. et al. Andiroba oil and nanoemulsion (*Carapa guianensis* Aublet) reduce lesion severity caused by the antineoplastic agent doxorubicin in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111505, jun. 2021.

MIRANDA, S. E. M. et al. Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110936, jan. 2021.

NEUBERT, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1–2, jan. 2011.

O'BRIEN, M. E. R. et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 3, p. 440–449, mar. 2004.

OLIVEIRA, F. R. DE et al. Fatty Acid Amides Synthesized from Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet.) Exhibit Anticonvulsant Action with Modulation on GABA-A Receptor in Mice: A Putative Therapeutic Option. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 3, p. 43, 10 mar. 2020.

OLIVEIRA, L. C. DE et al. Applications of Lipid Nanocarriers for Solid Tumors Therapy: Literature Review Aplicaciones de las Nanopartículas Lipídicas el Tratamiento de Tumores Sólidos: Revisión de la Literatura. **Nanopartículas Lipídicas no Câncer**, v. 58, n. 4, p. 695–701, 2 maio 2012.

OLIVEIRA, I. G. DE C.; MARCHIONI, C.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of anandamide in cerebrospinal fluid samples by disposable pipette extraction and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1130–1131, p. 121809, nov. 2019.

PACHECO, A. G. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

PAGANO, C. et al. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 3344, 19 mar. 2022.

PARDEIKE, J. et al. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, n. 1–2, p. 329–338, out. 2011.

PARK, M. et al. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6806, 18 jun. 2022.

PEDRO, I. D. R. **DESENVOLVIMENTO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CONTENDO PACLITAXEL**. Diamantina, 2018.

PENG, J. et al. A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 130, n. 4, p. 439–456, 6 abr. 2022.

PEREIRA, T. A. et al. Aprimoramento das nanotecnologias de produção de fármacos: utilizando nanotecnologia no tratamento do câncer / Improvement in pharmaceutical production technologies: using nanotechnology in cancer treatment. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 30580–30590, 25 abr. 2022.

PORFÍRIO-DIAS, C. L. et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPP02 gastric cancer cell line. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1060–1066, 9 ago. 2020a.

PORFÍRIO-DIAS, C. L. et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis*) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPP02 gastric cancer cell line. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1060–1066, 9 ago. 2020b.

PRODOCTOR. **Medicamentos**. Disponível em: <<https://prodoctor.net/>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

PROSPÉRO-GARCÍA, O. et al. Endocannabinoids as Therapeutic Targets. **Archives of Medical Research**, v. 50, n. 8, p. 518–526, nov. 2019.

QU, W. et al. Highly Biocompatible Apigenin-Loaded Silk Fibroin Nanospheres: Preparation, Characterization, and Anti-Breast-Cancer Activity. **Polymers**, v. 15, n. 1, p. 23, 21 dez. 2022.

QUEIROZ-SOUZA, P. et al. Polymeric nanoparticles containing kojic acid induce structural alterations and apoptosis-like death in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 23 jan. 2024.

RANSON, M. R. et al. Caelyx (stealth liposomal doxorubicin) in the treatment of advanced breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 37, n. 2, p. 115–120, fev. 2001.

RESTREPO, S. G. **Fibroína da seda é uma proteína fibrosa obtida de larvas cultivadas do bicho da seda *Bombyx mori***. São Carlos, 2019.

RIBEIRO, A. DA C. et al. Obtaintion of magnetic nanoparticles using everyday materials: synthesis, characterization and didactic approach for high school. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 43, 2021.

RIBEIRO, L. G. T.; NOCETTI, C.; BAPTISTA, A. G. USO DE CANABINOIDES COMO ADJUVANTE NO TRATAMENTO DA DOR CRÔNICA. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, v. 28, n. 3, p. 46–53, 2019.

RODRIGUES, G. M. et al. Desigualdades raciais no estadiamento clínico avançado em mulheres com câncer de mama atendidas em um hospital de referência no Rio de Janeiro, Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 30, n. 3, 2021.

RODRÍGUEZ MESA, X. M. et al. Therapeutic Prospects of Cannabinoids in the Immunomodulation of Prevalent Autoimmune Diseases. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 6, n. 3, p. 196–210, 1 jun. 2021.

ROJAS-AGUIRRE, Y.; AGUADO-CASTREJÓN, K.; GONZÁLEZ-MÉNDEZ, I. **La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?** Educación Química, out. 2016.

ROVITO, D. et al. Omega-3 PUFA ethanolamides DHEA and EPEA induce autophagy through PPAR γ activation in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 6, p. 1314–1322, 25 jun. 2013.

SAFWAT, S. et al. Nanostructured lipid carriers loaded with simvastatin: effect of PEG/glycerides on characterization, stability, cellular uptake efficiency and *in vitro* cytotoxicity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 7, p. 1112–1125, 3 jul. 2017.

SAMIRA J. FAYAD, 10., 2009, Foz do Iguaçu. Nanopartículas obtidas a partir da proteína isolada de soja (spi) pelo método de coacervação em água: efeito da força iônica e das concentrações de proteína e surfactante. Foz do Iguaçu: **Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2009. 11 p.

SALVIONI, L. et al. Thirty Years of Cancer Nanomedicine: Success, Frustration, and Hope. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1855, 25 nov. 2019.

SANDOVAL-YAÑEZ, C.; CASTRO RODRIGUEZ, C. Dendrimers: Amazing Platforms for Bioactive Molecule Delivery Systems. **Materials**, v. 13, n. 3, p. 570, 24 jan. 2020.

SANTOS, D. S. DOS. **Avaliação da Atividade Antitumoral de Amidas Graxas Análogas de Canabinóides**. Rio Grande, 2014.

SCHILLER, G. J. et al. Marqibo®, Vincristine Sulfate Liposome Injection, for the Treatment of Advanced, Relapsed or Refractory Philadelphia Chromosome-Negative (Ph-) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in an Adolescent Young Adult (AYA) Population. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 1291–1291, 3 dez. 2015.

SCHIRMER, B. G. DE A. et al. Comparison of [18F]Fluorocholine and [18F]Fluorodesoxyglucose for assessment of progression, lung metastasis detection and therapy response in murine 4T1 breast tumor model. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 140, p. 278–288, out. 2018.

SHUAIB, M. et al. Traditional knowledge about medicinal plant in the remote areas of Wari Tehsil, Dir Upper, Pakistan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023.

SILVA, Á. R. S. DA et al. Perfil de limonóides isolados da andiroba (*Carapa Guianensis* Aubl): Revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 6, p. e3912642018, 4 jun. 2023a.

SILVA, V. P. DA et al. Bioactive limonoids from *Carapa guianensis* seeds oil and the sustainable use of its by-products. **Current Research in Toxicology**, v. 4, p. 100104, 2023b.

SILVA, L. R. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA ANDIROBA. **Nativa**, v. 6, n. 2, p. 147, 26 mar. 2018.

TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 228, 9 dez. 2008.

- TAO, R. et al. Neonatal Supplementation of Oleamide During Suckling Promotes Learning Ability and Memory in Adolescent Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 152, n. 3, p. 889–898, mar. 2022.
- TENCHOV, R. et al. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**, v. 15, n. 11, p. 16982–17015, 23 nov. 2021.
- TSUBOI, K. et al. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. **Inflammation and Regeneration**, v. 38, n. 1, p. 28, 1 dez. 2018.
- UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **GLOBULE SIZE DISTRIBUTION IN LIPID INJECTABLE EMULSIONS - USP43-NF38**. Rockville, 2020.
- VARDANEGA, R. et al. Development and characterization of nanostructured lipid carriers for cannabidiol delivery. **Food Chemistry**, v. 441, p. 138295, maio 2024.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 17 ago. 2006.
- WANG, Z. et al. A Neuroprotective Sericin Hydrogel As an Effective Neuronal Cell Carrier for the Repair of Ischemic Stroke. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 44, p. 24629–24640, 11 nov. 2015.
- YOCHIMURA, D. **PERFIL TERAPÊUTICO DO CANABIDIOL EM EPILEPSIAS**. Uberlândia, 2019.
- ZHANG, J. et al. Paclitaxel liposome for injection (Lipusu) plus cisplatin versus gemcitabine plus cisplatin in the first-line treatment of locally advanced or metastatic lung squamous cell carcinoma: A multicenter, randomized, open-label, parallel controlled clinical study. **Cancer Communications**, v. 42, n. 1, p. 3–16, 26 jan. 2022.
- ZIBARA, K. et al. Anti-angiogenesis therapy and gap junction inhibition reduce MDA-MB-231 breast cancer cell invasion and metastasis in vitro and in vivo. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12598, 28 jul. 2015.
- ZILLI, R. A. D.; SIMAS, L. A. W. Prevenção e Tratamento da Caquexia no Câncer de Mama por Probiótico e Curcumina. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 3, p. 139, 13 set. 2019.

Artigo submetido

Your manuscript has been opted in to In Review

In Review at Biotechnology Letters <noreply@springernature.com>

Qui, 22/02/2024 23:15

Para Sandro da S. Borges <ssilva.borges@hotmail.com>

Dear Dr. Irlon Ferreira,

Your manuscript "Evaluation of the cytotoxic activity of nanostructured lipid carrier systems for fatty acid amide and silk fibroin in breast cancer cell lines" has been opted in to [In Review](#) from Springer Nature as part of its submission to Biotechnology Letters. *In Review* is a free preprint service that permanently posts your manuscript to the preprint server [Research Square](#).

The *In Review* service will:

- Publicly share your manuscript on Research Square in the form of a preprint with a DOI.
- Allow the public to track the status of your manuscript through the peer review process using a peer review timeline.
- Enable you the benefits of early sharing, such as more collaboration opportunities and earlier citations.
- Provide an opportunity to receive feedback and comments from the community that can improve your manuscript.

All preprints posted as part of the *In Review* service are screened for preprint suitability, formatted, assigned a DOI, and publicly posted under a CC-BY 4.0 license as a preprint on Research Square. It will be permanently available for anyone to view online, regardless of the journal decision.

If you have any questions about why your manuscript was opted in to *In Review*, please contact the submitting author. If the preprint has not yet been posted, the submitting author will be able to opt out by logging in to their Research Square Dashboard. Once the preprint is posted, you will no longer be able to opt out of *In Review*.

If you have any questions or feedback, [visit our Help Center](#) or [contact us](#).

Sincerely,

Springer Nature