



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
RENORBIO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

KATIA REGINA ASSUNÇÃO BORGES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO ÓLEO DA
SEMENTE DE *EUTERPE OLERACEA* MART. *IN VITRO* E *IN VIVO*, E
DA SUA NANOEMULSÃO**

São Luís - MA

2024

KATIA REGINA ASSUNÇÃO BORGES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO ÓLEO DA
SEMENTE DE *EUTERPE OLERACEA* MART. *IN VITRO* E *IN VIVO*, E
DA SUA NANOEMULSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em saúde.

Orientador: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Área de conhecimento: Biotecnologia em Saúde.

São Luís - MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Assunção Borges, Katia Regina.

Avaliação do Potencial Biotecnológico do Óleo da
Semente de Euterpe Oleracea Mart. In Vitro e In Vivo, e da
Sua Nanoemulsão / Katia Regina Assunção Borges. - 2024.
113 f.

Orientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão
Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do
Maranhão, Ufma, 2024.

1. Óleo de Açaí. 2. Euterpe Oleracea Mar. 3. Câncer
Cervical. 4. Nanoemulsão. 5. . I. Soares Brandão
Nascimento, Maria do Desterro. II. Título.



Universidade Federal do Maranhão
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805 **Telefone:** (98) 3272-8000 **E-mail:** renorbio@ufma.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Katia Regina Assunção Borges

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO ÓLEO DA SEMENTE DE *EUTERPE OLERACEA* MART. *IN VITRO* E *IN VIVO*, E DA SUA NANOEMULSÃO

PROFESSORA ORIENTADORA: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Banca Examinadora	Conceito	Assinatura
Prof. Dra. Ana Lúcia Abreu (Memória) UEMA		
Prof ^a . Dr ^a . Ana Isabel Faustino-Rocha – 1º Examinador UTAD CITAB - Portugal		
Prof ^a . Amanda Mara Teles – 2º Examinador UEMA		
Profº. Dr. Rui Miguel da Costa Oliveira – 3º Examinador UFMA		
Profº. Dr. Antônio Carlos Romão Borges Suplente		
Profº. Dr. Marcos Antônio Custódio da Silva Neto Suplente		

DATA DA APROVAÇÃO:

HORÁRIO:

LOCAL:

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO ÓLEO DA SEMENTE DE
EUTERPE OLERACEA MART. IN VITRO E IN VIVO, E DA SUA NANOEMULSÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Lúcia Abreu (Memória)
UEMA

Prof^a. Dr^a. Ana Isabel Faustino-Rocha – 1º Examinador
UTAD CITAB - Portugal

Prof^a. Amanda Mara Teles – 2º Examinador
UEMA

Profº. Dr. Rui Miguel da Costa Oliveira – 3º Examinador
UFMA

Profº. Dr. Antônio Carlos Romão Borges
Suplente

Prfº. Dr. Marcos Antônio Custódio da Silva Neto
UFMA – Suplente.

A vida avança para a plenitude.
Tudo contribui para o crescimento e sublimação do ser.
Joana de Ângelis

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a sabedoria necessária em todos os momentos da vida.

À minha família, especialmente ao meu marido Henrique Marçal Andrade Araújo, aos meus filhos Ana Luiza Borges Araújo e Pedro Henrique Borges Araújo.

Aos familiares João José Farias Bacelar e Carlota Zaíra da Fonseca Bacellar, Rodrigo da Fonseca Bacellar e Ana Carolina da Fonseca Bacellar;

Aos meus colegas do curso da Rede Nordeste de Biotecnologia - Renorbio, Neurene Cruz, Olga.

À minha orientadora Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pelo incentivo e apoio incondicional em todas as etapas, por não desistir de mim, por não me deixar sucumbir, pelas palavras nos momentos de aflição ... enfim por tudo. Muito obrigada!

Aos amigos do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada -NIBA da Universidade Federal do Maranhão, especialmente professora Geusa, Marcos Custódio, Rita de Nazaré, Kenia, Carlene, Walbert, Édina, Sâmia, Senhor Domingos (*in memorian*), Alysson, Flávio, Laís, Lila, Igor Vinicius e demais alunos e IC do NIBA e André Vale.

Às professoras Silma Regina Ferreira Perea, e Mayara Ingide Sousa Lima, pela parceria do LABGEN e ao amigos do LABGEN, Santana, Ana Jéssoca e demais alunos.

Aos professores Maria do Socorro Cartagenes, pelo apoio e incentivo; Ana Isabel Fasutino, Rui Miguel (UFMA), Rafael (UFMA), Eduardo (CEUMA) e aos técnicos do Biotério Hugo e Natalya dos Santos Martins pelo apoio e parceria com os experimentos e análise *in vivo*.

À Universidade Federal do Maranhão - UFMA e seus Laboratórios: Núcleo de Combustíveis, Catálise e Ambiental - (NCCA), especialmente ao professora Cáritas, Neurene Cruz e Adeilton. Ao LIAC especialmente à professora Ana Paula Azevedo, Sulayne e André.

À Fapema pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

BORGES, KATIA REGINA ASSUNÇÃO. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO DA SEMENTE DE *EUTERPE OLERACEA* MART. *IN VITRO* E *IN VIVO*, E DA SUA NANOEMULSÃO. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, 2024.

RESUMO

O óleo da semente de açaí, *Euterpe oleracea* Mart., é rico em ácidos graxos insaturados, saturados, monoinsaturados e polinsaturados com atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva, anticancerígena, antiaterogênica e cicatrizante. A semente do açaí é um resíduo produzido após o despulpamento, sendo fonte de compostos bioativos; assim, se faz necessário estudar suas propriedades farmacológicas e contribuir para o desenvolvimento sustentável. O objetivo deste foi avaliar o potencial biotecnológico do óleo da semente de *Euterpe oleracea* Mart. - *in vitro* e *in vivo* - e da sua Nanoemulsão. Os frutos utilizados foram coletados no Parque Ecológico do Maracanã (Parque da Juçara), em São Luís, Maranhão. Amostras da planta foram coletadas entre os meses agosto e novembro, e realizada confecção da exsicata, devidamente armazenada no Herbário Rosa Mochel. Posteriormente, o óleo foi extraído com solvente n-hexano em extrator Soxhlet e analisado como ésteres metílicos, pesando-se 100 mg do óleo para análise do perfil cromatográfico por cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa (CG-EM) para identificação dos ácidos graxos e sua caracterização físico-química. Após conhecer a físico-química do óleo, foi desenvolvida a nanoemulsão de óleo de semente de açaí (NE-OEO) a partir do cálculo do Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico (EHL), seguido da análise de estabilidade, caracterização química e morfologia. Para determinar o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão, as formulações foram avaliadas através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) e do Potencial Zeta no equipamento Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). Tanto o óleo quanto a NE-OEO mostraram padrões físico-químicos dentro da normalidade. Ou seja, o óleo mostrou acidez ($0,3556 \pm 0,0003$), umidade ($1,25 \pm 1,64$), índice de saponificação ($189 \pm 1,04$), índice de refração ($1,4707 \pm 0,00005$), resíduo de incineração (cinzas) ($0,42 \pm 0,42$) e densidade ($0,928 \pm 0,00005$). E a NE-OEO mostrou os padrões normais quanto tamanho das gota ($238,37 \pm 3,96$), homogeneidade (PDI) ($0,38 \pm 0,38$), potencial Zeta ($-9,59 \pm 0,11$), pH ($7,0 \pm 0,00$) e turbidez ($0,267 \pm 0,00$). Com relação aos compostos fenólicos, NE-OEO apresentou maior concentração, $146,00 \pm 0,259$ mg, enquanto o óleo foi de $127,40 \pm 0,449$ mg EAG g⁻¹ de compostos fenólicos, e flavonoides totais foram encontrados os valores $62,62 \pm 0,930$ mg para o óleo e $113,80 \pm 0,454$ mg EQ

g-1 para a NE-OEO. A atividade antioxidante foi comprovada a partir do EC50 avaliado no ensaio de DPPH e ABTS, sendo, no DPPH, o óleo 375,698 µg/mL, e nanoemulsões com EC50 significativamente menor, equivalente a 229,845 µg/mL. O controle Trolox, apresentou um EC50 ainda mais baixo. No teste ABTS, o EC50 do óleo de açaí foi de 272,0208 µg/mL, enquanto as nanoemulsões de óleo de açaí apresentaram um valor de EC50 ainda menor, medindo 201,2895 µg/mL. O Trolox também apresentou um EC50 significativamente mais baixo em comparação com óleo e NE-OEO, esses dados confirmam a capacidade antioxidante do óleo e sua NE-OEO. Foram realizadas análises *in vitro* nas linhagens celulares não tumorais macrófagos RAW 264.7 de camundongo, e queratinócitos humano HaCat e linhagens tumorais de câncer cervical SiHa (HPV-16) e HeLa (HPV-18). As linhagens não tumorais foram tratadas com concentrações (7.8 a 1000 µg/mL) do óleo e NE-OEO por 24, 48 e 72 horas, e as células tumorais foram tratadas com concentrações (0,631 a 100 µg/mL) do óleo, feitas as análises de viabilidade celular, morte celular, morfologia, cicatrização e clonogenicidade. Após as análises *in vitro*, foi analisado o efeito do óleo e da NE-OEO da semente de açaí em *in vivo* em camundongo Swiss fêmeas. Os animais foram tratados com diferentes concentrações do óleo (100, 200 e 300 mg/kg) e NE-OEO (100 mg/kg) aplicados 0,5 mL intraperitonealmente em com quinzenalmente. O óleo da semente de açaí é rico em polifenóis, flavonoides, ácidos graxos saturados (49,27%) e ácidos graxos insaturados (50,73%), dentre os quais os ácidos graxos insaturados, 29,73% são monoinsaturados, 20,85% são poliinsaturados. Os ácidos graxos láurico, mirístico (C14:0), palmítico, linoleico, e oleico, foram os majoritariamente identificados. Ensaio de viabilidade com MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) demonstrou efeito citotóxico do óleo na linhagem de câncer cervical SiHa (HPV-16) e HeLa (HPV-18) e não citotóxico nas linhagens não tumorais HaCat, bem como o óleo e NE-OEO não foram citotóxico para a linhagem não tumoral RAW 264.7. O óleo da semente de açaí induziu alterações morfológicas nas células HeLa e SiHa, induzindo redução de viabilidade celular, inibiu a migração celular e formação de colônia nas linhagens celulares de câncer cervical. O ensaio com anexina V-FITC evidenciou morte celular por apoptose inicial e tardia em 24 e 48 hs após tratamento com o óleo da semente de açaí. Nos experimentos *in vivo*, o uso óleo na dose de 100, 200, 300 mg/kg e NE-OEO na dose 100 mg/kg não foram tóxicos para os animais, de acordo os padrões normais vistos no fígado e rim; além disso, não interferiu no comportamento e peso dos animais, no entanto, induziram resposta imunomoduladora com aumento significativo de IL10 e IL17. Nossos resultados sugerem o potencial biotecnológico do óleo e da NE-OEO em atividade antitumoral para câncer cervical, e em desenvolvimento de sistemas coloidais para entrega de fármacos. Além disso, o aproveitamento do resíduo da semente de açaí contribuirá tanto para a economia local, quanto para o desenvolvimento sustentável.

Palavras-chave: Óleo de Açaí. *Euterpe oleracea* Mart. Câncer cervical. Nanoemulsão.

ABSTRACT

BORGES, KATIA REGINA ASSUNÇÃO. **EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF EUTERPE OLERACEA MART SEED OIL. IN VITRO AND IN VIVO, AND ITS NANOEMULSION.** Thesis (Doctorate in Biotechnology). Postgraduate Program in Biotechnology of the Northeast Biotechnology Network, Focal Point Federal University of Maranhão, São Luís-MA, 2024

Açaí seed oil, *Euterpe oleracea* Mart., is rich in unsaturated, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids with anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antinociceptive, anticancer, antiatherogenic and healing activities. The açaí seed is a residue produced after pulping, being a source of bioactive compounds; therefore, it is necessary to study its pharmacological properties and contribute to sustainable development. The objective of this was to evaluate the biotechnological potential of *Euterpe oleracea* Mart seed oil. - in vitro and in vivo - and its Nanoemulsion. The fruits used were collected in the Maracanã Ecological Park (Parque da Juçara), in São Luís, Maranhão. Samples of the plant were collected between the months of August and November, and exsicata were prepared, duly stored in the Rosa Mochel Herbarium. Subsequently, the oil was extracted with n-hexane solvent in a Soxhlet extractor and analyzed as methyl esters, weighing 100 mg of the oil for analysis of the chromatographic profile by gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) to identify the fatty acids. and its physical-chemical characterization. After understanding the physical chemistry of the oil, the açaí seed oil nanoemulsion (NE-OEO) was developed based on the calculation of the Hydrophilic Lipophilic Balance (EHL), followed by stability analysis, chemical characterization and morphology. To determine the average particle size and polydispersity index, the formulations were evaluated using the dynamic light scattering technique (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) and Zeta Potential on the Nano ZS equipment (Malvern Instruments Ltd., UK). Both the oil and NE-OEO showed physicochemical patterns within normal limits. In other words, the oil showed acidity (0.3556 ± 0.0003), humidity (1.25 ± 1.64), saponification index (189 ± 1.04), refractive index (1.4707 ± 0.00005), incineration residue (ash) (0.42 ± 0.42) and density (0.928 ± 0.00005). And NE-OEO showed normal patterns regarding droplet size (238.37 ± 3.96), homogeneity (PDI) (0.38 ± 0.38), Zeta potential (-9.59 ± 0.11), pH (7.0 ± 0.00) and turbidity (0.267 ± 0.00). Regarding phenolic compounds, NE-OEO presented the highest concentration, 146.00 ± 0.259 mg, while the oil had 127.40 ± 0.449 mg EAG g⁻¹ of phenolic compounds, and total flavonoids values were found to be 62.62 ± 0.930 mg for the oil and 113.80 ± 0.454 mg EQ g⁻¹ for NE-OEO. The antioxidant activity was proven based on the EC₅₀ evaluated in the DPPH and ABTS assay, with the oil being 375.698 µg/mL in DPPH, and nanoemulsions with a significantly lower EC₅₀, equivalent to 229.845 µg/mL. The Trolox control presented an even lower EC₅₀. In the ABTS test, the EC₅₀ of açaí oil was 272.0208 µg/mL, while açaí oil nanoemulsions had an even lower EC₅₀ value, measuring 201.2895 µg/mL. Trolox also showed a significantly lower EC₅₀ compared to oil and NE-OEO, these data confirm the antioxidant capacity of the oil and its NE-OEO. In vitro analyzes were performed on the non-tumor cell lines mouse RAW 264.7

macrophages, and human HaCat keratinocytes and cervical cancer tumor lines SiHa (HPV-16) and HeLa (HPV-18). Non-tumor cell lines were treated with concentrations (7.8 to 1000 ug/mL) of the oil and NE-OEO for 24, 48 and 72 hours, and tumor cells were treated with concentrations (0.631 to 100 ug/mL) of the oil, made analyzes of cell viability, cell death, morphology, healing and clonogenicity. After in vitro analyses, the effect of açai seed oil and NE-OEO was analyzed in vivo in female Swiss mice. The animals were treated with different concentrations of the oil (100, 200 and 300 mg/kg) and NE-OEO (100 mg/kg) applied 0.5 mL intraperitoneally every two weeks. Açai seed oil is rich in polyphenols, flavonoids, saturated fatty acids (49.27%) and unsaturated fatty acids (50.73%), among which unsaturated fatty acids, 29.73% are monounsaturated, 20.85% are polyunsaturated. Lauric, myristic (C14:0), palmitic, linoleic, and oleic fatty acids were the most identified. Viability assay with MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) demonstrated a cytotoxic effect of the oil on the SiHa (HPV-16) and HeLa (HPV-18) and non-cytotoxic to the non-tumor cell lines HaCat, as well as the oil and NE-OEO were not cytotoxic to the non-tumor cell line RAW 264.7. Açai seed oil induced morphological changes in HeLa and SiHa cells, inducing a reduction in cell viability, inhibiting cell migration and colony formation in cervical cancer cell lines. The annexin V-FITC assay showed cell death by early and late apoptosis at 24 and 48 hours after treatment with açai seed oil. In in vivo experiments, the use of oil at a dose of 100, 200, 300 mg/kg and NE-OEO at a dose of 100 mg/kg were not toxic to the animals, in accordance with the normal patterns seen in the liver and kidney; Furthermore, it did not interfere with the behavior or weight of the animals, however, it induced an immunomodulatory response with a significant increase in IL10 and IL17. Our results suggest the biotechnological potential of the oil and NE-OEO in antitumor activity for cervical cancer, and in the development of colloidal systems for drug delivery. Furthermore, the use of açai seed residue will contribute to both the local economy and sustainable development..

Keywords: Açai Oil. *Euterpe oleracea* Mart. Cervical cancer. Nanoemulsion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1--Distribuição de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. no Brasil.....	21
Figura 2- Características etnobotânicas de <i>Euterpe oleracea</i> Mart	26
Figura 3 - Principais compostos químicos presentes no fruto de <i>E. oleracea</i> Mart.	29
Figura 4 -Diagrama esquemático da nanoemulsão água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) constituída por micelas de surfactante.....	35
Figura 5- Fluxograma do estudo.....	39
Figura 6 - Parque Juçara localizado no bairro Maracanã, São Luís Maranhão-Brasil.....	41
Figura 7-Matéria-prima para obtenção do óleo da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	42
Figura 8 - Observação dos animais do dia 0 ao dia 45.....	56
Figura 9- Cromatograma dos ésteres provenientes dos ácidos graxos do óleo de sementes da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	60
Figura 10 - Caracterização do tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial Zeta da nanoemulsão com óleo de semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	66
Figura 11 - Curva percentual de inibição do radical DPPH e ABTS frente ao óleo e Nanoemulsão de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	69
Figura 12 - Curva percentual de inibição do radical DPPH e ABTS frente a Nanoemulsão do óleo de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	70
Figura 13 - Efeito do óleo de sementes de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. na viabilidade das linhas celulares do cancro do colo do útero.	71
Figura 14 - Avaliação da atividade antitumoral do óleo de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.. em linhagens celulares de adenocarcinoma do colo do útero, utilizando o ensaio de viabilidade MTT. ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. * $p < 0.001$	72
Figura 15 - Avaliação da morte celular induzida pelo óleo de semente de açaí (50ug/mL) em linhagens celulares de cancro do colo do útero (24 e 48h) HeLa e SiHa. * $p < 0,005$, *** $p < 0,001$	74
Figura 16 - Alterações morfológicas induzidas pelo óleo da sementes de <i>E. oleracea</i> nas linhagens celulares SiHa e HeLa.....	78
Figura 17 - -Efeito do óleo de <i>Euterpe oleracea</i> Mart na capacidade clonogênica das linhagens celulares SiHa e HeLa. **** $p < 0,0001$	79
Figura 18 - O óleo de sementes de <i>E. oleracea</i> Mart. regula a invasão e a migração das células do cancro do colo do útero. Análise da migração celular em HeLa e SiHa*** $p < 001$	81
Figura 19 - Efeito do óleo e da nanoemulsão da semente de <i>Euterpe oleracea</i> mart na viabilidade celular de macrófagos.....	83
Figura 20 - Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na variação de peso dos animais no final do tratamento. (a) e na cinética do peso ao longo do tratamento. (b). A análise estatística foi efectuada através de um teste ANOVA de uma via, seguido do teste	

de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$	85
Figura 21 - Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na variação de peso dos animais no final do tratamento. (a) e na cinética do peso ao longo do tratamento. (b). A análise estatística foi efetuada através de um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$	86
Figura 22 - Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na variação de peso dos animais no final do tratamento. A análise estatística foi efectuada utilizando um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$	87
Figura 23 - Secções histológicas do fígado e do rim de Camundongo Swiss fêmeas tratados com óleo de sementes de Euterpe oleracea Mart. Coloração com hematoxilina e eosina (HE).	89
Figura 24 - -. Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A análise estatística foi efetuada utilizando um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação à IFN- γ , com a NE-OEO a induzi-la em ambos os períodos de tratamento, 15 e 45 dias, enquanto o óleo 100mg/kg, 200mg/kg e o óleo 300mg/kg apenas a induziram em 15 dias (figura 25f). A figura 25-g mostra que o óleo 300mg/mL expressou significativamente ($p < 0,05$) o TNF- α após 45 dias de tratamento.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da atividade biológica do extrato e óleo da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. em estudo in vitro e in vivo frente à diferentes tipos de câncer.	28
Tabela 2 - Ésteres provenientes dos ácidos graxos existentes no óleo de sementes da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	58
Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos totais e flavonoides no Óleo e na Nanoemulsão de <i>Euterpe oleracea</i> Mart	59
Tabela 4 - Determinação dos parâmetros físico-químicos do óleo obtido da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	60
Tabela 5 - Misturas de tensioactivos não-iônicos utilizadas para obter os valores de EHL escolhidos.	61
Tabela 6 - . Análise do tamanho das gotículas, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, pH e turbidez das nanoemulsões preparadas com óleo de Açaí após 30 dias de armazenamento.	62
Tabela 7 - Efeito antioxidante equivalente ao Trolox e o EC50 no Óleo e na Nanoemulsão de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. pelo método do DPPH e ABTS.	64
Tabela 8 - Efeito antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) no Óleo e na Nanoemulsão de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. pelo método do DPPH e ABTS.	65
Tabela 9 - Medidas morfológicas das células HeLa e SiHa, após tratamento com óleo da semente de <i>E. oleracea</i> Mart.	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Produtos naturais para fins terapêuticos	20
3.1 Aspectos geográficos e botânicos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	21
3.2 Composição química identificada na <i>Euterpe oleracea</i> Mart..	27
3.3 Propriedade farmacológica da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	30
3.4 Papel da Nanotecnologia na Nanomedicina.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Materiais utilizados	40
4.2 Obtenção e caracterização do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> Mart.....	41
4.1.1 Esterificação do óleo.....	42
4.1.2 Análise do óleo por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)	43
4.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais e flavonóides em óleo de açaí e nanoemulsões à base de óleo de semente de açaí.....	43
4.3 Caracterização físico-química do óleo da semente de <i>E. oleracea</i> Mart.....	44
4.3.1 Determinação da acidez (% ácidos graxos livres).....	44
4.3.2 Umidade e material volátil.....	45
4.3.3 Índice de saponificação.....	45
4.3.4 Índice de refração.....	46
4.3.5 Determinação de resíduo por incineração (cinzas)	46
4.3.6 Densidade.....	47
4.4 Obtenção da nanoemulsão	48
4.4.1 Método de emulsificação	48
4.4.2 Determinação da Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico (EHL).....	48
4.4.3 Avaliação preliminar da estabilidade	49
4.4.4 Caracterização físico-química da nanoemulsão	49
4.5.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7, queratinócitos humano HaCat e células tumorais HeLa e SiHa	51
4.6. Avaliação da morfologia celular em linhagens de câncer cervical.....	52
4.7. Ensaio clonogênico	52
4.8 Ensaio com Anexina – V.....	53
4.9 Ensaio de cicatrização de feridas <i>wound healing</i>	53
4.11 Avaliação da toxicidade do óleo e da nanoemulsão <i>in vivo</i> em camundongos Swiss fêmeas.....	55
4.11.1 Animais e aspectos éticos	55

4.12 Análise estatística.....	58
5 RESULTADOS.....	59
6. DISCUSSÃO.....	92
7 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIA.....	100
ANEXO A.....	110
ANEXO C.....	112
ANEXO D.....	113

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para tratamento de doenças é uma prática ancestral que persiste até os dias atuais, refletindo a confiança contínua na eficácia desses recursos naturais. Uma das razões fundamentais para a eficácia terapêutica das plantas reside na diversidade de compostos químicos encontrados em seus metabólitos secundários. Esses compostos desempenham um papel crucial no desenvolvimento de fármacos e outros bioprodutos, oferecendo uma rica fonte de moléculas com potencial farmacológico para uma ampla gama de doenças (SÁ-FILHO *et al.*, 2021).

Neste cenário, o açaí *Euterpe oleracea* Mart destaca-se como superfruta por apresentar valor nutritivo e medicinal. Estudos mostram suas propriedades medicinais através do extrato e do óleo como atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante, devido uma variedade de compostos bioativos em sua composição química como os polifenóis e ácidos graxos (SILVA *et al.*, 2014; CARVALHO-PEIXOTO *et al.*, 2015, YAMAGUCHI *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2017; DE ALMEIDA MAGALHÃES *et al.*, 2020). Contudo, para melhor direcionar e potencializar esses compostos, têm-se apostado na associação de bioprodutos com a nanotecnologia.

Sabe-se que a nanotecnologia, aliada aos avanços da física e da ciência dos materiais, possibilita e controla a liberação de agentes terapêuticos incorporados em escala nanométrica (MUHAMMAD; WAHEED, 2023). Assim, mantém a concentração do fármaco constante em um período mais prolongado e, utilizando uma única dosagem, reduz efeitos adversos. Além disso, as nanoformulações têm impulsionado a farmacocinética de medicamentos, proporcionando maior solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e direcionamento específico (AZIZ *et al.*, 2019; THI *et al.* 2021).

Diferentes tipos de sistemas coloidais ou nanoformulações integram o campo da nanotecnologia como por exemplo, nanopartículas metálicas, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas, micelas, lipossomas, gel, aerossóis, nanosuspensões e nanoemulsões água em óleo e óleo em água (MAINARDES; DIEDRICH, 2020). Em particular, as nanoemulsões (NEs) possuem várias aplicações biotecnológicas, uma vez que elas canalizam os bioativos para o local alvo por períodos mais longos, melhoram a solubilidade e estabilidade de drogas bioativas. As aplicações variam em vacina, direcionamento de medicamentos proteicos e peptídicos, tópicos, transdérmicos, oftálmicos e incorporação de antineoplásico para terapia anticâncer; além disso, são seguras e não causam irritação (LOUREIRO-

CONTENTE *et al.*, 2020; MOHITE *et al.*, 2023).

O câncer de colo do útero é o sétimo tipo que mais afeta mulheres mundialmente (WHO, 2023). No Brasil, representa sexto tumor mais frequente nessa população (INCA, 2022), sendo o Papilomavírus Humano (HPV) o principal fator etiológico do câncer do colo uterino e também é o patógeno viral sexual mais comum (YIN *et al.*, 2017).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que, no Brasil, em 2023, surgiram 73.610 novos casos de câncer de mama, 71.230 novos casos de câncer de próstata e 17.010 novos casos de câncer de colo do útero, demonstrando a prevalência desses tipos de câncer (INCA, 2022). No Maranhão, os mais prevalentes em 2023, segundo a estimativa do INCA (2022), foram os já citados, sendo que 1.060 casos para câncer de mama, 2.000 novos casos para o câncer de próstata e 800 novos casos de câncer de colo do útero.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico do óleo extraído da semente de *Euterpe oleracea* Mart., visando o desenvolvimento de nanoemulsão óleo em água, caracterização físico-química e atividade biológica através de ensaios *in vitro* e *in vivo* para determinar o perfil de segurança do óleo e da sua nanoemulsão. Para tal, os ensaios *in vitro* foram conduzidos em linhagens celulares de queratinócitos humanos HaCat (ATCC PCS-200-011), em macrófago de camundongo *Mus musculus* Raw (ATCC 264.7; BCRJ 0212), e em células tumorais derivados de câncer cervical HeLa (ATCC CCL-2; BCRJ 0100) e SiHa (ATCC HTB-35BSL); além disso, avaliou-se a toxicidade *in vivo* em camundongos fêmea Swiss. É importante ressaltar que o óleo foi escolhido como bioproduto extraído da semente (caroço), visando o uso sustentável das sementes que são descartadas como resíduo para o meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico do óleo da semente de *Euterpe oleracea* Mart *in vitro* e *in vivo* e da sua nanoemulsão.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Extrair o óleo da semente de *E. oleracea* Mart.;
- ✓ Identificar os compostos químicos do óleo da semente de *E. oleracea* Mart.;
- ✓ Realizar a caracterização físico-química do óleo da semente de *E. oleracea* Mart.;
- ✓ Preparar e caracterizar a nanoemulsão obtida com o óleo de *E. oleracea* Mart.;
- ✓ Realizar testes laboratoriais *in vitro* para determinar a capacidade antioxidante do óleo de *Euterpe oleracea* Mart e da nanoemulsão.
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico do óleo, nanoemulsão com óleo (NECO), nanoemulsão sem óleo (NESCO) em linhagens de macrófagos RAW264.7;
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral do óleo em linhagens celulares de adenocarcinoma uterino HeLa e SiHa;
- ✓ Realizar experimentos *in vivo* em modelos animais para avaliar a toxicidade e a produção de citocinas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produtos naturais para fins terapêuticos

A Organização mundial de saúde (OMS) defende a importância das plantas medicinais e seu uso pela população desde 1970. Esse marco representou o compromisso inicial da OMS em reconhecer e respeitar o papel vital da medicina tradicional na saúde global. Desde então, essa abordagem colaborativa tem continuado a evoluir sobretudo com a OMS liderando esforços para promover práticas de medicina tradicional seguras, eficazes e culturalmente sensíveis em todo o mundo. Essa colaboração tem sido fundamental para garantir que as terapias tradicionais sejam devidamente reconhecidas, regulamentadas e integradas aos sistemas de saúde modernos, visando proporcionar cuidados abrangentes e acessíveis para todas as comunidades (BURKI, 2023; WHO, 2023).

Os produtos naturais, oriundo de plantas medicinais, têm sido usados, ao longo da história da humanidade, como uma fonte valiosa de tratamento e cura para uma variedade de doenças e condições de saúde. Essas plantas contêm uma ampla gama de compostos bioativos que oferecem benefícios terapêuticos diversos, através de compostos ativos como alcaloides, flavonoides, terpenos e ácidos fenólicos, que podem ter efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e até mesmo anticancerígenos (TEIXEIRA *et al.*, 2023).

Além do mais, esses compostos exibem especificidade como agentes quimiopreventivos, não tem efeito citotóxicos em células não tumorais, possuem boa biodisponibilidade, vários mecanismos de ação, fácil administração e tem atividade anticancerígena. Além disso, atuam no processo carcinogênico diretamente no alvo inibindo a proliferação de células malignas, devido sua capacidade moduladora, supressora de agentes tumorigênicos e vigilância imunológica (CARVALHO-PEIXOTO *et al.*, 2015).

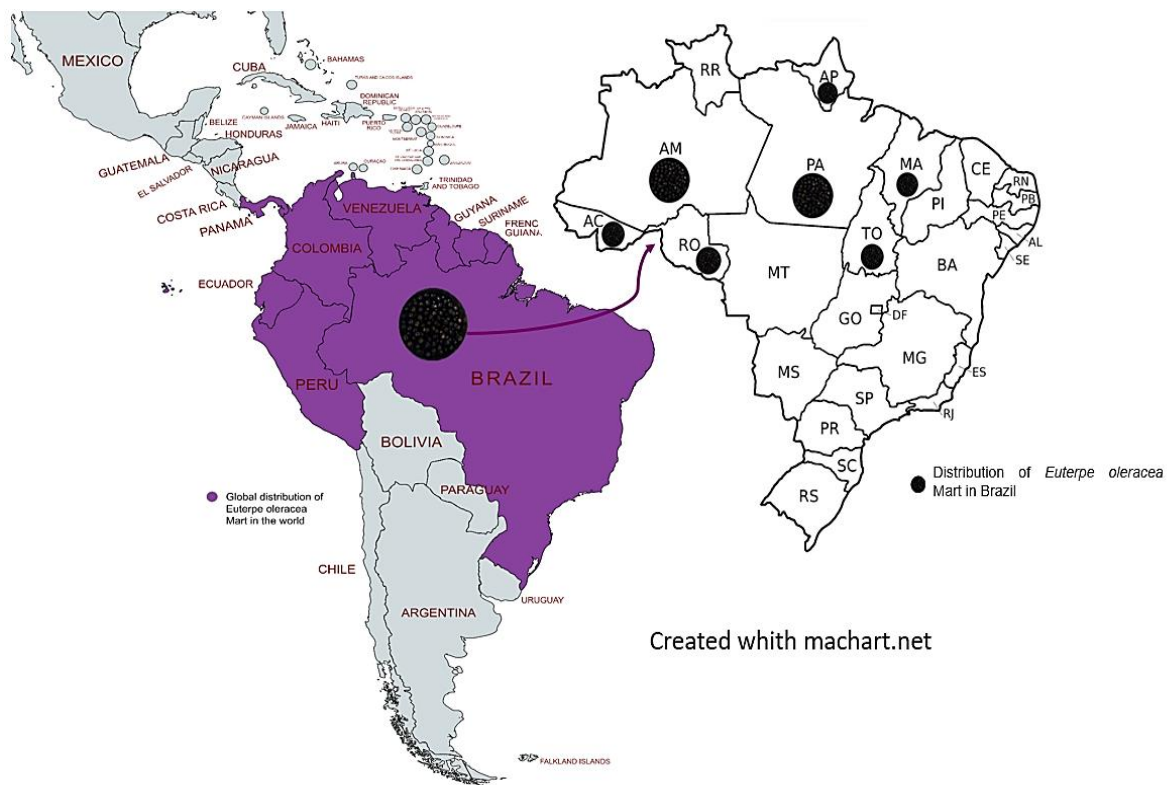
O Brasil é um país rico em biodiversidade, abrigando uma variedade de ecossistemas e biomas; cada um com sua própria flora e fauna distintas. Entre esses biomas, destacam-se a Floresta Amazônica com milhares de espécies de plantas que têm sido usadas há séculos pelas populações indígenas para tratar uma variedade de

condições de saúde. Entre as plantas encontradas na Amazônia, está o açaí (*Euterpe oleracea*), valorizado por seu alto teor de antioxidantes e seus potenciais benefícios para a saúde cardiovascular (ALESSANDRA-PERINI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020).

3.1 Aspectos geográficos e botânicos de *Euterpe oleracea* Mart.

Euterpe oleracea Mart. é popularmente conhecida como açaí (Figura 1), nativa em vários países da América Central, como Panamá, e em diversas regiões da América do Sul, incluindo Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname, Guianas, Peru e Trinidad e Tobago. No Brasil, essa espécie está presente em estados como Amazonas, Amapá, Pará, Maranhão, Rondônia, Acre e Tocantins, sendo os estados do Amazonas, Pará e Maranhão os principais produtores de açaí (YAMAGUCHI *et al.*, 2015; FLORA DO BRASIL, 2017; VIANNA, 2020).

Figura 1--Distribuição de *Euterpe oleracea* Mart. no Brasil



Fonte: Autoria Própria Adaptado de dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (2023).

Os caracteres taxonômicos que a definem a *Euterpe oleracea* Mart, mostram: Reino Plantae, na Divisão Magnoliophyta (Angiospermae), na Classe Liliopsida (Monocotylenae), na Subclasse Arecidae (caracterizada por plantas terrestres, arborescentes ou arbustivas, com folhas alternas concentradas na base ou em coroa terminal, e flores pequenas reunidas em espádice com espata evidente), na Ordem Arecales (Palmeirae), na Família Arecaceae (Palmae) e na Subfamília Arecoidae (flores trímeras). *Euterpe oleracea* Mart. é o nome do gênero e da espécie, respectivamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O epíteto genérico "Euterpe" é uma homenagem à deusa da mitologia grega, simbolizando a "elegância da floresta", em referência à beleza da planta. Enquanto isso, o nome específico "Oleracea" denota a semelhança ou o odor exalado pela planta, remanescente ao do vinho, especialmente durante a fermentação, devido à cor e ao aroma da polpa. Por fim, o termo "Açaí" ou "Ysaí" tem origem tupi, significando "fruta que chora", em alusão ao líquido que sai da fruta quando é espremida, sendo descrita como um coquinho amarronzado que cresce em cachos nas palmeiras do açazeiro que, por sua vez, possui um tronco alto e folhas finas e é conhecido por produzir palmito (FURLANETO; SOARES; FURLANETO, 2020).

O açazeiro apresenta-se como uma palmeira cespitosa, caracterizada por possuir vários troncos finos que se agrupam formando uma touceira. Seus estipes variam em tamanho e largura, podendo atingir de 3 a 20 metros de altura e de 7 a 8 cm de diâmetro. As folhas são compostas e pinadas, dispostas em arranjos que compreendem de 40 a 80 pares de folíolos (Figura 2 – A e B) (NASCIMENTO 2008).

As palmeiras de *E. oleracea* possuem caules cilíndricos e anelados, frequentemente formam nós e internódios ao longo do caule do açaí (HERBÁRIO BARBOSA RODRIGUES 1949) (Figura 2 – A e B) que podem atingir 30 m de altura e 18 cm de diâmetro. Amadurecem em um padrão multicaule e podem alcançar até 45 hastes na fase adulta durante seu desenvolvimento. Na base de cada estipe, raízes avermelhadas (Figura 2 – C), densas, superficiais e fasciculadas com aerênquimas e lenticelas criam uma rede agregada de 30 a 40 cm acima do solo (CHANG *et al.*, 2019).

Os eventos de floração e inflorescência ocorrem ao longo de todas as estações do ano, com o pico mais significativo durante a estação chuvosa (Figura 2 – D e E). A inflorescência, que é o conjunto de flores em um ramo, forma-se em cachos, contendo flores estaminadas com pistilos organizados em tríades e com flores femininas próximas das masculinas. A maturação das flores - conhecida como antese - ocorre

durante o período diurno, levando em média de 10 a 14 dias para as flores masculinas e de 3 a 5 dias para as flores femininas para alcançarem a plena maturação (CAMPELL 2018; DE OLIVEIRA 2018).

O fruto de *Euterpe oleracea* Mart é uma baga, globosa, fibrosa e polpa oleaginosa e comestível contendo apenas uma semente, organizada em cachos que podem conter centenas de frutos individuais (Figura 2 – F e G). Seu diâmetro varia entre 1cm e 2cm, com um peso médio de cerca de 1,5g. Apresenta um epicarpo roxo - que é a camada externam -, um mesocarpo polposo de aproximadamente 1mm de espessura, revestindo um endocarpo duro que contém em seu interior uma semente com embrião pequeno e endosperma. A semente de *Euterpe oleracea* Mart constitui cerca de 87% do fruto e é composta por epicarpo, mesocarpo e endosperma. É rica em celulose (53,20%), hemicelulose (12,26%), lignina (2,30%), polifenóis totais e taninos, além de possuir teores significativos de fibra (entre 29,69% e 62,75%) e lipídio (entre 1,6% e 3,56%) (DE SOUSA *et al.*, 2021).

A presença de *Euterpe oleracea* Mart. nas áreas de várzeas desempenha um papel crucial na contenção e drenagem da água. As várzeas são terrenos naturalmente inundáveis, e a vegetação, presente nessas áreas, auxilia na absorção da água e no controle da velocidade de escoamento dos rios durante os períodos chuvosos. Devido a essa característica, o delta do rio Amazonas se destaca como o berço do açaizeiro, onde as chuvas são abundantes e bem distribuídas ao longo do ano (TAVARES, *et al.*, 2020).

O açaizeiro é frequentemente encontrado em solos tanto eutróficos (de alta fertilidade) quanto distróficos (de baixa fertilidade). É especialmente prevalente em solos Gleissolos, que são naturalmente férteis devido à deposição de sedimentos pelas marés. No entanto, também pode crescer em áreas de terra firme em ambientes com latossolos amarelos, que se desenvolvem a partir de materiais argilosos ou areno-argilosos sedimentares da formação Barreiras. Quanto ao pico de florescimento, este ocorre geralmente de janeiro a maio; enquanto o período de frutificação vai de agosto a dezembro, embora essas datas possam variar dependendo do local e do tipo de solo (DE SOUSA, *et al.*, 2024).

As interações ecológicas entre *Euterpe oleracea* Mart. e seus polinizadores são diversificadas e desempenham um papel fundamental na disseminação e manutenção

das plantas, bem como no sucesso reprodutivo e na dispersão de sementes, contribuindo para a saúde do ecossistema. Dentre as espécies de polinizadores e visitantes florais que se destacam estão os pássaros, macacos, veados, antas, caititus, cutias, além de insetos como besouros, moscas, borboletas, mariposas e abelhas. Essa ampla gama de animais que interagem com o açaizeiro evidencia a importância da sua presença na sustentação da biodiversidade e na funcionalidade do ecossistema. (CAMPELL 2020).

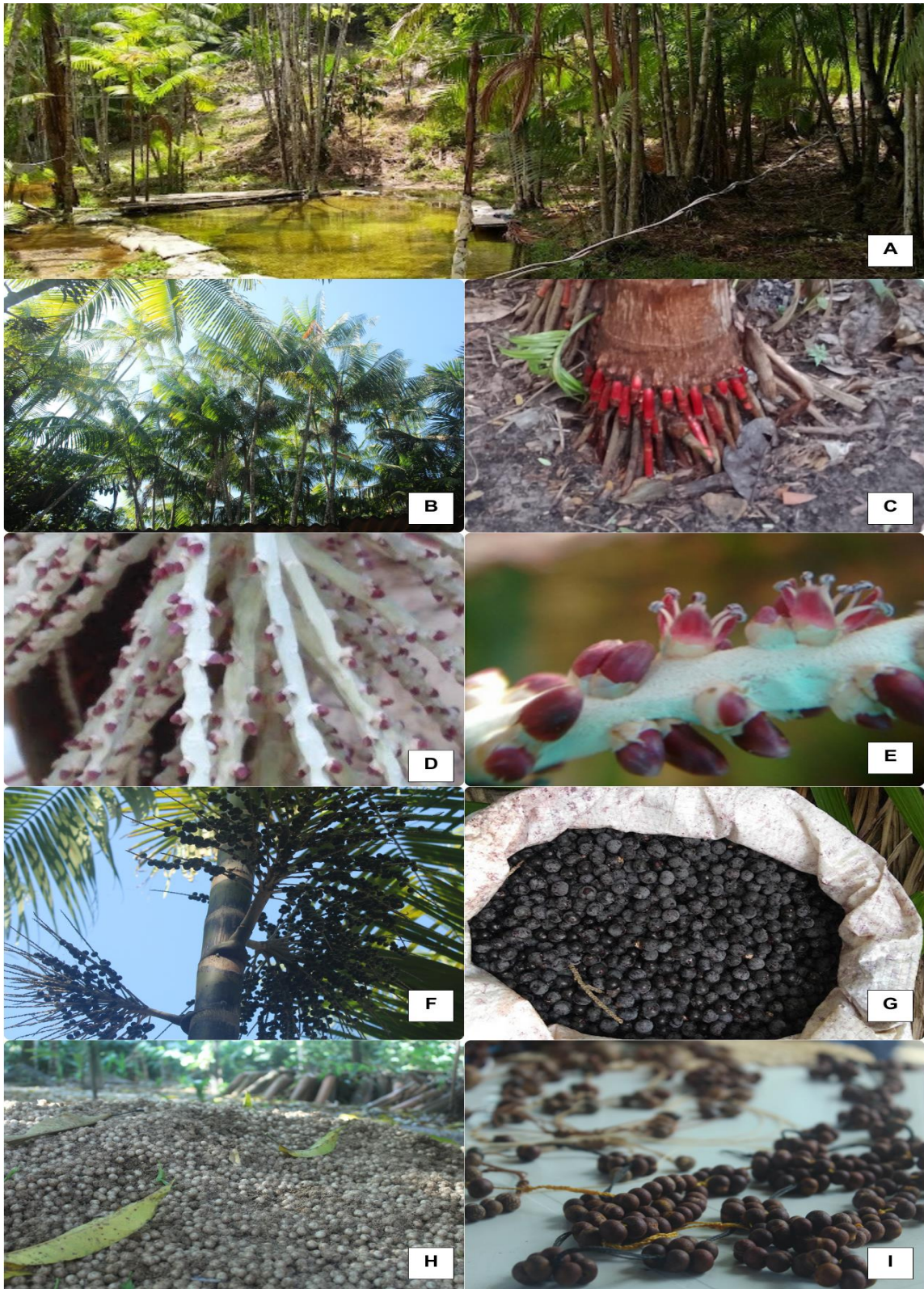
Popularmente, *E. oleracea* Mart é conhecida por uma variedade de nomes na região Norte, a saber: açaí, açaí-comum, açaí-de-planta, açaí-de-touceira, açaí-do-baixo-amazonas, açaí-do-pará, açaizeiro, juçara, juçara-de-touceira, palmitero, palmito-açaí e uaçaí. É importante notar que na região nordeste, especificamente no Maranhão, essa planta é conhecida como juçara; no entanto, é necessário ressaltar que o açaí e a juçara são espécies diferentes. Enquanto o açaí refere-se à palmeira *Euterpe oleracea* Mart, a juçara refere-se à palmeira *Euterpe edulis*. Embora ambas desenvolvam frutos semelhantes em tamanho e cor, diferem em características dos troncos, distribuição geográfica e padrões de consumo. A palmeira do açaí (*E. oleracea* Mart) é caracterizada por ser perfilhada, sendo extraído dela o óleo. Por outro lado, a juçara (*E. edulis*) é predominante no cerrado, na Mata Atlântica do sul da Bahia e no Rio Grande do Sul, sendo reconhecida como melhor produtora de palmito. (CARVALHO; ESMERINO; CARVALHO, 2022).

O uso tradicional do açaí na culinária brasileira, é significativa. A polpa é amplamente utilizada no preparo de creme, licor, geleia, mingau, sorvete, doces, picolé, cocada, suco, brigadeiro, bebidas e corantes. Além disso, suas múltiplas utilidades se estendem ao uso do caule e das folhas na construção de casas e na alimentação animal. Na medicina popular, a raiz é utilizada para preparar chás que auxiliam no combate à parasitoses. Essa versatilidade de aplicações evidencia a importância cultural, econômica e medicinal do açaí na sociedade brasileira (MAIA, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2021).

Contudo, o consumo da polpa do açaí resulta em resíduos sólidos, como os caroços ou sementes, que correspondem a aproximadamente 85% do fruto. Apesar disso, estudos têm demonstrado o potencial desses resíduos para contribuir com o desenvolvimento sustentável. Eles podem ser aproveitados como importante matéria-

prima para a produção de uma variedade de produtos, incluindo biojoias, como brincos, colares e pulseiras, bem como artigos de utilidade, como tapetes e bolsas (Figura 2 – H e I). Além disso, esses resíduos podem ser utilizados na produção de carvão vegetal, adubo orgânico, móveis, compensados, massa alimentícia e até mesmo na torrefação de café, além de serem uma fonte potencial para a produção de biocombustíveis. Essa diversidade de aplicações ressalta a importância de se explorar os resíduos do açaí de forma sustentável, contribuindo para a redução do desperdício e para a geração de renda e benefícios ambientais (SANTOS; NORONHA; SARAIVA, 2019; MENDES *et al.*, 2020; BARROS *et al.*, 2021; DE SOUSA *et al.*, 2021).

Figura 2- Características etnobotânicas de *Euterpe oleracea* Mart



A) Açaí na margem de um riachoa. B) folhas das palmeiras. C) Raiz. D e E) Florecência das flores. F e G) Fruto no cacho e coletado. H) Carvão após despolpamento da Jura. I) Artesanato feito com o carvão da Juçara.

Fonte: Autoria Própria

3.2 Composição química identificada na *Euterpe oleracea* Mart..

A análise dos componentes do fruto (Figura 3) - polpa e semente do açaí, revela uma riqueza de compostos com propriedades benéficas para a saúde. Dentre os principais compostos presentes, destacam-se os ácidos fenólicos, as antocianinas, as proantocianidinas e as ligninas. As antocianinas, como a cianidina-3-orutinosida e a cianidina-3-O-glucoside, conferem ao açaí sua intensa coloração roxa e são reconhecidas por suas propriedades antioxidantes. Além disso, as ligninas, presentes no açaí, como: ariltetrahidronaftaleno, dihidrobenzofurano, furofurano e 8-O-4-neolignano, são conhecidas por seus potenciais benefícios para a saúde cardiovascular e prevenção de doenças crônicas. Outros compostos importantes incluem epicatequina, catequina, homoorientina, orientina, isovitexina e taxifolino desoxihexose, que contribuem para as propriedades nutricionais e antioxidantes do açaí (PACHECO-PALENCIA *et al*, 2008; KANG *et al*, 2011; HOLDERNESS *et al*, 2011; GORDON *et al*, 2012; MULABAGAL; KELLER; CALDERON, 2012; MOURA *et al*, 2012; LASLO *et al.*, 2013; GIRONES-VILAPLANA *et al*, 2014).

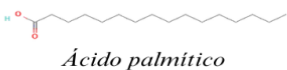
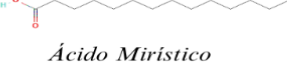
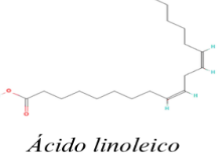
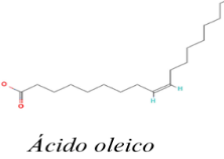
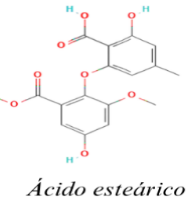
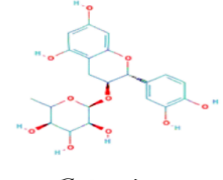
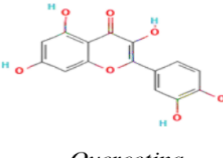
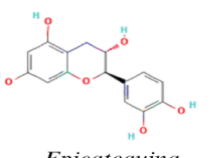
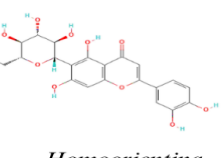
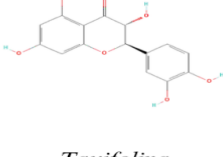
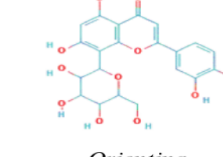
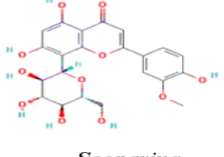
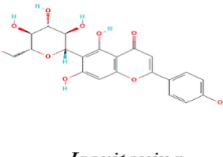
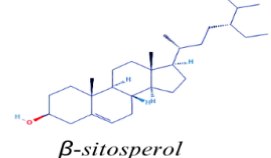
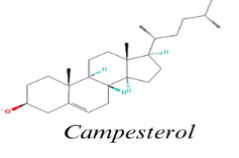
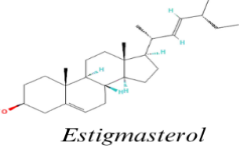
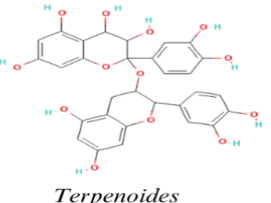
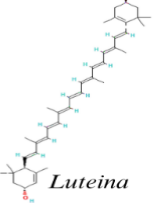
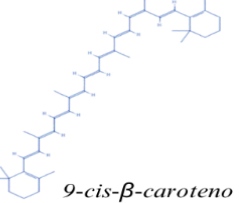
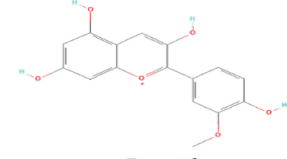
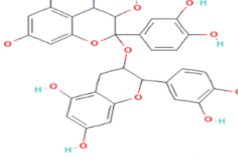
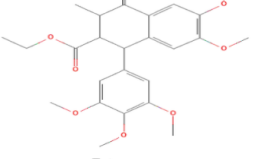
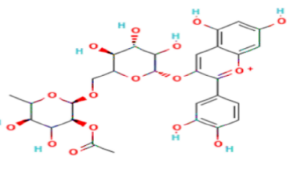
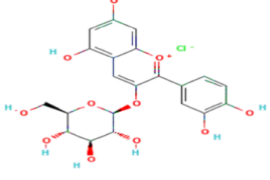
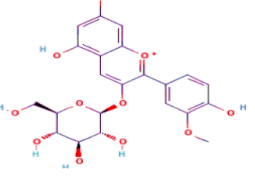
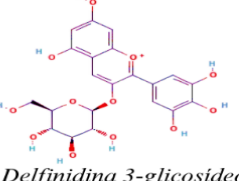
O óleo extraído da polpa e da semente de *Euterpe oleracea* Mart. tem aspecto verde-oliva e sua composição é rica em ácido graxo. Sendo uma fonte significativa de ácidos graxos insaturados essenciais para a saúde humana. Além disso, é rico em fitoesteróis, incluindo β -sitosperol, estigmasterol e campesterol, que são compostos vegetais conhecidos por seus potenciais benefícios para a saúde, como a redução do colesterol e propriedades anti-inflamatórias (FAVACHO *et al.*, 2011; BERNAUD; FUCCHAL, 2011; FERREIRA; ROGEZ; HERMAN, 2018; LIRA *et al.*, 2021; CASTRO 2022).

Somado a isso, os compostos presentes no óleo da polpa e da semente de *E. oleracea* Mart. desempenham um papel crucial no metabolismo celular, na redução de processos inflamatórios e na atividade regenerativa do organismo. Estudos conduzidos por Almeida Magalhães *et al.* (2020) e Moura *et al.* (2020) destacam esses benefícios, enfatizando a importância dos ácidos graxos insaturados e fitoesteróis presentes no óleo. O óleo é composto por 73,9% de ácidos graxos insaturados, dos quais 56,2% correspondem ao ácido oleico, 11,5% ao ácido linoleico e 0,8% ao ácido linolênico. Os ácidos graxos saturados representam os 27,5% restantes, sendo o ácido palmítico responsável por 24,1% e o esteárico por 1,6% da composição total

(MARQUES *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2020).

O ácido linoleico, um ácido graxo essencial, desempenha um papel vital na saúde humana, pois não pode ser sintetizado pelo organismo e deve ser obtido através da alimentação. Este ácido é predominante em alimentos e representa cerca de 50% do conteúdo lipídico presente em vegetais, especialmente em sementes. Os mamíferos são incapazes de sintetizar o ácido linoleico, tornando sua ingestão por meio da dieta essencial para a manutenção da saúde. Por outro lado, o ácido oleico, também conhecido como ômega 9, é reconhecido por sua participação no metabolismo e na síntese hormonal. Estudos realizados por Maragoni *et al* (2020) e Mazzocchi *et al* (2019) destacam a importância do ácido oleico na prevenção de inflamações, doenças coronarianas, artrite reumatoide e câncer.

Figura 3 - Principais compostos químicos presentes no fruto de *E. oleracea* Mart..

Ácidos graxos	 <i>Ácido palmítico</i>  <i>Ácido Mirístico</i>  <i>Ácido linoleico</i>  <i>Ácido oleico</i>  <i>Ácido esteárico</i>			
Flavonóides	 <i>Catequina</i>  <i>Quercetina</i>  <i>Epicatequina</i>  <i>Homoorientina</i>  <i>Taxifolina</i>  <i>Orientina</i>  <i>Scoparina</i>  <i>Isovitexina</i>			
Fitoesteróis	 <i>β-sitosperol</i>  <i>Campesterol</i>  <i>Estigmasterol</i>			
Carotenóides	 <i>Terpenoides</i>  <i>Luteína</i>  <i>9-cis-β-caroteno</i>			
Fenólicos	 <i>Peonidina</i>  <i>Proantocianidinas</i>  <i>Lignanais</i>			
Antocianinas	 <i>Cianidina-3-orutinosida</i>  <i>Cianidina-3-O-glucoside</i>  <i>Peonidina-3-glicosídeo</i>  <i>Pelargonidina 3-glicosídeo</i>  <i>Delfinidina 3-glicosídeo</i>			

Fonte: Autoria própria. Adaptado de Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (2023).

3.3 Propriedade farmacológica da *Euterpe oleracea* Mart.

Euterpe oleracea Mart. tem sido amplamente estudada devido às suas diversas propriedades farmacológicas comprovadas na literatura científica. Entre essas propriedades, destacam-se sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva, anticancerígena, antiaterogênica e cicatrizante. Além disso, estudos indicam que o açaí possui propriedades protetoras contra síndromes metabólicas, tais como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia, bem como proteção aos órgãos vitais, incluindo pulmão, rim, fígado, coração e sistema nervoso (DE ALMEIDA MAGALHÃES *et al.*, 2020).

Recentemente, uma série de estudos destacaram a eficácia do extrato e do óleo de *E. oleracea* Mart. em uma ampla gama de condições de saúde, conduzindo ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TABELA 1). Romão *et al.* (2020) investigaram o efeito do extrato de *E. oleracea* em alterações metabólicas e hepáticas, enquanto Tavares *et al.* (2020) estudaram seu potencial no tratamento do colesterol. Xavier *et al.* (2021) exploraram o efeito anti-inflamatório e imunomodulador do extrato, enquanto Vilhena *et al.* (2021) examinaram seu impacto no tratamento de lesões cardiovasculares.

Do mesmo modo, estudos como os de Da Silva *et al.* (2021) e de Moraes Arnoso *et al.* (2022) investigaram o potencial do extrato de *E. oleracea* no tratamento do câncer de mama e no efeito remodelador cardiovascular, respectivamente. Outros estudos, como o de D'Amico *et al.* (2022) e Filho *et al.* (2023), examinaram seu papel neuroprotetor e seu efeito antitumoral no câncer de próstata.

Quanto ao óleo de *E. oleracea*, estudos como o de Almeida Magalhães *et al.* (2020) demonstraram seu efeito antibacteriano contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Moureo *et al.* (2020) investigaram seu potencial regenerador testicular frente à intoxicação por cádmio em camundongos Swiss. E Lira *et al.* (2022) exploraram o efeito antitumoral do óleo em linhagens celulares SK19 de melanoma, AGP01 de adenocarcinoma e linhagem celular Vero.

Tabela 1 - Descrição da atividade biológica do extrato e óleo da semente de *Euterpe oleracea* Mart. em estudo in vitro e in vivo frente à diferentes tipos de câncer.

Semente	Ensaio (in vitro / in vivo)	Dose	Objetivo	Resultados	Referencias
Extrato	Camundongos machos da linhagem C57BL	300 mg/kg	Avaliar e comparar os efeitos do tratamento com ASE e o inibidor da ECA , ENA sobre as alterações metabólicas e hepáticas em modelo experimental de obesidade induzida por dieta	Inibiu o ganho de peso corporal, esteatose hepática massas adiposa e hepática e estresse oxidativo.	Romão <i>et al.</i> , (2020)
Extrato	Camundongos machos C57/BL/6	ASE (300 mg/kg por dia) ou rosuvastatina (20 mg/kg por dia)	Avaliar o efeito terapêutico da ASE em comparação com a rosuvastatina na DHGNA induzida por alto teor de gordura em camundongos machos C57BL/6	Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir o ganho de peso dos animais após 4 semanas de tratamento.	Tavares <i>et al</i> (2020)
Extrato	Linhagens celulares RAW 264.7 estimuladas por LPS e edema de membro em Camundongos BALB/c fêmeas	125, 250 e 500 µg/mL / 250, 500 ou 1000 mg/kg	Avaliar efeito inibitório do extrato de açaí em linhagens celulares RAW 264.7 estimuladas por LPS e edema de membro induzido por carragenina.	Não foi tóxico para as linhagens celulares testadas e foi capaz de inibir o edema evidenciando seu efeito anti-inflamatório.	Xavier <i>et al.</i> , (2021)
Extrato	Ratos machos jovens (Wistar)	ASE (200 mg/kg/d) ou enalapril (30 mg/kg/d)	Determinar se o extrato de semente de açaí (ASE) poderia reverter lesões cardiovasculares e renais pré-existent em um modelo experimental de hipertensão renovascular (2 rins, 1 clipe, 2R1C)	ASE reduziu substancialmente o remodelamento cardiovascular e recuperou a disfunção endotelial em ratos 2R1C	Vilhena <i>et al</i> (2021)
Extrato	MCF-7,	10 e 15 µg/mL	Avaliar a composição química e os efeitos citotóxicos do extrato de semente de açaí na linha celular de câncer de mama (MCF-7)	Teve efeito citotóxicos contra MCF-7, induziu alterações morfológicas na linhagem celular por autofagia e aumentou a via de produção de ROS	Silva <i>et al.</i> , (2021)

Extrato	Camundongos machos C57BL/6	ASE (300 mg/kg/dia) e rosuvastatina (20 mg/kg/dia)	Investigar o efeito terapêutico do ASE na remodelação cardiovascular associada à obesidade e compará-lo com o da rosuvastatina	Melhorou o perfil lipídico e a remodelação cardiovascular. O efeito terapêutico do ASE foi semelhante ao da rosuvastatina na redução da dislipidemia e remodelamento cardiovascular, mas foi superior na redução do dano oxidativo e da hiperglicemia, sugerindo que o ASE era um produto natural promissor para o tratamento de alterações cardiovasculares associadas à obesidade.	de Moraes Arnoso <i>et al</i> (2022)
Extrato	linha celular de câncer de mama MCF-7	25 µg/ml por 24 h	Avaliar as alterações ultraestruturais induzidas pelo extrato da semente de açaí em linhagens celulares de câncer de mama MCF-7	Induziu a autofagia por extrato da semente de açaí em linhagens celulares de câncer mama MCF-F	Da Silva <i>et al.</i> , (2022)
Extrato	Camundongos C57/BL6	500 mg/kg	Analisar uma nova estratégia de neuroproteção com foco na nutrição, por meio da suplementação com Açaí em modelos experimentais de DP	Reduziu consideravelmente os sintomas motores e não motores e a morte celular neuronal do trato dopaminérgico induzida por 4 injeções de 1-metil-4-fenil-1,2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	D'Amico <i>et al</i> (2022)
Extrato	Linhagens de câncer próstata - LNCaP e In vivo (colocar o animal	400 mg/kg	Estudar os efeitos antitumorais de um extrato hidroalcoólico de sementes de açaí in vitro contra células FGC clone LNCaP de câncer de próstata e in vivo usando o modelo de tumor de Ehrlich em camundongos, que está associado a forte inflamação crônica	Reduziu o tumor de Erlich e as doses mais altas reduziram a IL-6 e induziram o IFN-γ, sugerindo efeitos antitumorais e imunomoduladores.	Filho <i>et al</i> (2023)
Extrato	Camundongo Swiss fêmea	1000 mg/kg	Analisar o tratamento preventivo, em modelo <i>in vivo</i> , em tumor de Erlich	O extrato da semente de <i>E. oleracea</i> reduziu o volume tumoral e o peso do tumor, manteve o peso dos animais tratados e induziu, aumento TNF-α e aumento da área de de necrose tumoral quando comparado o controle	Da Silva <i>et al</i> (2023)

Óleo	A atividade antibacteriana contra <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i> .	(AMP 1024 µg/mL), Piperacilina + Tazobactam (PIP 28,5 µg/mL + TAZ 3,5 µg/mL), Ciprofloxacina (CIP 4 µg/mL), PIP + TAZ Vancomicina (VAN 16 µg/mL), CIP 4 µg/mL	Desenvolver complexos de inclusão de óleo de <i>E. oleracea</i> Mart com β-ciclodextrina e hidroxipropil-β-ciclodextrina preparados por amassamento e suspensão, a fim de melhorar as propriedades físico-químicas, solubilidade, estabilidade e atividade antimicrobiana do óleo	Os valores de MIC revelaram maior atividade antibacteriana dos complexos em comparação com o óleo isolado. A resposta modulatória de EOO e EOO-β-CD preparados por KND, bem como de EOO-β-CD e EOO-HP-β-CD preparados por SL mostraram um efeito sinérgico com ampicilina contra <i>E. coli</i> , enquanto que não foi significativo com as demais drogas testadas, mantendo a resposta biológica dos antibióticos	Da Almeida Magalhães <i>et al</i> (2020)
Óleo	Camundongos Swiss machos adultos	50, 100 e 150 mg/kg	Analisar o efeito regenerador do óleo em camundongos Swiss submetidos à intoxicação com Cádimo	O óleo de <i>E. oleracea</i> apresentou efeito regenerativo no parênquima testicular afetado negativamente pelo Cádimo	Mouro <i>et al.</i> , (2020)
Óleo	SK19 (melanoma), AGP01 (adenocarcinoma gástrico) e VERO (linhagem não neoplásica)	75 µg, 80 µg e 73 µg respectivamente	Avaliar a atividade citotóxica do óleo de OE em linhagens neoplásicas	Melhorou atividade citotóxica em GC	Lira <i>et al.</i> , (2022)

3.4 Papel da Nanotecnologia na Nanomedicina

A nanotecnologia resultou da necessidade de miniaturização e manipulação de materiais em escala atômica, aliada aos avanços da física e da ciência dos materiais e tem revolucionado diversas indústrias globalmente. Conceitos fundamentais introduzidos por Feynman, vencedor do Prêmio Nobel, abriram caminho para a fabricação de produtos em nanoescala, com dimensões entre 10-1000 nanômetros, correspondendo a um bilionésimo de metro (CLEBSCH; WATANABE, 2017; MUHAMMAD; WAHEED, 2023).

Essa abordagem moderna desencadeou o desenvolvimento de técnicas científicas avançadas, visando aprimorar a produtividade e aplicabilidade na área da nanomedicina que, em 1960, revolucionou o tratamento de inúmeras doenças. Nesse contexto, as formulações - em nanomedicina - comercializadas foram aprovadas para o tratamento de câncer, terapias de reposição de ferro, anestésicos, tratamentos fúngicos, degeneração muscular, e para o tratamento de doenças genéticas raras (ANSELMO; MITRAGOTI 2019; AZIZ *et al*, 2019; THI *et al*. 2021).

Dentre a variedade de aplicações da nanotecnologia, Shreya *et al.*, 2022 destaca sua importância na aplicação no diagnóstico por imagens do câncer e doenças infecciosas; imunização e produção de vacinas; aplicações terapêuticas para tratamento de doenças infecciosas e não infecciosas; terapia com células-tronco, diagnóstico ortopédico e transplante e tratamento de câncer.

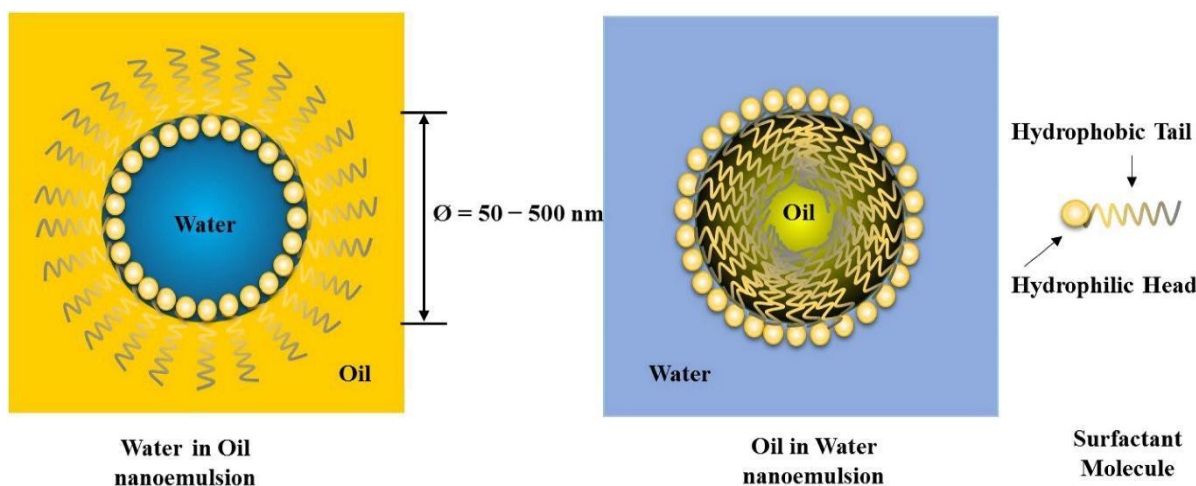
Heinz *et al.*, (2017) mostra que o potencial terapêutico nanopartículas poliméricas depende geralmente do seu tamanho, forma e química da superfície e do controle sobre o tamanho e a forma das nanopartículas poliméricas que pode ajudar a melhorar o seu desempenho em aplicações específicas.

As vantagens das nanoemulsões em relação às macroemulsões ou às emulsões grosseiras incluem uma maior área de superfície e energia livre, sem problemas como a formação de cremes, a floculação, a coalescência e a sedimentação inerentes às macroemulsões (LIRA *et al.*, 202).

3.4.1 As nanoemulsões e aplicações na saúde

As NEs são sistemas coloidais, termodinamicamente instáveis, mas cineticamente estáveis por longo tempo. Dispersos em escala nanométrica, em que a parte oleosa é dispersa em fase aquosa contínua e adsorvido por determinado surfactante (Figura 4) (SOLANS e SOLÉ, 2012). As gotículas oleosas podem variar entre 50 a 1000 nm de diâmetro, são transparentes ou translúcidas e estáveis contra a sedimentação. Neste sentido, de acordo com o diâmetro da gota, as nanoemulsões são conhecidas também em miniemulsão, emulsão submícron e emulsão ultrafina com o tamanho de gota variado entre 50 a 500 nm (MUSTAFA;HUSSEIN, 2020; DA SILVA *et al.*, 2023).

Figura 4 -Diagrama esquemático da nanoemulsão água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) constituída por micelas de surfactante



Adaptado de Marzuki, Wahab, Hamid (2019)

Quanto à composição, uma nanoemulsão consiste em fase orgânica, incluindo compostos oleosos e solventes apolares; fase aquosa à base de água e emulsionantes (ANARJAN *et al.* 2015) e sua organização pode ser óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) e bicontínua (fase oleosa e aquosa é separada por surfactante) dispostos em duas fases imiscíveis onde a fase oleosa ou orgânica e aquosa constitui um sistema nanoemulsionado, na qual o surfactante induz a tensão interfacial separando estas fases (MUSTAFA;HUSSEIN, 2020).

A formação de um sistema nanoemulsionado requer duas condições

essenciais: agitação constante - que permite a dispersão dos líquidos; e presença de um agente emulsificante - que promove a estabilização, bem como a interação entre óleo e água, para reduzir a tensão interfacial e evitar a coalescência das gotas. Também, é necessário uma fonte de energia através de dispositivos mecânicos como homogeneizadores de alta-pressão ou ultrassom. Nesse processo, os homogeneizadores funcionam com uma bomba, ou seja, o líquido é injetado sob pressão em uma válvula homogeneizadora, e o ultrassom promove o direcionamento do fluido para uma lâmina vibratória, onde ondas ultrassônicas produzem o efeito de corte e forma gotículas de tamanho reduzido (WILSON *et al.*, 2022).

Para um melhor resultado das nanoformulações, além dos tensoativos e da fase aquosa (geralmente água destilada, pura ou Milli-Q e Solução tampão), são incluídos nas formulações óleos essenciais (OEs), extratos alcoólicos de vegetais, óleos vegetais - como o de açaí, nanopartículas metálicas, fármacos convencionais, entre outros (PORTO *et al.*, 2020; KAN *et al.* 2022; MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023)

De acordo com Povani *et al.*, (2020), as nanoemulsões têm um nível de energia livre mais alto, em comparação com as fases separadas de água e óleo, tornando sua formação desfavorável energeticamente e pode ser contornado conforme o método de fabricação que podem ser de alta ou de baixa energia. Esses métodos permitem a redução do tamanho das gotículas de óleo, no método de baixa energia, no qual a redução da partícula ocorre por meio de inversão de fases, enquanto no método de alta energia usam forças mecânicas para dividir as fases em gotículas menores (KUMAR *et al.*, 2019).

É essencial considerar a ordem de mistura dos diferentes compostos durante a formulação de nanoemulsões. Um ponto crítico é que os surfactantes devem ser primeiramente misturados à fase oleosa, para criar condições altamente favoráveis à formação de nanoemulsões. Em contrapartida, se os surfactantes forem misturados com a água, nas fases iniciais de preparação, ocorre o desenvolvimento de emulsões em escala macroscópica. Portanto, considerar a ordem de adição dos componentes é essencial para o processo de formulação das nanoemulsões e deve ser cuidadosamente controlada para garantir a qualidade e estabilidade da formulação (MARZUKI, WAHAB, HAMID, 2019).

Os surfactantes ou tensoativos são substâncias capazes de adsorver em

interfaces, como entre fases gasosas ou entre fases imiscíveis, alterando a energia livre do sistema. A estabilidade coloidal das nanoemulsões é resultado do processo de obtenção, que proporciona estabilização estérica quando são utilizados tensoativos não iônicos e/ou polímeros. Em alguns casos, é necessário adicionar um co-tensoativo para aumentar a estabilidade do sistema, o que pode ampliar e aperfeiçoar sua estabilidade (NASCIMENTTO, 2016; ROSSI *et al.*, 2019).

Com relação às aplicações farmacológicas das nanoemulsões, observa-se na literatura que exibem mais vantagens em relação às microemulsões, pelo fato de serem mais estáveis quando diluídas; não ocorrendo alteração em sua estrutura original e tamanho das gotas; geralmente não precisam de altas concentrações de tensoativos variando entre 3,0 a 10% - como ocorre com as microemulsões que precisam de 20% de surfactante (TADROS *et al.*, 2004; MCCLEMENTS, 2012).

Outra vantagem das nanoemulsões está na entrega e liberação de fármacos, permitindo que os bioativos sejam direcionados para o local alvo por períodos mais longos. Essa função está intrinsecamente correlacionada a alguns fatores como: 1) sua maior estabilidade - devido ao tamanho nanométrico das partículas, assim, reduz sedimentação e separação de fases; 2) melhor absorção e biodisponibilidade - onde o tamanho nanométrico aumenta a área de superfície disponível e aumenta a absorção e biodisponibilidade do fármaco; 3) liberação controlada de fármacos - onde partículas em nanoescala permitem uma liberação controlada e direcionada de moléculas bioativas prolongando sua atividade terapêutica (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023).

De acordo com Vergallo (2020), as vantagens das nanoemulsões óleo em água variam entre: baixa citotoxicidade mínima do transportador; boa estabilidade de armazenamento; efeitos sinérgicos; antioxidante e liberação sustentada; produção em fácil escala; a capacidade de potencializar a eficácia bioativa das ervas; aumentando a solubilidade e o perfil de absorção, ao mesmo tempo que reduz a dosagem e os efeitos colaterais. E destaca os óleos vegetais mais frequentes óleo de *Ricinus communis* L. (*R. communis*, mamona), *P. Americana* (abacate), *Calendula officinalis* L. (*C. officinalis*, calêndula), *Punica granatum* L. (romã, *P. granatum*), *Punica granatum* L. (romã, *P. granatum*), *Cucurbita moschata* (*C. moschata*, abóbora) para formulação de nanoemulsão óleo em água.

Monge-Fuentes *et al.* (2017) desenvolveram uma nanoemulsão com óleo de açaí para terapia fotodinâmica (PDT) no tratamento de melanoma, utilizando óleo de

açaí em nanoemulsão. O estudo foi conduzido em linhagens celulares de melanoma B16F10 e células normais NIH/3T3, revelando uma taxa de mortalidade celular de 85% para células de melanoma, enquanto as células normais mantiveram alta viabilidade. Os resultados indicaram morte celular por apoptose/necrose. Além disso, em camundongos C57BL/6 portadores de tumor, o tratamento com óleo em nanoemulsão resultou em uma redução de 82% no volume tumoral em comparação com o controle. Os autores concluíram que o óleo de açaí, em nanoemulsão, foi eficaz como fotossensibilizador, oferecendo uma fonte promissora de moléculas fotossensibilizantes para o tratamento PDT do melanoma - um tumor conhecido por ser refratário a esse tipo de terapia.

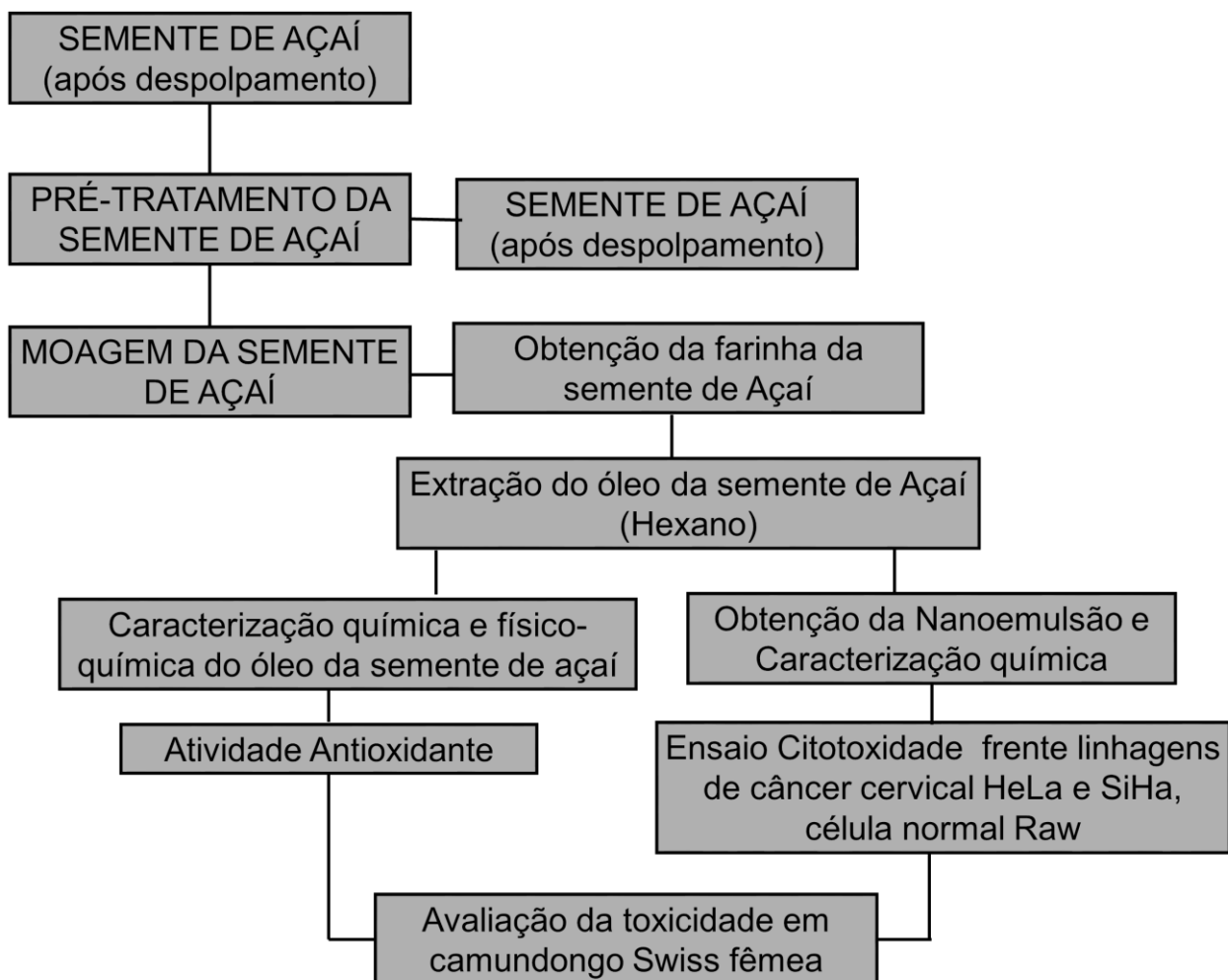
Da mesma forma, Loureiro Contente *et al.* (2020) desenvolveram uma nanoemulsão contendo óleo de açaí para aplicação tópica de um antifúngico. Eles incorporaram o cetoconazol na formulação, obtendo uma eficiência de encapsulamento de 98,31% e propriedades adequadas de potencial Zeta, tamanho de gota e PDI (índice de polidispersão). A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que as nanoemulsões apresentavam formato esférico. Os autores concluíram que as nanoemulsões de óleo de açaí são um veículo promissor para antifúngicos imidazólicos, como o cetoconazol.

No estudo conduzido por Rosa *et al.* (2019), foi avaliada a combinação de óleo de açaí e desonida (DES). Os autores observaram que a fotodegradação sob UV-A (365 nm) e UV-C (254 nm) resultou em menor degradação do DES quando associado às nanocápsulas contendo óleo de açaí em comparação com aquelas contendo triglicerídeos. Além disso, os testes de liberação *in vitro* revelaram um perfil bifásico de liberação para ambas as suspensões de nanocápsulas, com um efeito de explosão inicial seguido por uma liberação prolongada de DES. As formulações não foram consideradas fototóxicas a 0,5 mg/mL quando testadas em fibroblastos murinos T3 e queratinócitos humanos HaCat por meio do ensaio de viabilidade MTT, e foram classificadas como levemente irritantes. Assim, essas formulações mostram potencial promissor para aplicações terapêuticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Figura 5- Fluxograma do estudo



4.1 Materiais utilizados

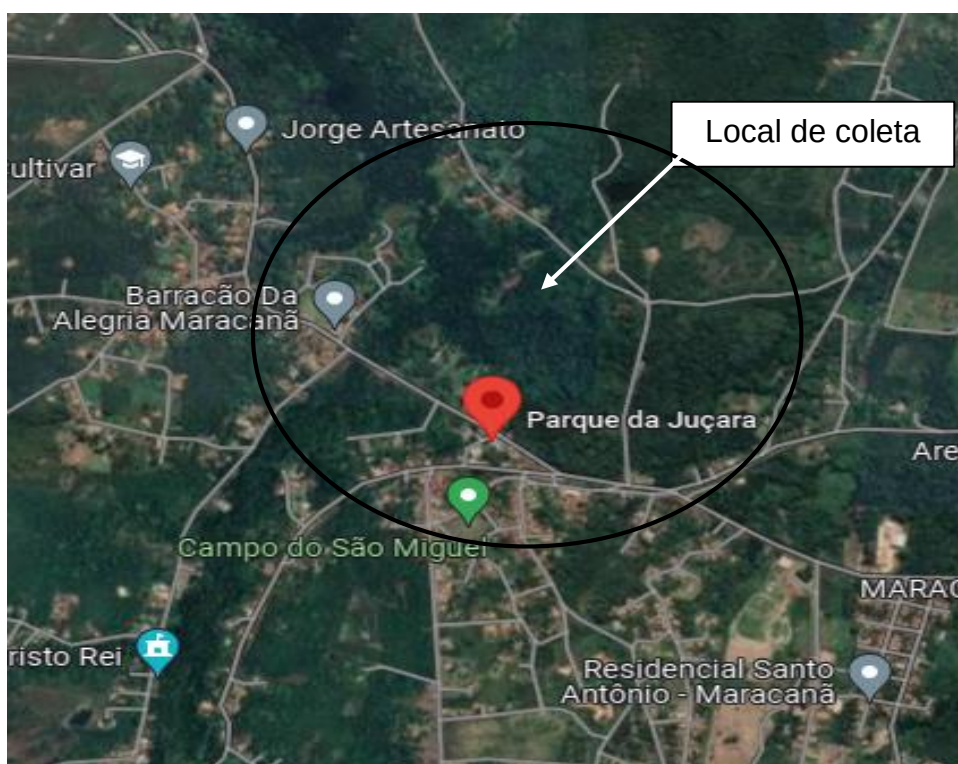
Água MiliQ foi obtida do laboratório de Cultura de Células (LCC) da Universidade Federal do Maranhão. Span 80® (Sorbitan monooleate), Solutol® HS 15 (Ácido 12-hidroxi-esteárico polioxetilado), ABTS•+ [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Óleo da semente de açaí (AO) extraído e analisado utilizando n-hexano PA, Metanol PA, Hidróxido de sódio, Hidróxido de Potássio, outros reagentes de grau analítico adquiridos da Isotar Produtos Químicos (São Paulo, Brasil). Brometo de 2,5-difenil-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) tetrazólio brometo de tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), solução salina tamponada com fosfato (PBS), soro fetal bovino (FBS) e solução de tripsina-EDTA (0,5 g de tripsina porcina e 0,2 g EDTA.4Na/L de solução salina balanceada de Hanks), Meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com L-glutamina (584 mg/L) e antibiótico/antimicótico (50 mg mL⁻¹ de sulfato de gentamicina e 2 mg/L de anfotericina B) foram obtidas da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Kit de citocinas BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 e Anexina V/PI foram adquiridos da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). As linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e possuíam certificado de identidade e qualidade (INMETRO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

4.2 Obtenção e caracterização do óleo da semente de *E. oleracea* Mart.

Os frutos utilizados neste trabalho foram obtidos de *Euterpe oleracea* Mart. coletados no Parque Ecológico do Maracanã, conhecido como Parque da Juçara (Figura 6), localizado no Bairro Maracanã na cidade de São Luís, MA, Brasil (latitude: 02° 31' 47" S, longitude: 44° 18' 10" W, altitude: 24m). Foram coletados no período de estiagem entre agosto a novembro e armazenados sob refrigeração a -20°C. A exsicata está armazenada sob registro nº 01425 no Herbário Ático Seabra (SLS) da Universidade Federal do Maranhão.

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Sistema de Gestão do Patrimônio Genético - SisGen sob o código A91B0BA.

Figura 6 - Parque Juçara localizado no bairro Maracanã, São Luís Maranhão-Brasil



Fonte: Autoria Própria

Posteriormente, foram descongelados e despulpados. As sementes foram expostas ao sol para secar 8h por dia, durante uma semana, e depois as fibras foram removidas. Em seguida, as sementes foram trituradas em um moinho, resultando em 360 gramas de semente triturada. Para cada etapa de extração, foram utilizados 10 gramas da semente triturada no extrator Soxhlet, utilizando solvente n-hexano. O tempo total de extração foi de 6 horas (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009) (Figura 7).

Figura 7-Matéria-prima para obtenção do óleo da semente de *Euterpe oleracea* Mart.



(A) Fruto total. (B) Semente. (C) Semente triturada. (D) Óleo obtido da semente.
Fonte: Autoria Própria

4.1.1 Esterificação do óleo

O óleo bruto de *Euterpe oleracea* Mart. foi analisado sob a forma de ésteres metílicos, preparados de acordo com Hartman e Lago (1973) adaptado de Lima (2007). Pesou-se 100mg do óleo para análise. Foi adicionado 4 mL de hidróxido de sódio em metanol a 0,5 mol/L. A mistura foi aquecida para dissolução das micelas de gordura e posteriormente resfriados em água corrente, e adicionado 5mL de uma solução de cloreto de amônio dissolvidos em 30 mL de metanol e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação. Após essa etapa, uma solução saturada de cloreto de sódio foi adicionada e o tubo foi agitado durante 30 segundos. Por fim, adicionou-se 5 mL de hexano, e o tubo foi agitado em Vortex por 30 segundos e deixado em repouso para separação das fases e análise cromatográfica.

4.1.2 Análise do óleo por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

A identificação dos ácidos graxos foi realizada através do Cromatógrafo a gás (CG-2010) acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM QP2010 Plus), ambos da Shimadzu. Esses processos foram utilizados para a análise cromatográfica, usando uma coluna capilar ZB-FFAP (30m x 0,25mm x 0,25µm); o fluxo de arraste do gás Hélio numa velocidade linear de 30cm/sec, e o fluxo da coluna 1,0 ml/min. A programação do forno foi: 120 °C por 2 minutos com rampa de aquecimento de 10°C/min até 180°C que permaneceu por 5 min, sendo aquecido novamente com uma taxa de 5° C /min até 230°C, permanecendo até 25min. A temperatura do injetor e da fonte de íons foram de 200° C e 250° C, respectivamente. O **modo de injeção Split com razão de 50**.

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação dos ésteres, provenientes dos ácidos graxos que compõem o óleo foi feita, através da biblioteca do equipamento NIST 08 (*National Institute of Standards and Technology*).

4.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais e flavonóides em óleo de açaí e nanoemulsões à base de óleo de semente de açaí

A determinação de fenólicos totais no Óleo de Semente de Açaí e na Nanoemulsão foi realizada pelo método colorimétrico quantitativo de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2012). Com uma curva padrão expressa em ácido gálico (5 a 100 µg de ácido gálico mL⁻¹). O teste foi realizado com 2,0 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v), 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) e 200µL da concentração de 1000 µg mL⁻¹ da amostra (Óleo de Semente de Açaí e Nanoemulsão), após homogeneização e proteção da luz por 30 min, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 760nm. Os testes foram realizados em triplicata. O teor de fenólicos totais foi calculado utilizando a equação de regressão obtida a partir da curva do ácido gálico.

O teor de flavonóides totais foi determinado pelo método descrito por Woisky e Salatino (1998) com adaptações. Para o estudo, foram utilizadas alíquotas de 3,0 mL das amostras em estudo na concentração de 1000 µg mL⁻¹ com adição de 300 µL de solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 5%, homogeneizadas e colocadas

ao abrigo da luz por 30 min. A absorbância foi então lida num espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 420 nm. O teor de flavonóides totais foi determinado utilizando uma curva-padrão de quercetina (5 a 40 µg/mL). A partir da equação da reta obtida, calculou-se o teor de flavonóides totais e os resultados foram expressos em mg de quercetina por grama de amostra.

4.3 Caracterização físico-química do óleo da semente de *E. oleracea* Mart.

As análises físico-químicas foram realizadas no Pavilhão Tecnológico da UFMA, com análises triplicata para índice de acidez, índice de saponificação e material mineral (cinzas); em duplicata para umidade, índice de refração, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (LUTZ, 1985).

4.3.1 Determinação da acidez (% ácidos graxos livres)

O índice de acidez (Ac) é definido como o número de mg de hidróxido de potássio (NaOH) necessário para neutralizar um grama da amostra. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular, com soluções de álcali-padrão, a acidez do produto ou soluções aquosas/alcoólicas do produto, assim como os ácidos graxos obtidos dos lipídios. (LUTZ, 1985).

Nesse sentido, foram pesados 2 g de óleo em frasco Erlenmeyer, no qual foram adicionados 25mL de solução éter-álcool (2:1) neutra e duas gotas do indicador fenolftaleína. Em seguida, foi realizada a titulação com hidróxido de sódio 0,1M ou 0,01M como fator de correção (fNaOH) por 30 segundos, tempo que houve o aparecimento da coloração rósea. Os dados foram calculados conforme a fórmula:

$$Ac = \frac{2,82 * Vgasto * fNaOH}{Peso amostra}$$

4.3.2 Umidade e material volátil

Determinação da umidade é um dos parâmetros legais para a avaliação da qualidade de óleos e gorduras (LUTZ, 1985).

Assim, foram pesados 2 g de óleo em uma cápsula de porcelana, a qual foi mantida em estufa a 110°C por 1:30h; após esse tempo, foi resfriada em dessecador até obter o peso constante. O cálculo foi realizado conforme a fórmula:

$$Um = \frac{A - B}{C} * 100$$

Onde:

A	Peso inicial do sistema (amostra +
=	cadinho)
B	Peso constante do sistema (amostra +
=	cadinho)
C	Peso inicial da amostra
=	

4.3.3 Índice de saponificação

Índice de saponificação é a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade definida de amostra. Este método é aplicável a todos os óleos e gorduras e expressa o número de miligramas de hidróxido de potássio necessários para saponificar um grama de amostra. (LUTZ, 1985).

Então, foram pesados 4g de óleo e misturado em 50mL de solução alcoólica de KOH em um Erlenmeyer; em seguida, foi adicionado em condensador e aquecido em chapa aquecedora fervendo por 1h. Após resfriamento, foi titulado com 1mL do indicador.

O índice de Saponificação foi calculado conforme a fórmula:

$$Sap = \frac{28,06 * f_{HCl} * (B - A)}{Peso amostra}$$

Onde:

$$\frac{B}{A} = \frac{\text{Volume gasto na titulação do branco}}{\text{Volume gasto na titulação da amostra}}$$

4.3.4 Índice de refração

Índice de refração é característico para cada tipo de óleo, dentro de certos limites. Está relacionado com o grau de saturação das ligações, mas é afetado por outros fatores tais como: teor de ácidos graxos livres, oxidação e tratamento térmico. Este método é aplicável a todos os óleos normais e gorduras líquidas (LUTZ, 1985). O índice de refração foi realizado com o auxílio de um refratômetro de Abbé (Quimis) com escala-padrão em 40°C. Foi adicionado 1 gota de óleo em temperatura ambiente e a análise foi realizada próximo à luz para obter um resultado satisfatório.

4.3.5 Determinação de resíduo por incineração (cinzas)

Este método determina o resíduo remanescente depois de incineração sob condições específicas de teste. Fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado a 550°C, com destruição da matéria orgânica sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (LUTZ, 1985).

Foram pesados 2g de óleo em cápsula de porcelana, em seguida, fez-se a pré-queima em bico de Bunsen em chama baixa, por 1:30h, até o óleo ser carbonizado por completo. Posteriormente, o óleo foi incinerado em mufla a 600°C por 4h e acondicionado em dessecador em temperatura ambiente para resfriar.

As cinzas foram pesadas e analisadas conforme fórmula abaixo.

$$\text{Cinzas} = \frac{(\text{peso final} - \text{peso cápsulas}) * 100}{\text{peso amostra}}$$

4.3.6 Densidade

Este método determina a razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume a 25°C e é aplicável a todos os óleos e gorduras líquidas. (LUTZ, 1985).

A densidade foi avaliada em 1g de óleo. Para essa análise, foi utilizado o picnômetro pesando-o antes do óleo. Em seguida, o óleo foi adicionado lentamente à parede do picnômetro até estabilizar, pesando-se a massa do óleo. Assim, a densidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$D = \text{massa do óleo no picnômetro} - \text{peso do picnômetro}$$

4.4 Obtenção da nanoemulsão

4.4.1 Método de emulsificação

As emulsões foram preparadas utilizando o método de emulsificação de fases (MEF) de acordo com a metodologia adaptada de Fernandez *et al.* (2004) e Rodrigues *et al.* (2014). As fases aquosa (água) e oleosa (tensoativos e óleo de açaí) foram aquecidas separadamente a $65 \pm 5^\circ\text{C}$. Em seguida, a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa. O sistema foi mantido sob agitação constante (600 rpm) até atingir a temperatura ambiente $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Após 24 horas e ao longo de 30 dias, as formulações foram submetidas à avaliação da estabilidade.

4.4.2 Determinação da Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico (EHL)

A determinação do EHL foi realizada com base na metodologia proposta por Griffin (1979) que, neste estudo, consistiu na preparação de nove formulações seriadas compostas por óleo de açaí (*E. oleracea* Mart) e um par de tensoativos não iônicos, ambos com EHL conhecidos, A (Span 80, EHL = 4,3) e B (Kolliphor® HS 15, EHL = 16), em proporções variadas, dando origem aos valores de EHL resultantes da mistura calculados pela equação:

$$\text{EHL resultante} = (\text{EHL A} \times 0,01 \times A) + (\text{EHL B} \times 0,01 \times B)$$

em que:

EHL resultante = EHL final da emulsão

EHL A = EHL do tensoativo hidrofílico;

EHL B = EHL do tensoativo lipofílico;

A = quantidade utilizada, em percentagem, de tensoativo A

B = quantidade utilizada, em percentagem, de tensoativo B

A + B = 100%.

O método de emulsificação por inversão de fases (PIE), de baixa energia, foi utilizado para obter nanoemulsões óleo em água (O/W). Foram preparados 9 nanoformulações, sendo 3 frascos para prateleira armazenado à temperatura ambiente, 3 para preservação no congelador da geladeira a -20°C e 3 para refrigeração na parte de baixo da geladeira (7°C). Cada formulação foi preparada com

uma massa final de 10 g, contendo 85% (m/m) de água destilada, 10% (m/m) de óleo de açúcar e 5% (m/m) da mistura de emulsionantes A e B. Para determinar a EHL do óleo e escolher a formulação mais estável, considerou-se a emulsão com o aspecto mais transparente e a estabilidade mais elevada sem floculação, formação de cremes, formação de precipitados ou separação de fases.

4.4.3 Avaliação preliminar da estabilidade

Teste macroscópico

A avaliação macroscópica (visual) foi realizada por três observadores. Nesse processo, foram investigadas a presença de sinais de formação de cremes, coalescência ou separação de fases (SP), bem como aspectos físicos como cor e aspecto (DUARTE *et al.*, 2015). Essa avaliação foi efetuada duas vezes após 1 e 30 dias de preparação, as quais foram preservadas conforme item 4.4.2.

Teste de centrifugação

Para avaliar a estabilidade por centrifugação, 1 mL de cada formulação foi adicionado a um eppendorf e centrifugado por 30 minutos a 15.000 rpm em uma centrífuga (Centrifuge Eppendorf, modelo 5415D) (FARDOUS *et al.*, 2021). Depois disso, foi avaliado macroscopicamente por três observadores. O ciclo foi efetuado duas vezes, 1 e 30 dias após a preparação.

Efeito da temperatura

Este teste foi realizado para verificar a estabilidade da nanoemulsão em temperaturas variadas de acordo com Sugumar *et al.* (2014), com algumas modificações. Nesse sentido, foi efetuado mantendo a nanoemulsão alternadamente a 4 e 25°C durante 24 horas, a cada temperatura, e avaliado por três observadores. O teste foi efetuado duas vezes, 1 e 30 dias após a preparação.

4.4.4 Caracterização físico-química da nanoemulsão

Tamanho médio das partículas e índice de polidispersão (PDI)

Para determinar o tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão,

as formulações foram avaliadas utilizando a técnica de dispersão dinâmica da luz (Nano ZS, Malvern Instruments Ltd. Reino Unido). As amostras não foram diluídas. Uma alíquota de cada amostra foi introduzida na cuvete do equipamento e analisada a 25°C. Em cada leitura, foi obtida a média Z, que corresponde ao diâmetro médio aproximado. As leituras foram efetuadas em triplicado 30 dias após a preparação para avaliar a estabilidade de armazenamento. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Potencial Zeta

As amostras foram analisadas - quanto ao potencial zeta - num dispositivo Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. UK), diluídas em KCl 5mM (diluição 1:10). Uma alíquota de cada amostra diluída foi introduzida na cuvete do equipamento e analisada a 25°C. As leituras foram efetuadas em triplicado.

pH

O pH da Nanoemulsão com Óleo da semente de *E. oleracea* Mart (NE-OEO) foi medido com o objetivo de avaliar a possível degradação da formulação. Assim, foi utilizado um medidor de pH (Hanna instruments, HI2221-02) previamente calibrado com uma solução padrão de pH 4,0 e 7,0 a 25°C $\pm$ 0,1°C. Devido à fluidez da nanoemulsão, não foi necessária qualquer diluição prévia. As análises foram realizadas em triplicado com imersão direta do eletrodo nas amostras, e os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, 30 dias após a preparação para avaliar a estabilidade de armazenamento.

Turbidez

A turbidez da amostra foi analisada medindo a absorbância da nanoemulsão (não diluída) a um comprimento de onda de 600 nm (Espectrofotômetro Digital UV-VIS, GLOBAL TRADE TECHNOLOGY). As medições foram efetuadas em triplicado a 25 °C, tendo sido utilizada água deionizada como solução em branco. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, 1 e 30 dias após a preparação.

4.5 Avaliação da atividade biológica *in vitro* do óleo e da nanoemulsão à base de óleo de sementes de *E. oleracea* Mart.

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7, queratinócitos humano HaCat e células tumorais HeLa e SiHa

Nesse processo de avaliação, foram utilizadas células não tumorais da linhagem macrófago de camundongo *Mus musculus* Raw (ATCC 264.7; BCRJ 0212), linhagens celulares de células HaCat (ATCC PCS-200-011); e tumorais derivados de câncer cervical HeLa (ATCC CCL-2; BCRJ 0100) e SiHa (ATCC HTB-35 BSL) todas elas obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Genética da Universidade Federal do Maranhão - LABGEN/UFMA. As células foram mantidas em cultura em frascos contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) completo e em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C), realizando a manutenção a cada 2 dias.

Ensaio de Viabilidade celular - MTT

A viabilidade das linhagens celulares foi avaliada por ensaio de MTT (tetrazólio de metiltiazol) (MOSMANN, 1983). As Células RAW 264.7 (2x10⁴ células/200 µL/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços overnight em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações de óleo, nanoemulsão com óleo (NCO) e nanoemulsão sem (óleo) NSO (0,78 a 100µg/mL). O controle negativo foi realizado somente meio+célula, o controle positivo célula tratada com Dimetilsulfóxido de dimetilo (DMSO) a 10%. As placas foram incubadas em estufa a 37°C nos tempos de 24, 48 e 72hs.

As células HaCat (2 × 10⁴ células/200 µL/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas durante 24, 48 e 72h numa atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37 °C. Subsequentemente, as células foram tratadas com várias concentrações de óleo (variando de 7,8 a 1000 µg/mL).

As células SiHa (HPV-16) e HeLa (HPV-18), em placa de 96 poços (1x10⁴ células/mL), foram tratadas com 100µL da suspensão do óleo nas concentrações, 6.31, 12,5, 25, 50 e 100g/mL para as linhagens tumorais e com 7.8 a 1000µg/mL para as células não tumorais. Nesse processo, as placas foram incubadas por 24, 48 e

72hs de tratamento em triplicata. Após esse período de tratamento, 200 μ L de meio novo contendo 10 μ L MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foram adicionado à cultura. As células foram reincubadas em estufa de CO₂ por 3 horas protegidas da luz. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 μ L de álcool PA foram adicionados a cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa.

Após os tempos de tratamento, os sobrenadantes de cultura foram descartados, as placas lavadas e adicionadas o MTT (Sigma Chemical Co.) e reincubadas em estufa de CO₂ por 3 horas protegidas da luz. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 100 μ L de álcool PA foram adicionados a cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa. Os resultados foram expressos como porcentagem da viabilidade celular em relação aos controles.

4.6. Avaliação da morfologia celular em linhagens de câncer cervical

Para avaliação da morfologia celular, as linhagens HeLa e SiHa foram cultivadas em placas de 24 poços, com densidade de inoculação 2×10^4 células/poço com meio DMEM+SFB 10% incubadas em estufa de CO₂ a 37°C; após a atingir a confluência, foi adicionado meio no controle negativo: meio+óleo (50 μ g/mL) nos poços de tratamento. A placa foi incubada por 24 e 48hs em estufa de CO₂ a 37°C. Posteriormente, foram capturadas 3 imagens de cada um dos grupos de tratamento e controle, e respectivo período de incubação: 24 e 48hs.

4.7. Ensaio clonogênico

As linhagens SiHa (HPV-16) e HeLa (HPV-18) foram plaqueadas em uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células/mL - em placa de 24 poços - com um volume de 1mL, sob uma atmosfera de CO₂ de 5%. Após atingir a confluência da monocamada, foi realizado o tratamento com a concentração IC₅₀ do óleo durante 24 e 48 h. As células foram novamente tripsinizadas, então foram contadas 1000 células viáveis e adicionadas em uma placa de 12 poços ($1,5 \times 10^5$ mL/poço), sem os tratamentos, e incubadas por 10 dias. O meio de cultura foi renovado a cada 72 horas. As colônias

formadas foram lavadas com PBS, fixadas em metanol (100%) gelado por 10 min, novamente lavadas com PBS e coradas com Giemsa a 5% por 40 min. Foi considerada uma colônia quando havia mais de 50 células. As colônias foram observadas por meio de microscópio invertido (4x; Opticam O500i).

4.8 Ensaio com Anexina – V

Para esse ensaio de morte celular, foram utilizadas as linhagens SiHa (HPV-16) e HeLa (HPV-18), (1×10^5 células/mL) tratadas com 50 µg/mL de óleo da semente de açaí. A apoptose foi analisada usando o ensaio de coloração de Anexina V/PI para detectar células apoptóticas precoces, tardias e células vivas. As células foram lavadas em PBS gelado e ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação de Anexina V (0,1 M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) contendo Anexina V-FITC e PI (1 µg/mL) por 15 minutos. As amostras foram analisadas com citômetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). A excitação foi realizada por um laser de argônio a 488 nm e a detecção de fluorescência foi realizada a 650-670 nm (PI) e 670 nm (7-AAD) (2000 eventos).

4.9 Ensaio de cicatrização de feridas *wound healing*

As alterações na migração da célula induzidas pelo óleo da semente de *E. oleracea* Mart. foram analisadas pelo ensaio *wound healing* (ALMEIDA *et al.*, 2020), em células de câncer cervical; assim, foi determinado o padrão de migração celular na ranhura *in vitro* em direção ao espaço vazio.

As linhagens SiHa (HPV-16) e HeLa (HPV-18) foram cultivadas em placas de 24 poços a $0,5 \times 10^6$ células/ml até atingir a confluência. A monocamada foi ferida em linha reta com uma ponteira de 200 µL e lavada três vezes com tampão PBS. O meio de cultura com 50 µg/mL de óleo e incubadas, em estufas, a 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas de incubação, a área da ferida foi analisada usando um modelo de microscópio de contraste de fase 40x; Opticam O500i. A taxa de cicatrização da ferida foi calculada com a porcentagem da ferida inicial até o fechamento completo da ferida em diferentes momentos com o software Image J versão 8.0.

4.10 Avaliação da atividade antioxidante usando os métodos ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) e DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazily)

A atividade antioxidante pelo método ABTS•+ [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] foi feita conforme descrita por Teles *et al* (2021) com modificações. O teste foi realizado com um radical de ABTS que foi preparado pela reação de 5,0 mL de uma solução de ABTS 3,840 µg/mL com 88 µL da solução de persulfato de potássio 37,840 µg/mL. A mistura foi deixada no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas. Imediatamente após a mistura, foi diluído em etanol até obter uma absorbância de 0,7 a 734 nm.

A partir da amostra de óleo e nanoemulsão, obtido nos itens 4.1 e 4.3, foram preparadas uma concentração, em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 100µL da concentração em estudo para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS.

A leitura foi feita após 6 minutos da reação a 734 nm; nesse caso, o etanol foi utilizado como branco. Como referência, utilizou-se a curva padrão do Trolox - um antioxidante sintético - nas concentrações de 50-1000 µM. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em µM trolox/g amostra (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

Para o ensaio de DPPH, as alíquotas de extrato e óleo da semente de açaí foram misturadas a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,06 mM) e deixadas reagir por meia hora, no escuro. As medidas foram realizadas em 515 nm com a aplicação de um espectrofotômetro Turner® 340 (Barnstead / Thermolyne, Dubuque, IA, EUA). A análise foi realizada em triplicata e mediu o declínio na concentração de absorbância do radical DPPH causado pelas 46 amostras. Os resultados são expressos em % de redução do radical de acordo com esta equação.

Equação 1: Atividade antioxidante (%) = $[1 - (\text{absorbância da amostra} / \text{Absorbância de controle})] \times 100$.

A determinação da atividade antioxidante método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) foi realizada de acordo com Silveira *et al* (2018), 100 µL amostra a ser pesquisada foi transferida para tubos contendo 3,0 mL de radical DPPH foi realizada homogeneização e depois de 30 minutos em ambiente escuro feita a leitura da

absorbância em 517 nm. A reação foi desenvolvida em triplicata. Álcool etílico absoluto foi utilizado como branco. Um tubo foi preparado com álcool etílico em substituição ao extrato para controle negativo.

A concentração de antioxidantes no tubo de reação (CT) é expressa em concentração equivalente de Trolox (μM). Mediante reta da Curvas de Trolox e DPPH, pode-se calcular o valor CT usando a Equação:

$$CT = \frac{(Abs_{am} - b)}{a}$$

Sendo:

Abs_{am} = absorbância da amostra.

a = coeficiente angular obtido para a curva de Trolox e DPPH

b = coeficiente linear obtido para a curva de Trolox e DPPH.

Levando em consideração a quantidade em gramas da amostra utilizada para realização da análise, tem-se a atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{mol/grama de polpa}$) (TEAC m), Equação 2.

4.11 Avaliação da toxicidade do óleo e da nanoemulsão *in vivo* em camundongos Swiss fêmeas

4.11.1 Animais e aspectos éticos

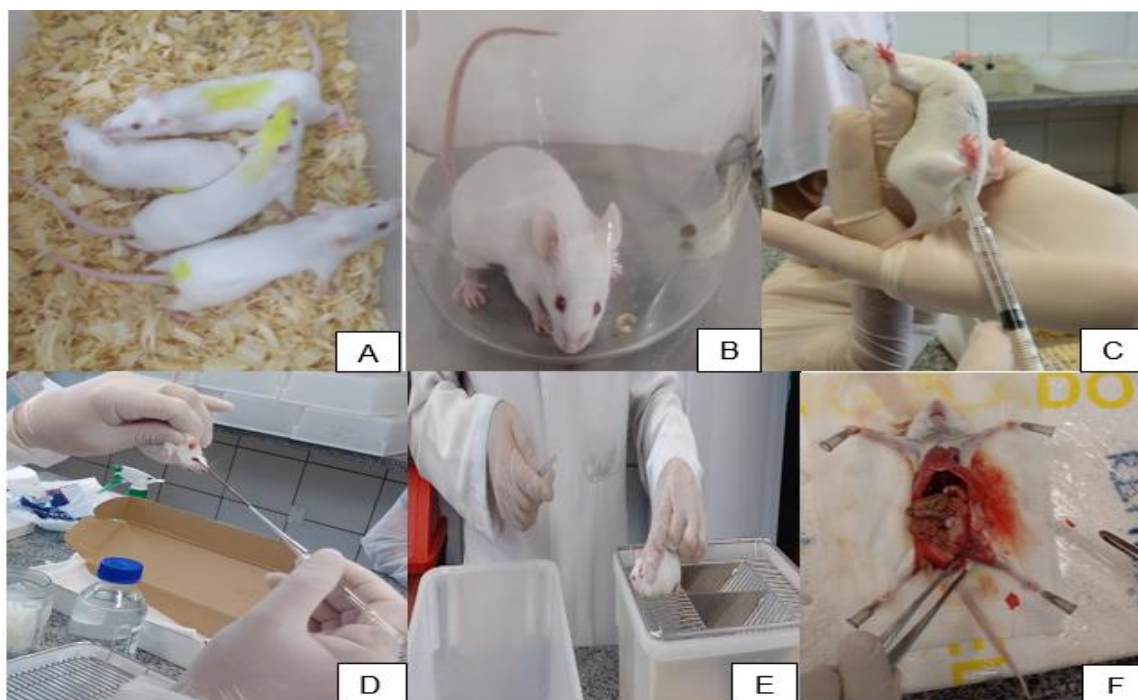
O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão sob o Processo nº 23115.002306/2021-66.

Após aprovação do CEUA, os camundongos foram solicitados ao Biotério Central da UFMA. Os procedimentos experimentais (Figura 8), bem como a coleta de sangue, foram realizados no Biotério do Setor de Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFMA.

Camundongos Swiss fêmeas pesando entre 27 e 38g e com idade entre 90 e 120 dias foram separados em 5 grupos (8 animais por gaiola), mantidos em ciclo claro-escuro, com dieta livre, e pesados diariamente durante 45 dias. Foram divididos em 1) grupo de controle negativo (salina), 2) grupo de tratamento com nanoemulsão, 3) grupo de tratamento com óleo a 100 mg/kg, 4) grupo de tratamento com óleo a 200mg/mL e 5) grupo de tratamento com óleo a 300mg/mL. Durante a experiência os animais foram submetidos a um

período de adaptação de 7 dias. Após o qual, foi efetuado o primeiro tratamento através da inoculação intraperitoneal de 0,5 ml de solução salina, óleo e nanoemulsão. Após 15 dias de tratamento, foi colhido sangue da região retro-orbitária e os animais foram deixados em repouso para observação e avaliação médica durante 4 dias. O segundo tratamento foi efetuado após o período de 2 dias depois da observação e avaliação médica e, após 15 dias de inoculação; os animais foram submetidos a eutanásia com os anestésicos xilazina e cetamina (4 mg/kg de peso corporal). O sangue foi colhido por punção cardíaca, e o fígado e o rim foram retirados para avaliação do peso e para a análise histopatológica; da mesma forma, o baço foi retirado para avaliação do peso e da celularidade numa câmara de Neubauer.

Figura 8 - Observação dos animais do dia 0 ao dia 45



A) Identificação e observação do comportamento; B) pesagem; C) inóculo; D) coleta de sangue; E) anestesia; F) retirada dos órgãos.

Fonte: Autoria Própria

4.11.2 Avaliação da toxicidade

As amostras de rim e fígado foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado a pH=7,0 e incluídas em blocos de parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas com um microscópio óptico. Os parâmetros avaliados para o fígado foram a presença de degenerescência vacuolar dos hepatócitos (definida como ligeira se restringe à zona centrolobular ou fosse multifocal, ou como moderada se fosse panlobular ou apresentasse um padrão difuso em todo o órgão); hepatite - definida como ligeira se se localizar nos espaços porta ou centrolobular e como moderada/grave se houvesse formação de pontes leucocitárias entre os espaços porta e as veias centrolobulares ou áreas de fibrose -; áreas de necrose, definidas como necrose de liquefação ou de coagulação; cariomegalia - definida como a presença de hepatócitos com núcleos com o dobro do diâmetro normal e com um padrão de cromatina pálido e rarefeito - , e figuras de mitose, utilizadas como sinal de regeneração celular e contadas por campo de grande ampliação. Na análise do rim, o parâmetro considerado foi a presença de degenerescência tubular - definida como o hipertrofia celular das células dos túbulos contorcidos proximais ou distais, ou a necrose de células tubulares isoladas, ou a perda de vesículas celulares para o lúmen tubular (blebbing).

4.11.3 Avaliação da resposta imunológica e inflamatória: Quantificação de citocinas

Para esse teste, foram colhidas duas amostras de sangue: a primeira da região retro-orbital, após 15 dias de tratamento, e a segunda, por meio de punção cardíaca, após o segundo tratamento, no momento da eutanásia dos animais.

A quantificação das citocinas interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interferão-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-17A (IL-17A) e interleucina-10 (IL-10) foi efectuada por citometria de fluxo utilizando o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), utilizando o kit de citocinas BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.12 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido pelos pós-testes de Dunnett's, Tukey's e teste T utilizando os testes estatísticos do software GraphPad Prism (versão 7.0). O intervalo de confiança estabelecido foi 95% e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

O óleo extraído das sementes de *E. oleracea* Mart. apresentou um rendimento de 5% a 6% em relação ao peso seco das sementes, com uma cor verde oliva característica. A análise cromatográfica gasosa, acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), forneceu informações valiosas sobre a composição química da planta em questão. Durante esta análise, foram identificados e quantificados 17 picos cromatográficos distintos, correspondentes aos principais componentes voláteis do óleo essencial.

De particular relevância, observou-se que este óleo apresenta uma divisão equilibrada entre ácidos graxos saturados (que representam 49,27% do total) e ácidos graxos insaturados - que compreendem os restantes 50,73%. Entre os ácidos graxos insaturados, 29,73% são monoinsaturados, enquanto 20,85% são poliinsaturados (como mostra a Figura 2). Esta composição química é de grande importância, uma vez que influencia diretamente as propriedades e as utilizações potenciais do óleo essencial de *E. oleracea* Mart. (Figura 9).

A análise por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), permitiu a identificação e quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2), oleico (C18:1); sendo o ácido oleico o que apresenta maior percentagem. No entanto, foram detectados outros ésteres, em menor quantidade, provenientes dos ácidos graxos cáprico (C10:0), palmitoleico (C17:1), linolênico (C18:3), esteárico (C18:0), eicosanóico (C20:0), behênico (C22:0) e tricosanóico (C23:0). Foram também detectados os ácidos graxos mirístico e palmítico não esterificados e os ácidos graxos benzoico e azelaídico, correspondendo a 0,19% (TABELA 2; Figura 9).

Figura 9- Cromatograma dos ésteres provenientes dos ácidos graxos do óleo de sementes da *Euterpe oleracea* Mart.

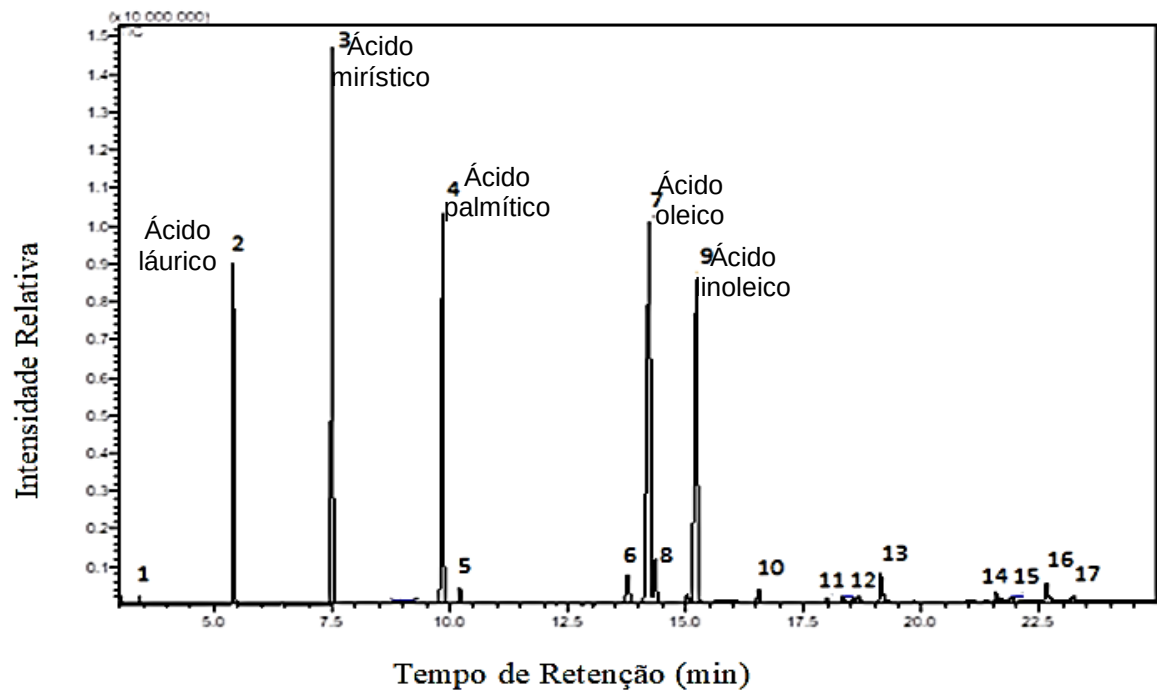


Tabela 2 - Ésteres provenientes dos ácidos graxos existentes no óleo de sementes da *Euterpe oleracea* Mart.

Ácido graxo	Picos	Cadeia carbônica	% de área Tempo de retenção (min)	Tr (min)
Ácido cáprico	01	C10:0	0,13	3,429
Ácido láurico	02	C12:0	8,9	5,407
Ácido mirístico	03	C14:0	18,03	7,508
Ácido palmítico	04	C16:0	16,61	9,845
Á ácido palmitoleico	05	C16:1	0,58	10,206
Á ácido esteárico	06	C18:0	1,81	13,765
Ácido oleico	07	C18:1	26,94	14,228
Ácido (isômero)	08	C18:1	2,21	14,348
Ácido linoleico	09	C18:2	19,92	15,223
Ácido linolênico	10	C18:3	0,62	16,538
Ácido nanodecenóico	11	C19:0	0,21	17,985
Ácido eicosenoico	12	C20:0	0,35	18,326
Ácido mirístico	13	C14:0	1,75	19,134
Ácido behênico	14	C22:0	0,43	21,586
Ácido eicosatrienóico	15	C23:0	0,22	21,904
Ácido palmítico	16	C16:0	0,88	22,649
Ácido tricosanotrienóico	17	C23:0	0,22	23,212

Fonte: Autoria Própria

Quantificação química do óleo de sementes de *E. oleracea* Mart e da nanoemulsão

O teor de compostos fenólicos totais encontrados no óleo de açaí e na nanoemulsão, conforme apresentado na Tabela 3, foi calculado através da equação de regressão $y = 0,0009x - 0,0681$, com R^2 de (0,9961). O teor de flavonoides totais foi calculado pela equação de regressão $y = 0,028x - 0,0625$, com R^2 de (0,9938).

Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos totais e flavonoides no Óleo e na Nanoemulsão de *Euterpe oleracea* Mart

Quantificação Química	Óleo	NE-OEO.
Conteúdo de fenólicos totais (mg EAG g⁻¹)*	127,40 ^a ± 0,449	146,00 ^b ± 0,259
Conteúdo de flavonoides totais (mg EQ g⁻¹)*	62,62 ^a ± 0,930	113,80 ^b ± 0,454

Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de t Unpaired. *EAG = equivalente em ácido gálico. *EQ = equivalente à quercetina.

Fonte: Autoria Própria

O teor de fenólicos totais no óleo foi de $127,40 \pm 0,449$ mg de equivalente de ácido gálico por grama (mg EAG g⁻¹), enquanto na nanoemulsão esse valor foi significativamente maior, atingindo $146,00 \pm 0,259$ mg EAG g⁻¹. Em relação aos flavonoides totais, o óleo apresentou um teor de $62,62 \pm 0,930$ mg de equivalente de quercetina por grama (mg EQ g⁻¹), enquanto a nanoemulsão apresentou um valor ainda maior, chegando a $113,80 \pm 0,454$ mg EQ g⁻¹.

Estes resultados indicam que a nanoemulsão de açaí tem uma maior concentração de compostos fenólicos totais e flavonóides totais em comparação com o óleo, sugerindo potenciais benefícios antioxidantes e nutricionais superiores na nanoemulsão.

Caracterização físico-química do óleo de sementes de *E. oleracea* Mart.

A Tabela 4 descreve as características do óleo da semente de *E. oleracea* Mart., no que diz respeito à acidez ($0,3556 \pm 0,0003$), umidade ($1,25 \pm 1,64$),

índice de saponificação ($189 \pm 1,04$), índice de refração ($1,4707 \pm 0,00005$), resíduo de incineração (cinzas) ($0,42 \pm 0,42$) e densidade ($0,928 \pm 0,00005$).

Tabela 4 - Determinação dos parâmetros físico-químicos do óleo obtido da semente de *Euterpe oleracea* Mart.

Análise físico-química	Valores médios + SD
Umidade (p/p)	$1,25 \pm 1,64$
Índice de saponificação (mg KOH/óleo g)	$189,61 \pm 1,04$
Índice de refração (40°C)	$1,4707 \pm 0,00005$
Resíduo por incineração (g Cinzas)	$0,42 \pm 0,42$
Densidade (g/ml)	$0,928 \pm 0,00005$
Acidez (% ácido láurico/oléico)	$0,3556 \pm 0,0003$

Determinação do EHL do óleo de *Euterpe oleracea* Mart. e obtenção da sua nanoemulsão

A Tabela 5 mostra que, das nove formulações preparadas pela mistura de um tensoativo hidrofóbico (SPAN 80, HLB = 4,3) com um tensoativo hidrofílico (Kolliphor® HS 15, EHL = 16) com HLB compreendido entre 4,3 e 16. Após 1 e 30 dias de preparação, apenas a formulação 5 apresentou um aspecto visual translúcido azulado estável, sem sinais de floculação, formação de cremes, formação de precipitados ou separação de fases. As outras formulações foram descartadas.

O EHL do óleo de açaí correspondeu ao resultado encontrado na formulação 5, igual a 10,15, cuja preparação consistiu em 5% de tensoativos (50% Span 80 e 50% Solutol) e 10% de óleo de açaí, formando a fase oleosa; e 85% de Pbs, formando a fase aquosa, num total de 10 g de formulação que deu origem a uma nanoemulsão O/A estável com o aspecto fluido, azulado e translúcido desejado, selecionada para os próximos experimentos deste estudo.

Tabela 5 - Misturas de tensioactivos não-iónicos utilizadas para obter os valores de EHL escolhidos.

Formulações	Span 80 % m/m	Kolliphor® HS 15 % m/m	Óleo % m/m	Solução PBS 1X. % m/m	EHL
1	4,5	0,5	10	85	14,83
2	4,0	1,0	10	85	13,66
3	3,5	1,5	10	85	12,49
4	3,0	2,0	10	85	11,32
5	2,5	2,5	10	85	10,15
6	2,0	3,0	10	85	8,98
7	1,5	3,5	10	85	7,81
8	1,0	4,0	10	85	6,64
9	0,5	4,5	10	85	5,47

EHL - Equilíbrio Hidrofílico lipofílico; m: massa

Fonte: Autoria Própria

Avaliação da estabilidade

A nanoemulsão de óleo de açaí seleccionada (NE-OEO) foi avaliada quanto à estabilidade em relação à análise macroscópica, ao teste de centrifugação e ao efeito da temperatura ambiente (25°C) e da refrigeração (4°C). A estabilidade física da nanoemulsão ideal, de aspecto visual translúcido azulado, permaneceu inalterada durante todos os testes, não havendo formação de creme, sedimentação ou separação de fases após 1 e 30 dias de preparo.

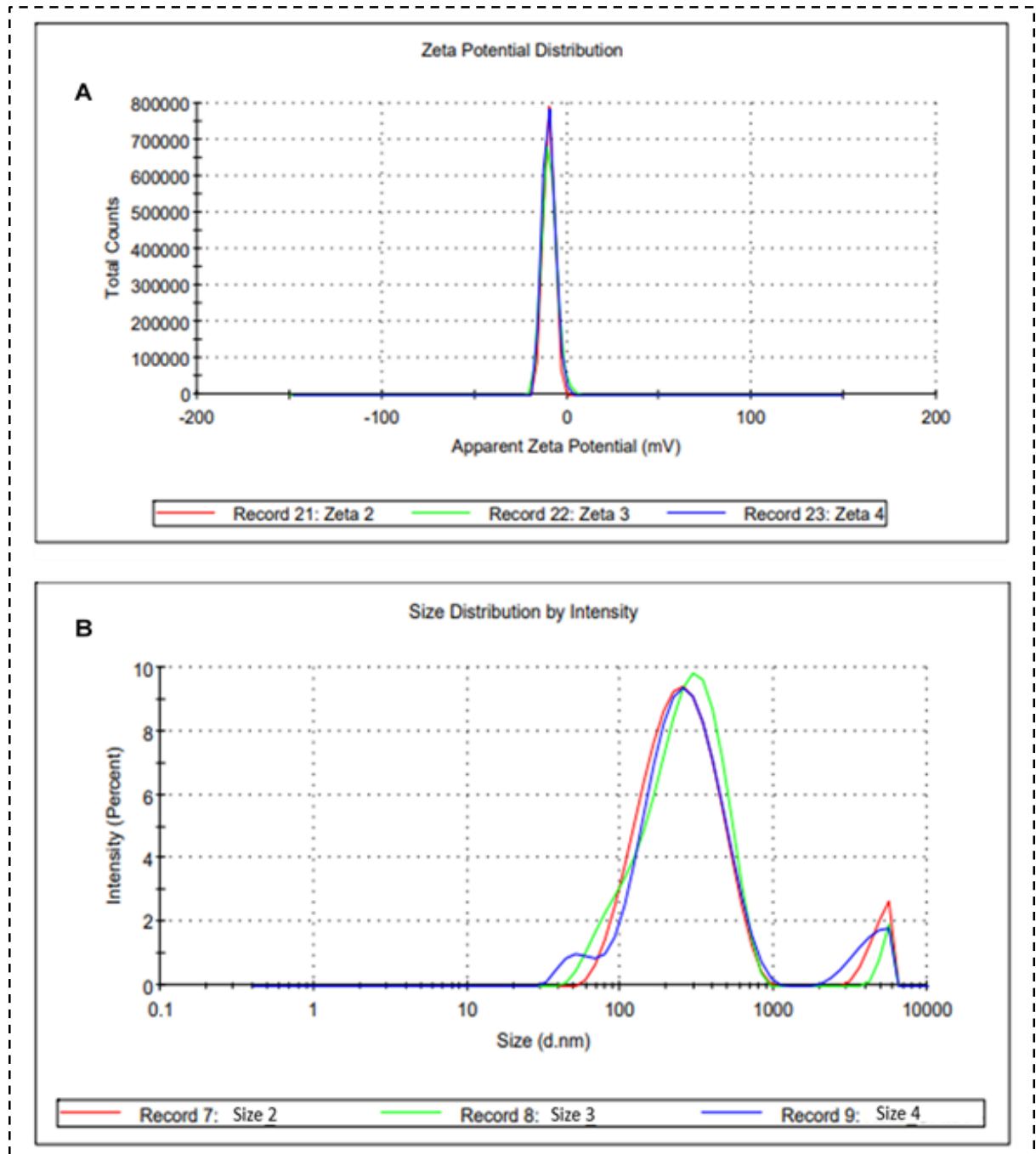
Caracterização físico-química da formulação

A nanoemulsão ideal selecionada foi caracterizada 30 dias após a preparação em termos de tamanho das gotículas ($238,37 \pm 3,96$), homogeneidade (PDI) ($0,38 \pm 0,38$), potencial Zeta ($-9,59 \pm 0,11$), pH ($7,0 \pm 0,00$.) e turbidez ($0,267 \pm 0,00$), como se mostra na Tabela 6 e na Figura 10. A formulação apresentava um tamanho nanométrico, com um PDI que indicava partículas monodispersas e um potencial zeta negativo. Apresentava também um pH neutro e uma turbidez baixa - característica de uma nanoemulsão translúcida.

Tabela 6 - Análise do tamanho das gotículas, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, pH e turbidez das nanoemulsões preparadas com óleo de Açaí após 30 dias de armazenamento.

Amostra	Tamanho da gota (nm)	PDI	Potencial Zeta (mv)	pH	Turbidez (Abs)
NE-OEO	$238,37 \pm 3,96$	$0,38 \pm 0,38$	$-9,59 \pm 0,11$	$7,0 \pm 0,00$	$0,267 \pm 0,00$
Média dos valores $\pm$ Desvio padrão (n=3).					

Figura 10 - Caracterização do tamanho de partícula, índice de polidispersidade e potencial Zeta da nanoemulsão com óleo de semente de *Euterpe oleracea* Mart



A= Potencial Zeta. B = Distribuição de tamanho por intensidade.

Atividade biológica *in vitro* do óleo de semente de açaí e da nanoemulsão à base de óleo de semente de açaí.

Atividade antioxidante

Os resultados demonstram o efeito antioxidante do óleo e sua Nanoemulsão determinado pelo teste DPPH e ABTS comparando com o antioxidante sintético (trolox) onde estão apresentados os valores de que foram obtidos sendo equivalente do Trolox (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito antioxidante equivalente ao Trolox e o EC50 no Óleo e na Nanoemulsão de *Euterpe oleracea* Mart. pelo método do DPPH e ABTS.

Testes	Atividade Antioxidante ($\mu\text{M ET /g}$)*	
	Óleo	Nanoemulsão
DPPH	5,993 ^a $\pm$ 0,1,925	9,993 ^b $\pm$ 0,5092
ABTS	6,567 ^a $\pm$ 0,1667	11,9 ^b $\pm$ 0,2887

Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de t Unpaired
*ET = equivalente do Trolox.

Fonte: Autoria Própria

No teste DPPH, o óleo de açaí apresentou uma atividade antioxidante média de 5,993 $\mu\text{M ET/g}$, enquanto a nanoemulsão apresentou uma atividade antioxidante superior, com uma média de 9,993 $\mu\text{M ET/g}$. Isto sugere que a nanoemulsão do óleo da semente de *E. oleracea* tem uma capacidade antioxidante mais robusta em comparação com o óleo puro de açaí. No teste ABTS, os resultados mostram que o óleo açaí teve uma atividade antioxidante média de 6,567 $\mu\text{M ET/g}$, enquanto a nanoemulsão obteve um valor médio significativamente mais elevado de 11,9 $\mu\text{M ET/g}$. Mais uma vez, isso indica que a nanoemulsão de sementes de açaí tem uma capacidade antioxidante maior do que o óleo.

A Tabela 8 mostra os resultados da atividade antioxidante expressa como a concentração efetiva de 50% (EC50) nos óleos de açaí e nas nanoemulsões de óleo de açaí, usando os métodos DPPH e ABTS, em comparação com Trolox como o antioxidante de referência.

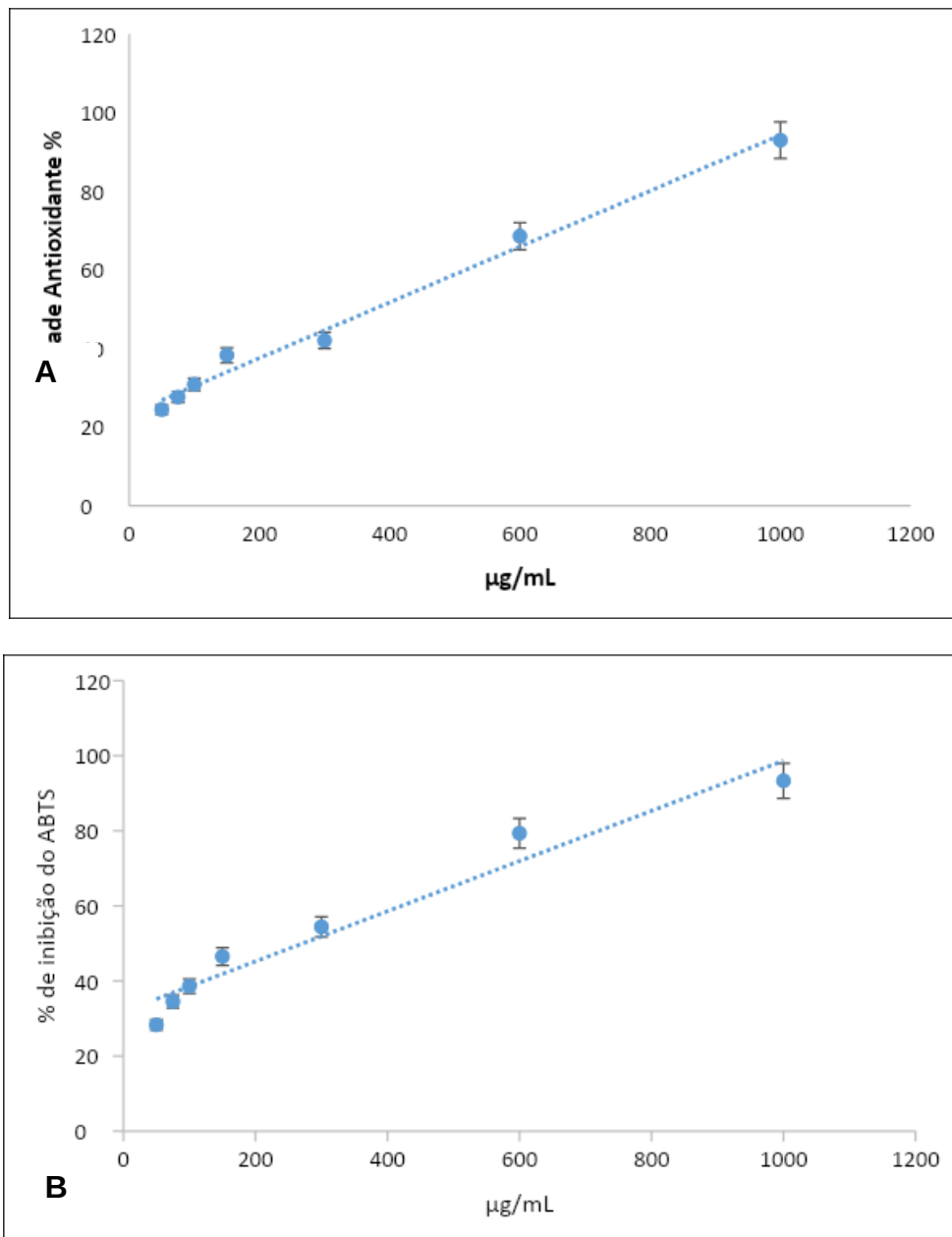
Tabela 8 - Efeito antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) no Óleo e na Nanoemulsão de *Euterpe oleracea* Mart. pelo método do DPPH e ABTS.

Testes	EC50 (µg/mL)		
	Óleo fixo açaí	Nanoemulsão	Trolox
DPPH	375,698 ^a ± 9,054	229,845 ^b ± 10,680	10,132 ^c ± 0,00
ABTS	272,0208 ^a ± 9,913	201,2895 ^b ± 9,849	4,053 ^b ± 0,00

Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de t Unpaired
 Fonte: Autoria Própria

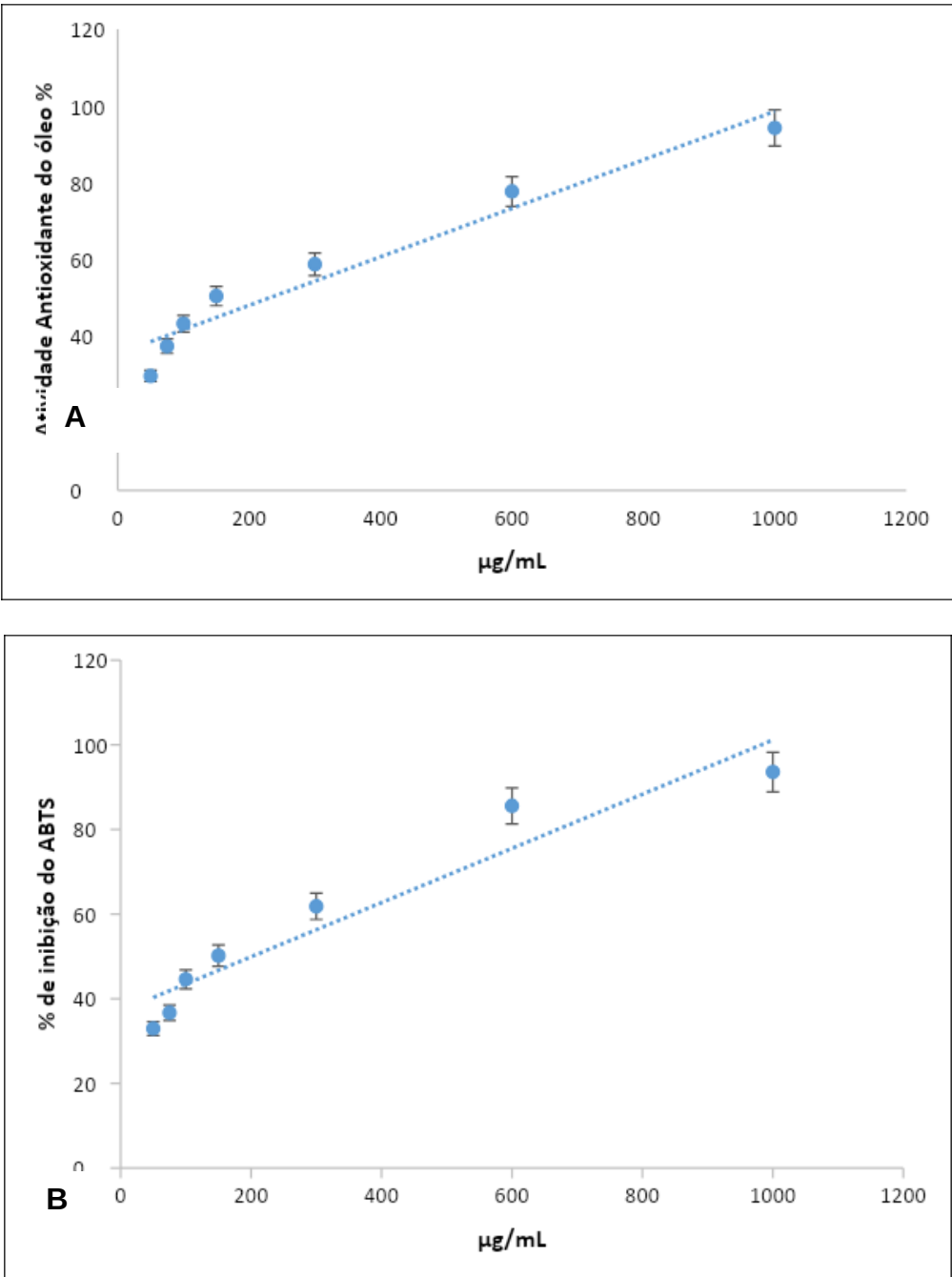
No teste DPPH, o EC50 do óleo de Eo foi calculado em 375,698 µg/mL, enquanto as nanoemulsões de óleo de açaí apresentaram um valor de EC50 significativamente menor, equivalente a 229,845 µg/mL. O Trolox, por outro lado, apresentou um EC50 ainda mais baixo, indicando sua alta capacidade antioxidante em comparação com as amostras naturais (Figura 11 A-B). No teste ABTS, o EC50 do óleo de açaí foi de 272,0208 µg/mL, enquanto as nanoemulsões de óleo de açaí apresentaram um valor de EC50 ainda menor, isto é, medindo 201,2895 µg/mL. O Trolox também apresentou um EC50 significativamente mais baixo em comparação com as amostras naturais (Figura 12 A - B).

Figura 11 - Curva percentual de inibição do radical DPPH e ABTS frente ao óleo e Nanoemulsão de *Euterpe oleracea* Mart.



Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão/ Média
 Fonte: Autoria Própria

Figura 12 - Curva percentual de inibição do radical DPPH e ABTS frente a Nanoemulsão do óleo de Euterpe oleracea Mart.



Valores das médias das triplicatas $\pm$ desvio padrão/ Média
Fonte: Autoria Própria

Efeito do óleo de sementes de *Euterpe oleracea* Mart. na viabilidade de linhagens celulares de células normais e de câncer cervical.

Para avaliar o efeito citotóxico e o efeito antitumoral do óleo, foi realizado o teste de viabilidade celular MTT em linhagem queratinócitos humanos HaCat e duas linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma cervical HeLa (HPV-16) e SiHa (HPV-17) nas concentrações de 0,78 a 100 µg/mL e 0,631, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL, respectivamente (Figura 13 e 14).

Pode-se observar que o óleo do caroço do açaí induziu a proliferação das células HaCat sem toxicidade, mesmo na concentração mais alta. Já nas células HeLa (Figura 14a) e SiHa (Figura (p<0,001)14b), o óleo foi capaz de inibir o crescimento significativamente com padrões semelhantes nas concentrações de 25 e 50µg/mL às 24, 48 e 72 horas. Entretanto, a concentração do óleo a 50 µg/mL foi melhor em todas, mantendo um perfil semelhante ao do controle positivo. Além disso, os resultados sugerem uma seletividade dos compostos, uma vez que as concentrações de 0,631, 12,5 e 100µg/mL mostraram um efeito antiproliferativo baixo.

Figura 13 - Efeito do óleo de sementes de *Euterpe oleracea* Mart. na viabilidade das linhas celulares do cancro do colo do útero.

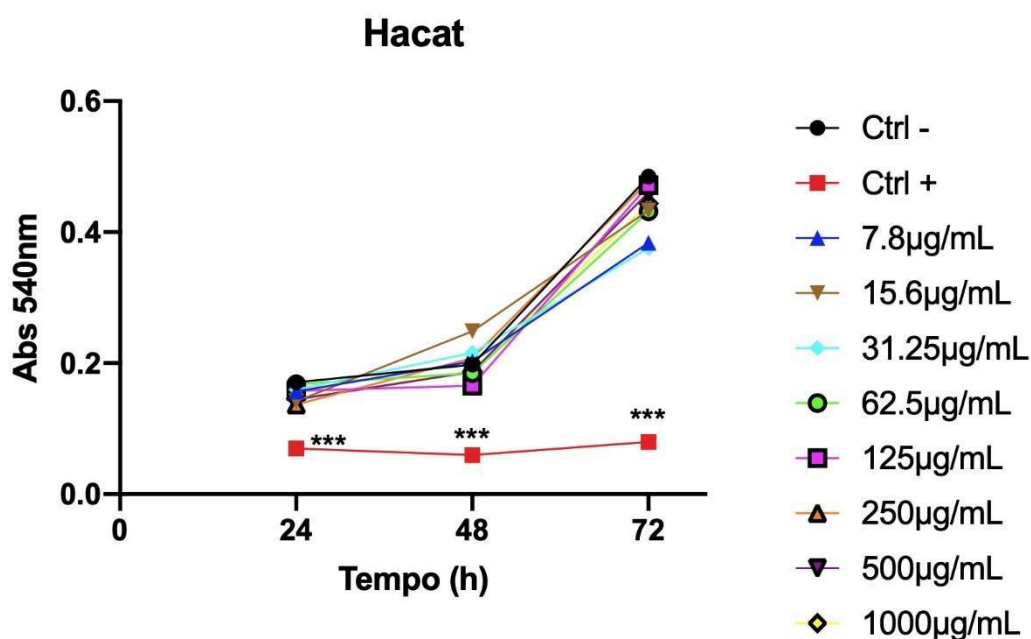
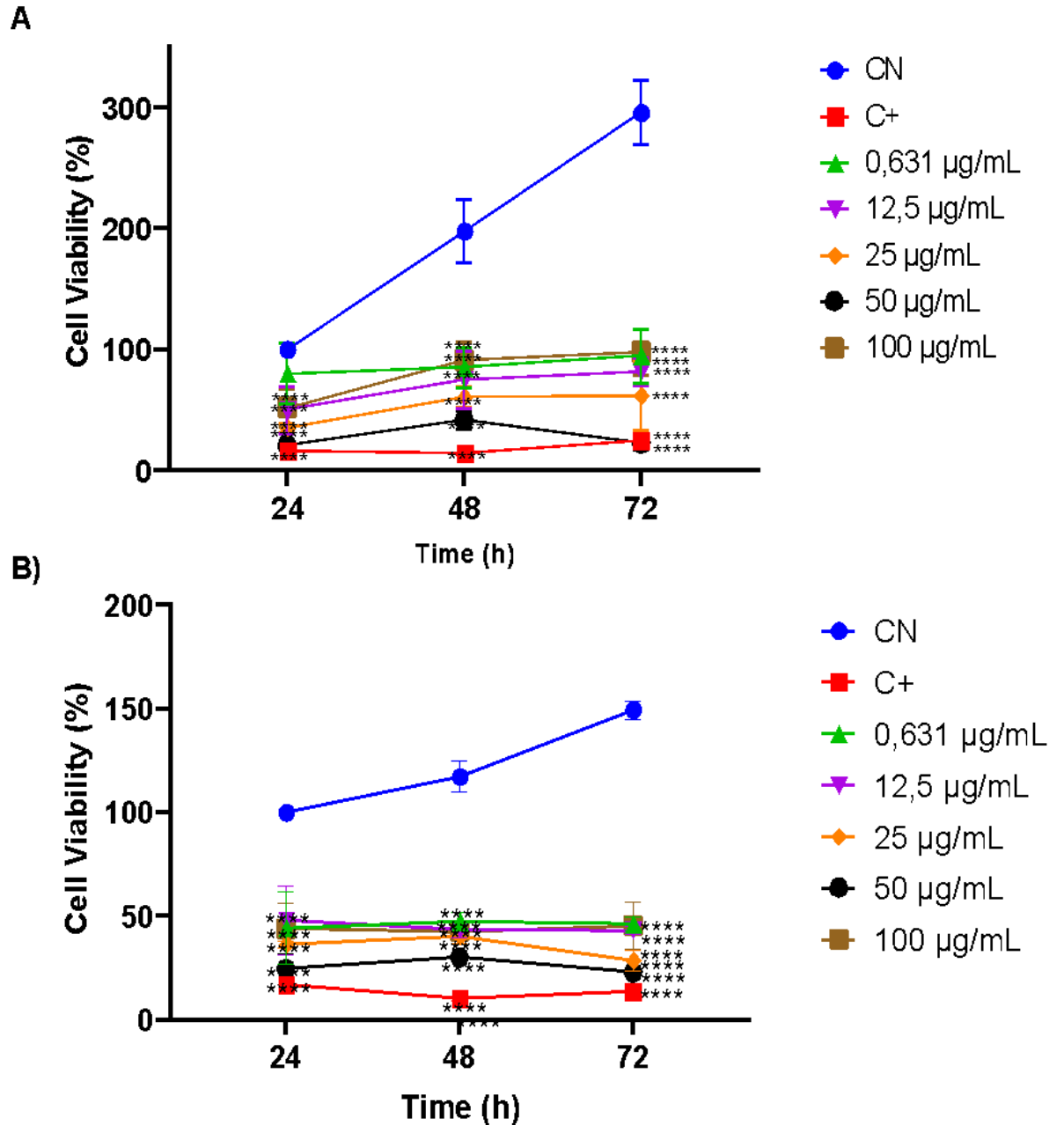


Figura 14 - Avaliação da atividade antitumoral do óleo de *Euterpe oleracea* Mart.. em linhagens celulares de adenocarcinoma do colo do útero, utilizando o ensaio de viabilidade MTT. ANOVA de uma via, pós-teste de Tukey. * $p < 0.001$.



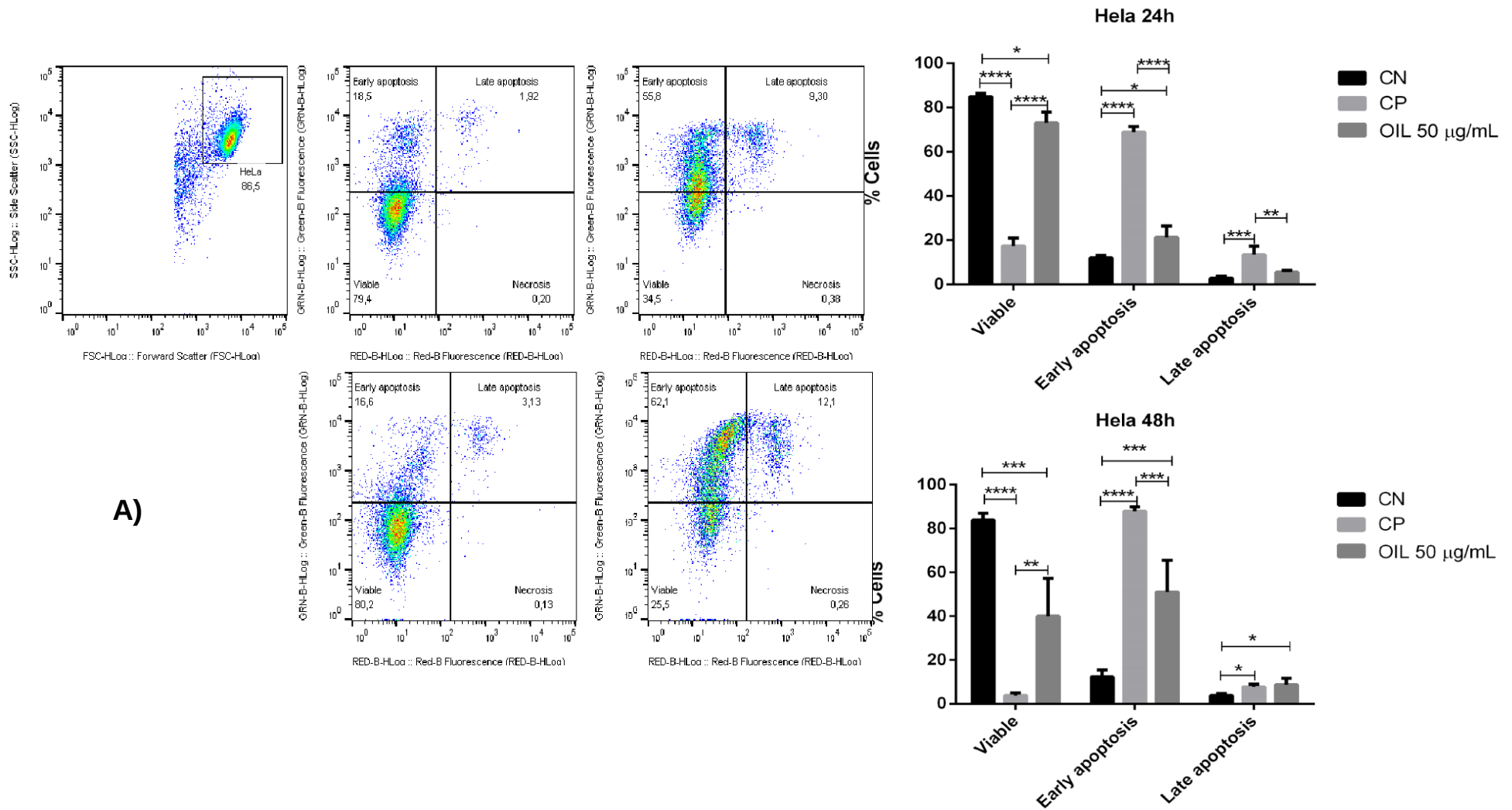
(A) HeLa , (B) SiHa

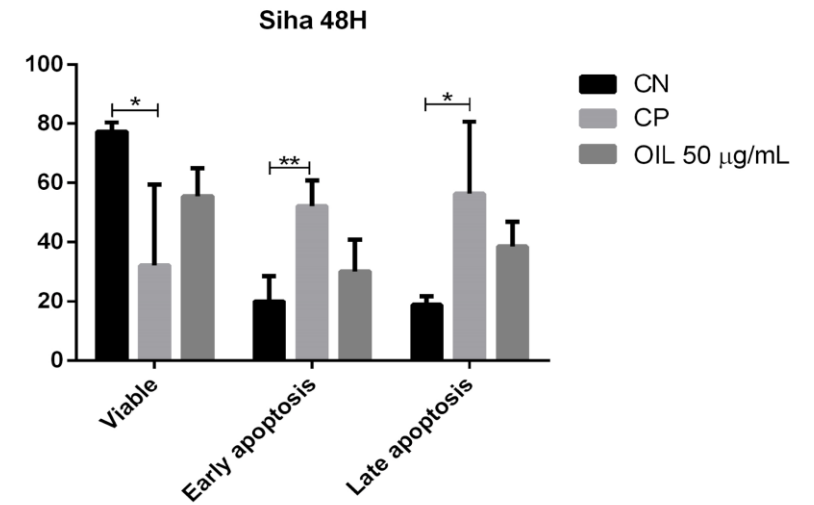
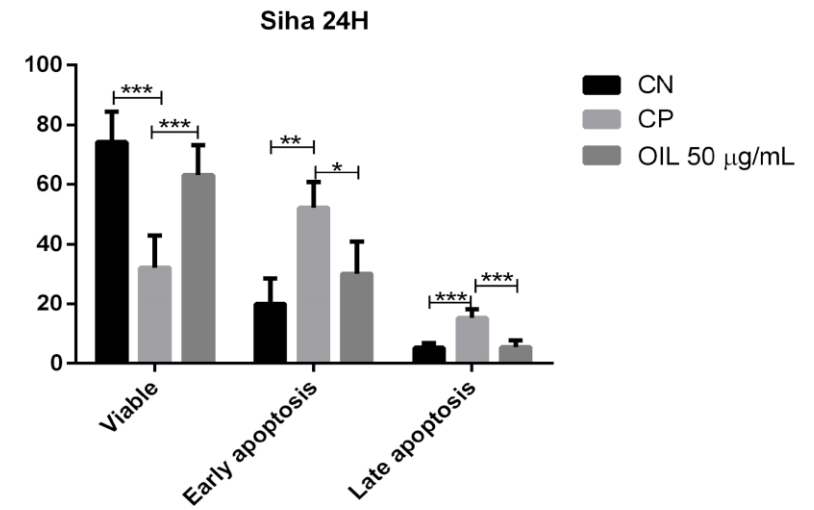
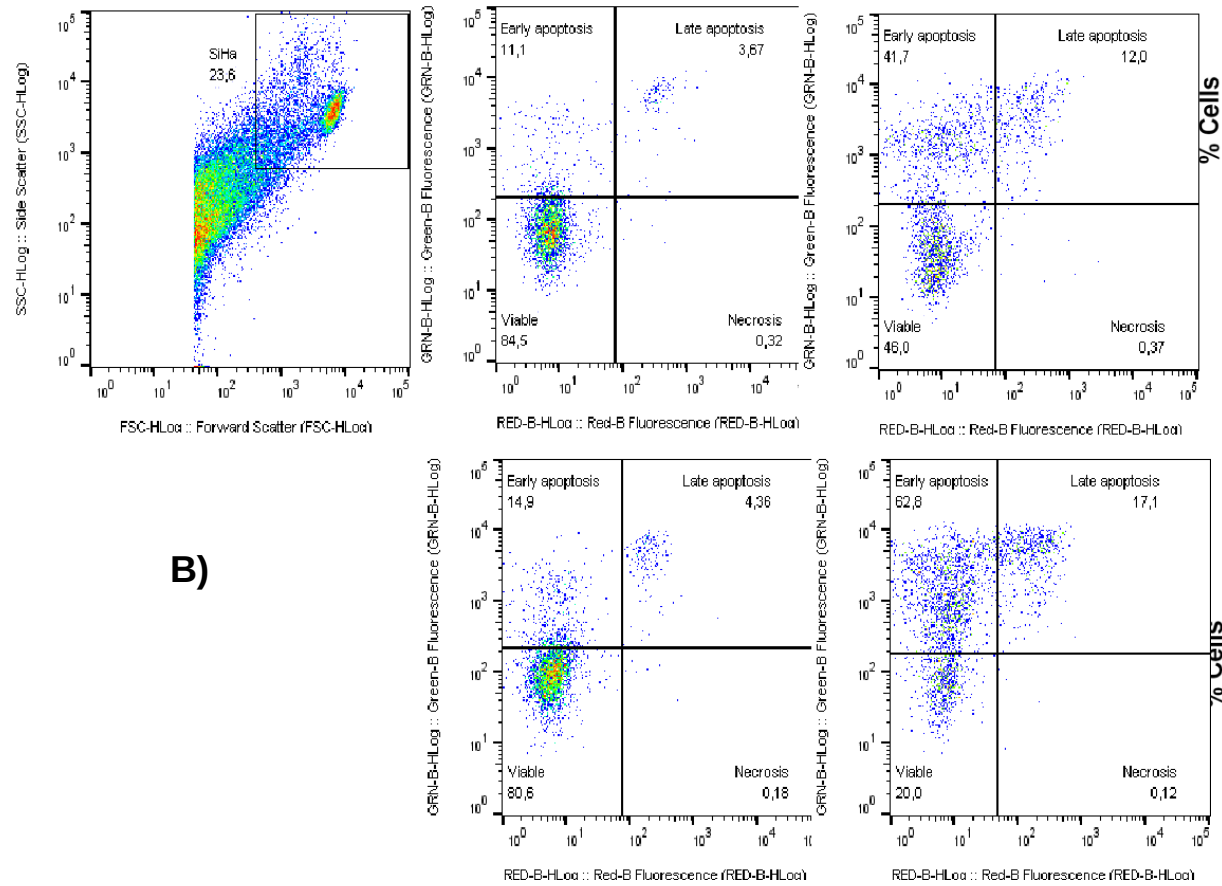
O óleo de semente de açaí induziu a apoptose em linhagens celulares de cancro do colo do útero

Os mecanismos de morte celular foram avaliados utilizando o ensaio Annexin V-FITC/iodeto de propídio (PI), que são dois marcadores para diferenciar a apoptose e a necrose celular. As células, em apoptose precoce, são marcadas com Anexina V (Anexina V+/PI); já as células em apoptose tardia são marcadas com Anexina V e PI, enquanto que as células em necrose são marcadas com PI (Anexina V-/PI+).

Para avaliar o mecanismo de morte induzido pelo óleo de sementes de *E. oleracea*, as células HeLa e SiHa foram incubadas com óleo a 50µg/mL no período de 24 e 48 horas e, em seguida, foram marcadas com anexina e PI. Os dados, ilustrados na figura 16, mostram que o óleo (50µg/mL) diminuiu o número de células viáveis em comparação com o controle negativo. Os dados mostram que, nos períodos de 24 e 48 horas, a apoptose inicial ocorreu de forma significativa, com 55,8% em HeLa (Figura 15-A) e 41,7% em SiHa (Figura 15-B) e 62,1% em HeLa de 48 horas (Figura 16-A) e 68,8% em SiHa (Figura 15-B). Embora a apoptose tardia tenha sido baixa, os resultados foram significativos ($p < 0,05$), com HeLa 9,3% (Figura 15-A) e SiHa 17,1 (Figura 15-B).

Figura 15 - Avaliação da morte celular induzida pelo óleo de semente de açaí (50ug/mL) em linhagens celulares de cancro do colo do útero (24 e 48h) HeLa e SiHa. * $p < 0,005$, *** $p < 0,001$





O óleo de semente de açaí induz alterações morfológicas nas linhagens celulares de cancro do colo do útero

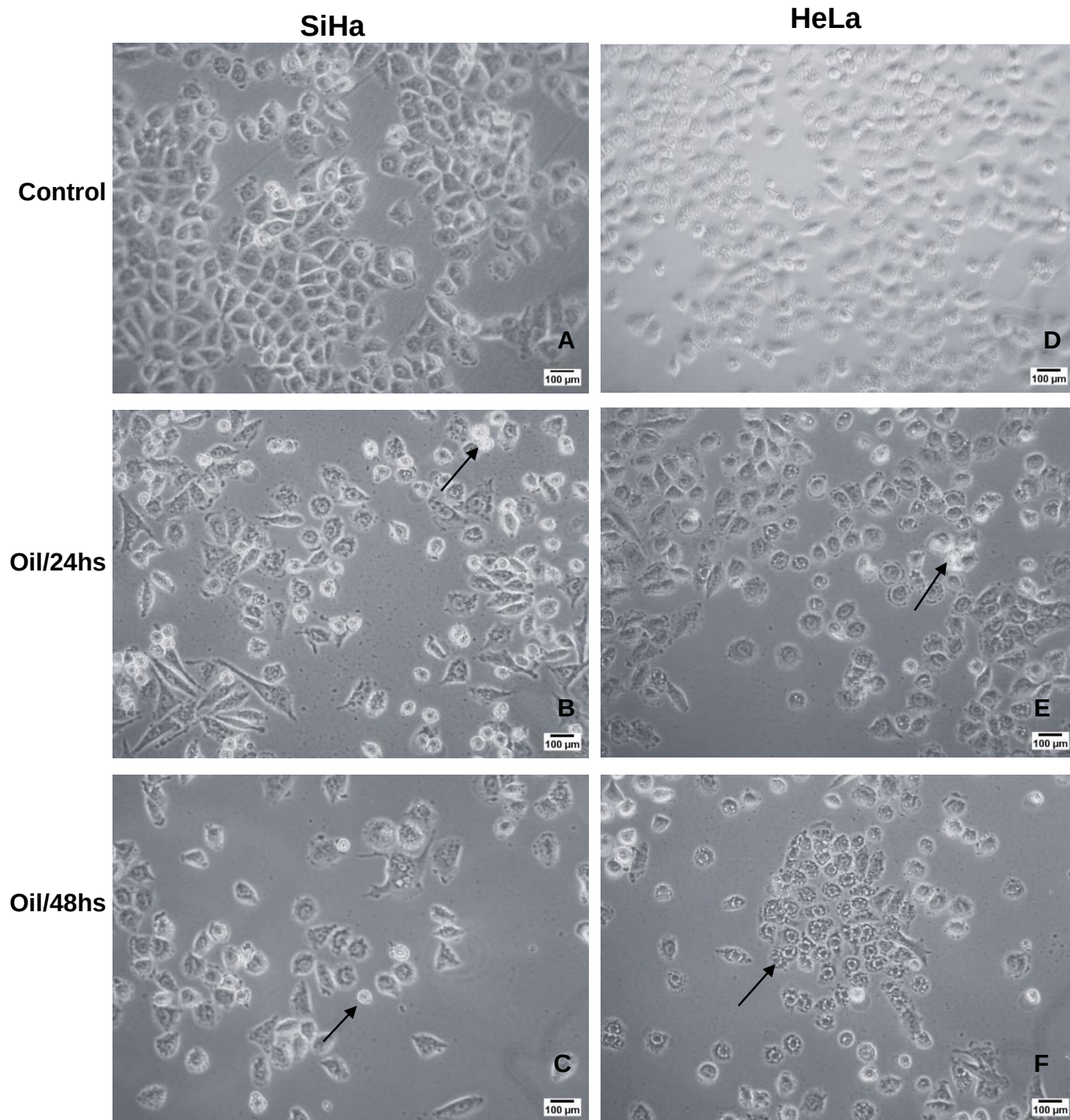
A morfologia das linhagens celulares SiHa e HeLa tratadas com óleo de semente de *E. oleracea* Mart. foi observada num microscópio de contraste de fase invertido e analisada quanto à área de superfície e ao perímetro utilizando o software ImageJ. As células de controle apresentaram uma morfologia típica com células alongadas, crescimento em monocamada e aderência umas às outras (Figura 16 A e B).

As duas linhagens celulares tratadas com o 50µg/mL do óleo durante 24 e 48 horas apresentaram alterações morfológicas. As alterações observadas demonstraram retração celular, formação de área circular clara, ao redor do núcleo, e uma redução do tamanho - sugerindo formação de vesículas (Figura 16 C, B, E e F). Registrou-se um aumento da área de superfície e do perímetro nas células tratadas (Tabela 9). As células HeLa não tratadas (controle) apresentaram uma área de $53,8 \pm 30,0 \mu\text{m}^2$ e um perímetro de $28,0 \pm 9,9 \mu\text{m}^2$, enquanto as células HeLa tratadas durante 24 e 48 horas apresentaram uma área de $430,6 \pm 14,4 \mu\text{m}^2$, $60,6 \pm 19,7 \mu\text{m}^2$ e um perímetro de $72,7 \pm 11,9 \mu\text{m}^2$, $27,4 \pm 4,7 \mu\text{m}^2$, respetivamente. As células SiHa não tratadas (controle) apresentaram uma área de $72,2 \pm 16,5 \mu\text{m}^2$ e um perímetro de $33,7 \pm 5,9 \mu\text{m}^2$, enquanto as células SiHa tratadas 24 e 48 horas desenvolveram uma área de $220,6 \pm 89,24 \mu\text{m}^2$, $60,35 \pm 29,9 \mu\text{m}^2$ e um perímetro de $57,57 \pm 19,96 \mu\text{m}^2$ e $27,0 \pm 6,2 \mu\text{m}^2$, respetivamente. Comparando os tratamentos com o controle, verificou-se uma alteração no tamanho das células tratadas e um aspecto rugoso na superfície celular, o que pode indicar uma perda de material citoplasmático.

Tabela 9 - Medidas morfológicas das células HeLa e SiHa, após tratamento com óleo da semente de *E. oleracea* Mart.

Morfologia	Controle		Tratamento			
celular	HeLa	SiHa	HeLa24hs	HeLa 48hs	SiGa 24hs	SiTe 48hs
Área	53,8±30,0µm ²	72,2±16,5 µm ²	430,6±14,4µm ²	60,6±19,7 µm ²	220,6±89,24 µm ²	60,35±29,9 µm ²
Perímetro	28,0±9,9µm ²	33,7±5,9µm ²	72,7±11,9 µm ²	27,4±4,7 µm ²	57,57±19,96 µm ²	27,0±6,2 µm ²

Figura 16 - Alterações morfológicas induzidas pelo óleo da sementes de *E. oleracea* nas linhagens celulares SiHa e HeLa



Fonte: Autoria Própria

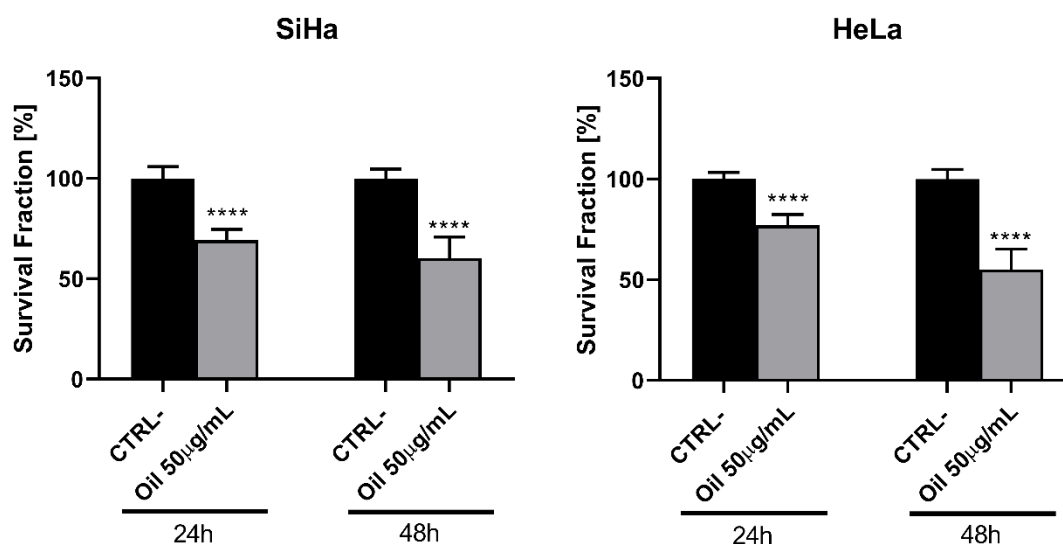
O óleo de semente de açaí exerce efeitos sobre a capacidade clonogênica de linhagens celulares de cancro do colo do útero

O ensaio de formação de colônias avalia a capacidade das células em sobreviver e proliferar sob tratamento, para que se possa investigar a progressão de um tumor; podendo este ensaio revelar a possibilidade de tratamentos oncológicos e medicamentos (QUIAN *et al.*, 2023).

Desta forma, foi observado o efeito do óleo na redução da viabilidade celular, na formação de novas colônias e no comportamento da colônia em se manter após a retirada do tratamento. Foram utilizadas as linhagens SiHa (A) e HeLa (B) tratadas com 50µg/mL de óleo durante 24-48 horas.

Como se pode observar na figura 17, o óleo (50µg/mL) teve um efeito inibidor significativo ($p < 0,001$), quando comparado com o controle, na capacidade de formar colônias tanto para SiHa (figura 17- A) como para HeLa (figura 17-B) sugerindo que o número de células por clone reduziu à medida que o tempo aumenta.

Figura 17 - -Efeito do óleo de Euterpe oleracea Mart na capacidade clonogênica das linhagens celulares SiHa e HeLa. **** $p < 0,0001$.



O óleo de semente de açaí diminui a invasão e a migração de linhagens celulares de câncer cervical HeLa e SiHa através do ensaio *wound healing*.

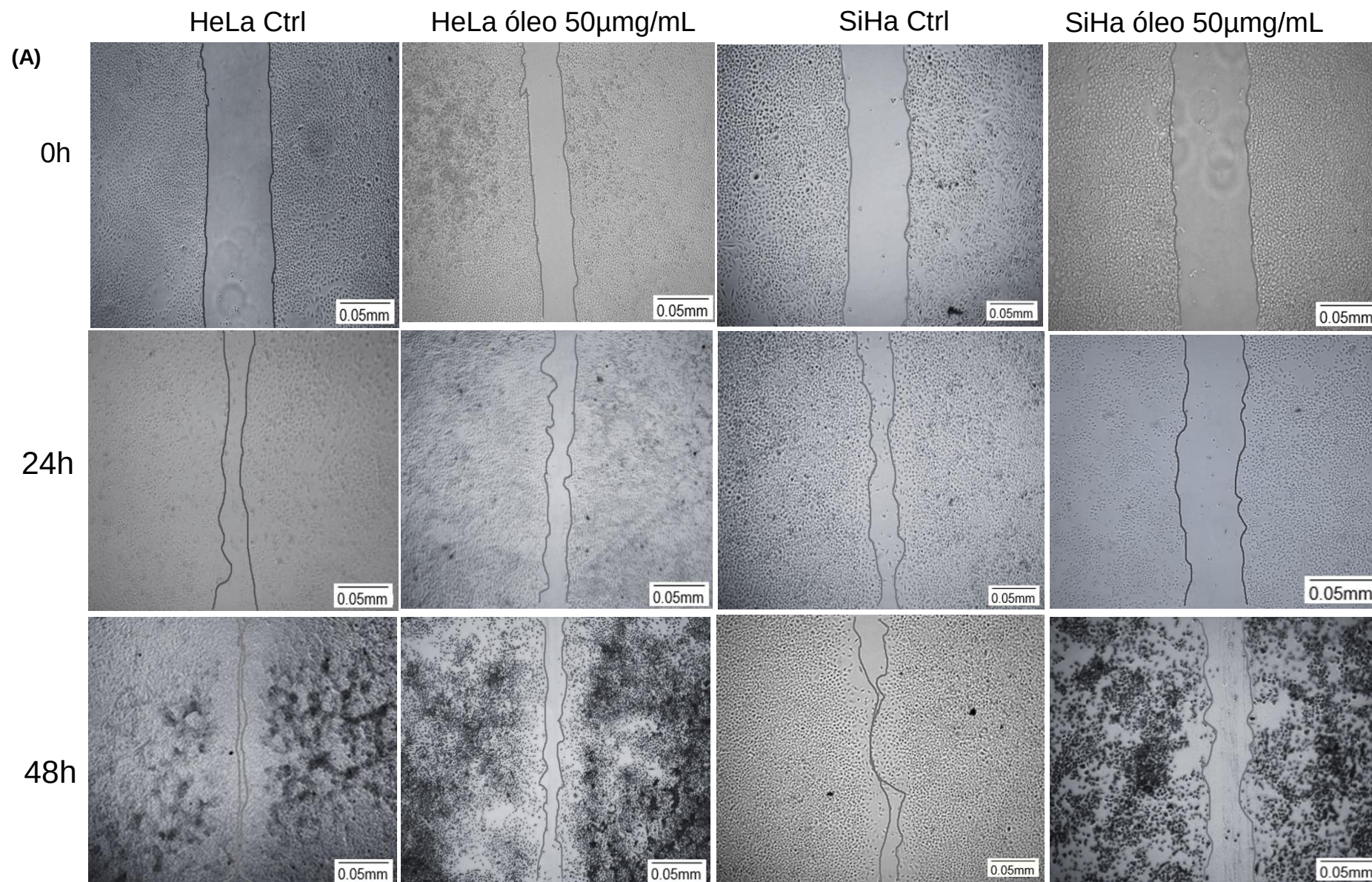
A partir desse ensaio é possível avaliar a taxa de migração das células, em uma ranhura, em monocamada confluyente *in vitro*. Assim, a migração celular pode ser quantificada usando a distância média da largura do sulco entre as suas bordas. Para isso, foi utilizado o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD), medindo manualmente as imagens tiradas às 0 horas e após 24 e 48 horas de tratamento. A área da lesão foi determinada em milímetros (mm).

Após 24h e 48h de cicatrização, o ensaio de cicatrização de feridas mostrou que as células HeLa e SiHa não tratadas (Ctrl) foram capazes de cobrir $\cong 70\%$ e 99% da ferida em 48h. A migração celular média foi de 126 células para HeLa em 24 horas e 181 células para SiHa, enquanto a migração celular média em 48 horas foi >1000 para HeLa ($p>0,001$, $n=15$, Figuras 18A e 18B) e 761 células ($p>0,001$, $n=15$, Figuras 18A e 18B) para SiHa.

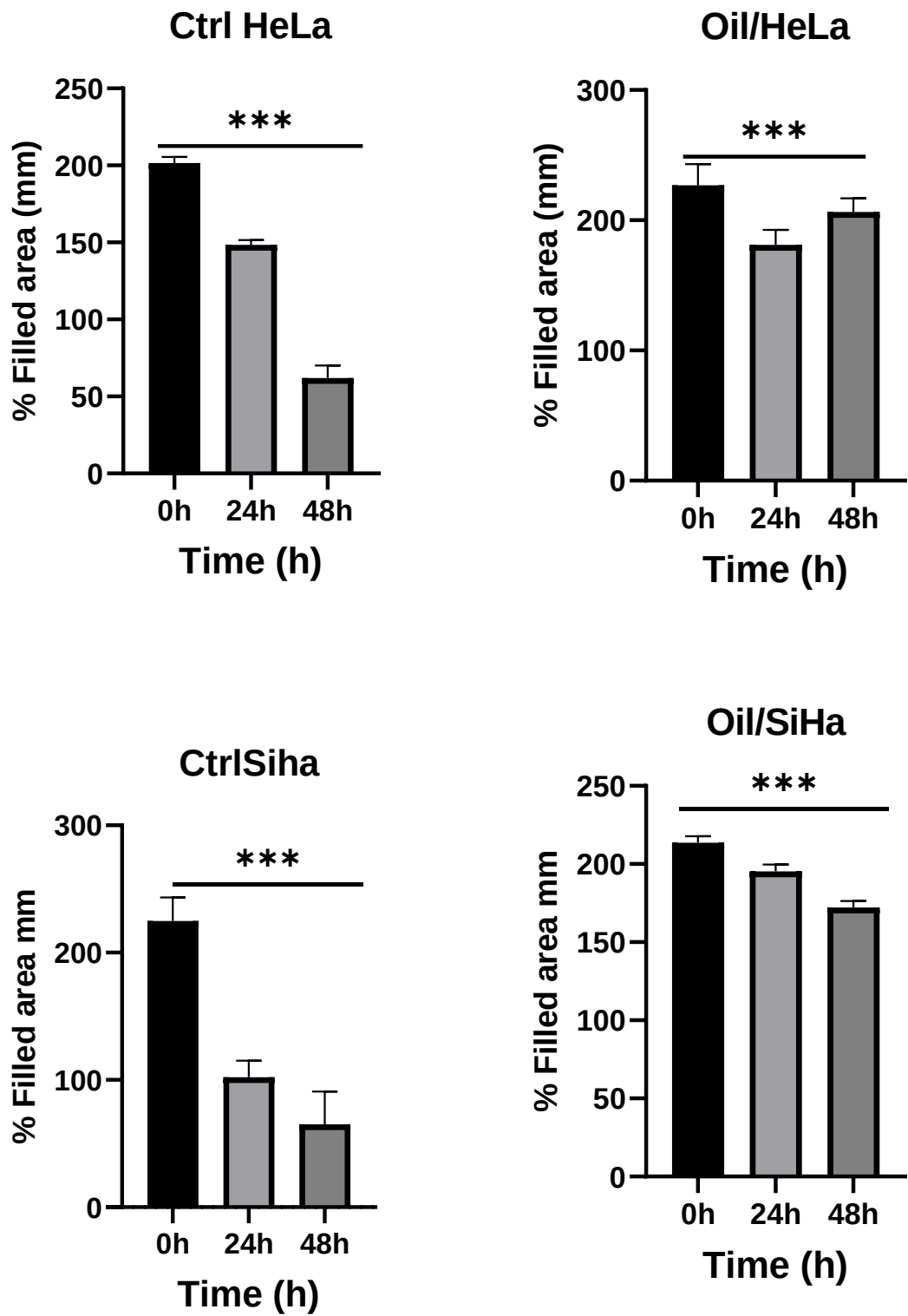
Nas células tratadas com óleo, o número de células migratórias foi reduzido e a ferida não fechou. Apenas 47 células foram contadas em 24 horas em HeLa e 71 em SiHa na área da cicatriz; enquanto que, em 48 horas, a média foi de 18 células contadas em HeLa e SiHa ($p>0,001$, $n=15$, Figura 18 A e B).

A Figura 18B mostra ainda que não houve migração celular suficiente para fechar a cicatriz nas células tratadas (Óleo) em 24 e 48 horas, mostrando semelhança com a área (mm) no tempo 0h para ambas as células. Nas células não tratadas (Ctrl), a migração celular, em direção à cicatriz, reduziu o tamanho da área da cicatriz (mm).

Figura 18 - O óleo de sementes de *E. oleracea* Mart. regula a invasão e a migração das células do cancro do colo do útero. Análise da migração celular em HeLa e SiHa*** $p < 0.001$



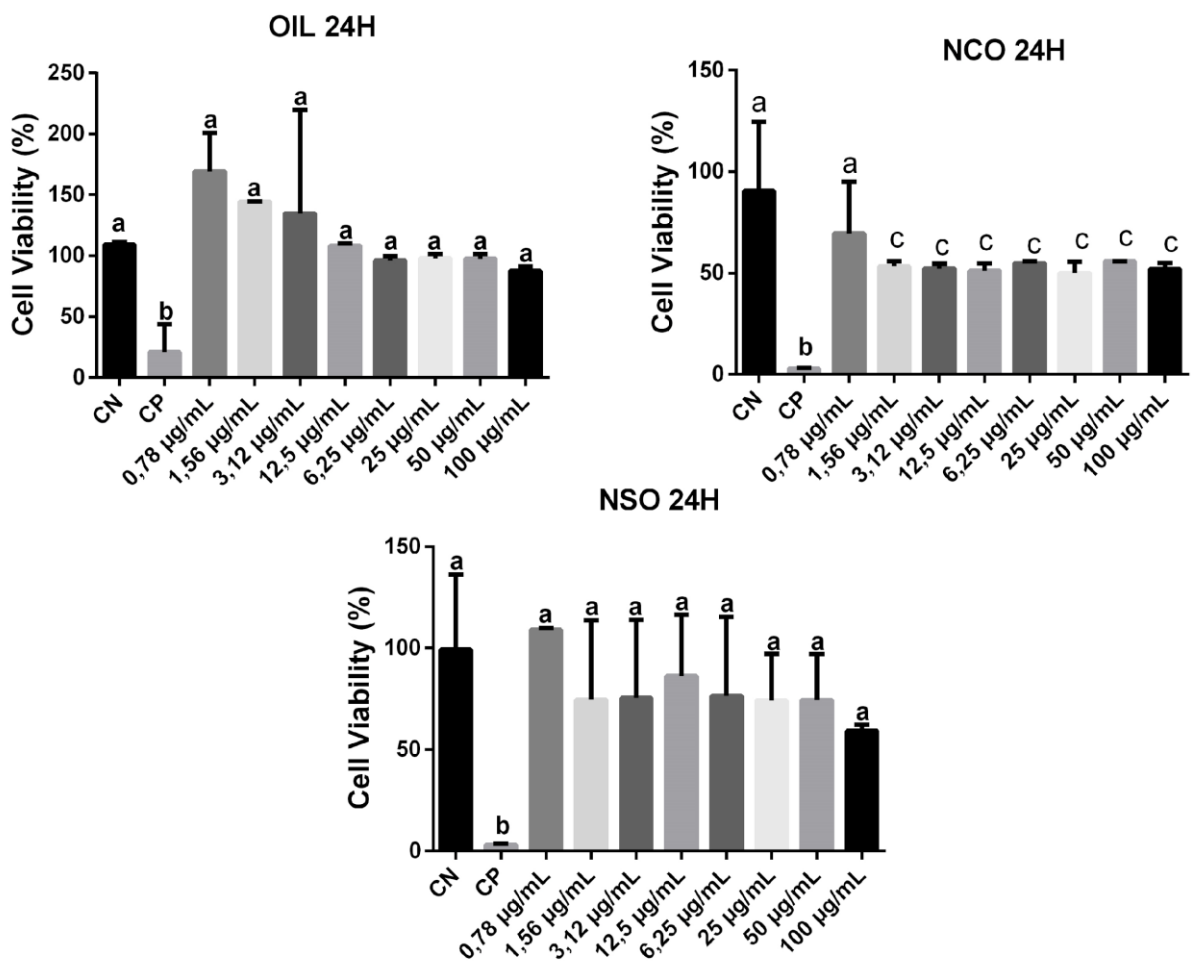
(B)



Avaliação da citotoxicidade em células RAW 264.7

O teste MTT foi usado para verificar a citotoxicidade em células RAW 264.7 tratadas com óleo de semente de açaí (OIL), nanoemulsão de óleo (NCO) e nanoemulsão sem óleo (NSO) (Figura 19). O óleo e a nanoemulsão sem óleo não foram citotóxicos para as células Raw 264.7. nas concentrações de 0,78 a 100 µg/mL.

Figura 19 - Efeito do óleo e da nanoemulsão da semente de *Euterpe oleracea* mart na viabilidade celular de macrófagos



Atividade biológica in vivo do óleo de semente de açaí e da nanoemulsão baseada no óleo de semente de *E. oleracea*.Mart.

O óleo de semente de açaí e a nanoemulsão de açaí não reduziram significativamente o corpo e os órgãos dos ratos

Não houve diferença estatisticamente significativa no peso absoluto do baço dos animais entre os grupos (Figura 21- a,b). No entanto, foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando se considera o peso relativo do baço em relação ao peso corporal total. Neste sentido, verificou-se uma diminuição do peso relativo do baço no grupo tratado com a nanoemulsão, em relação ao grupo de controle negativo, indicando uma redução do tamanho relativo do baço na presença da nanoemulsão (Figura 21 - a, b)

Em relação aos resultados do peso absoluto do fígado (Figura 22 - c, d), observamos uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle negativo e o grupo tratado com óleo de semente de açaí, sendo que este último apresentou um peso hepático maior em relação ao controle. Da mesma forma, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com o óleo e o grupo tratado com a nanoemulsão. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controle e o grupo tratado com a nanoemulsão. Ao analisar o peso relativo do rim (Figura 22 - e,f), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; indicando que os tratamentos não afetaram o tamanho relativo do fígado em relação ao peso corporal. Ao analisar os resultados para o peso absoluto e relativo dos rins, não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Portanto, os resultados das análises do peso absoluto e relativo de órgãos como baço, fígado e rim indicam respostas diferentes aos tratamentos administrados, mas não necessariamente indicam toxicidade.

Figura 20 - Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na variação de peso dos animais no final do tratamento. (a) e na cinética do peso ao longo do tratamento. (b). A análise estatística foi efectuada através de um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$

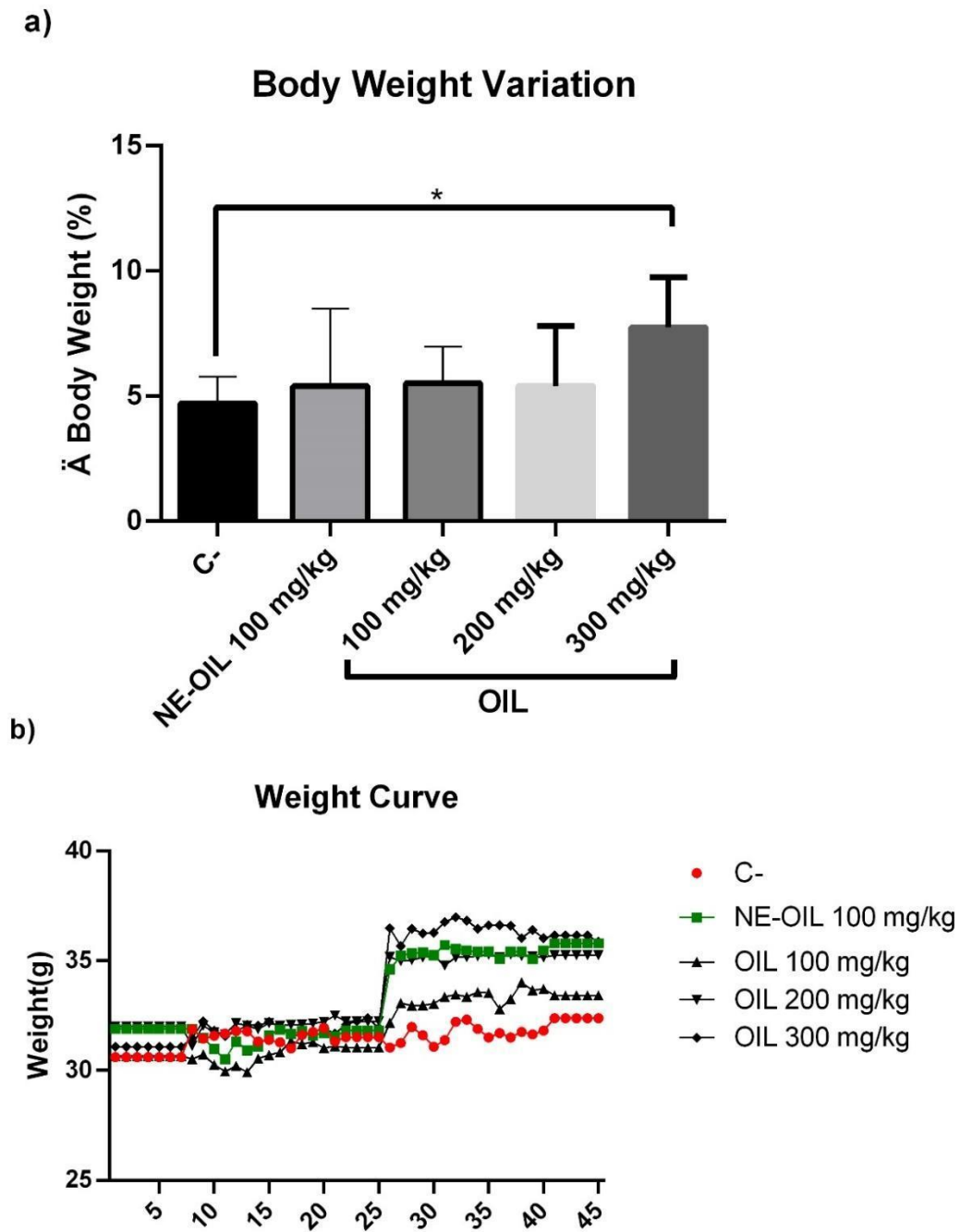
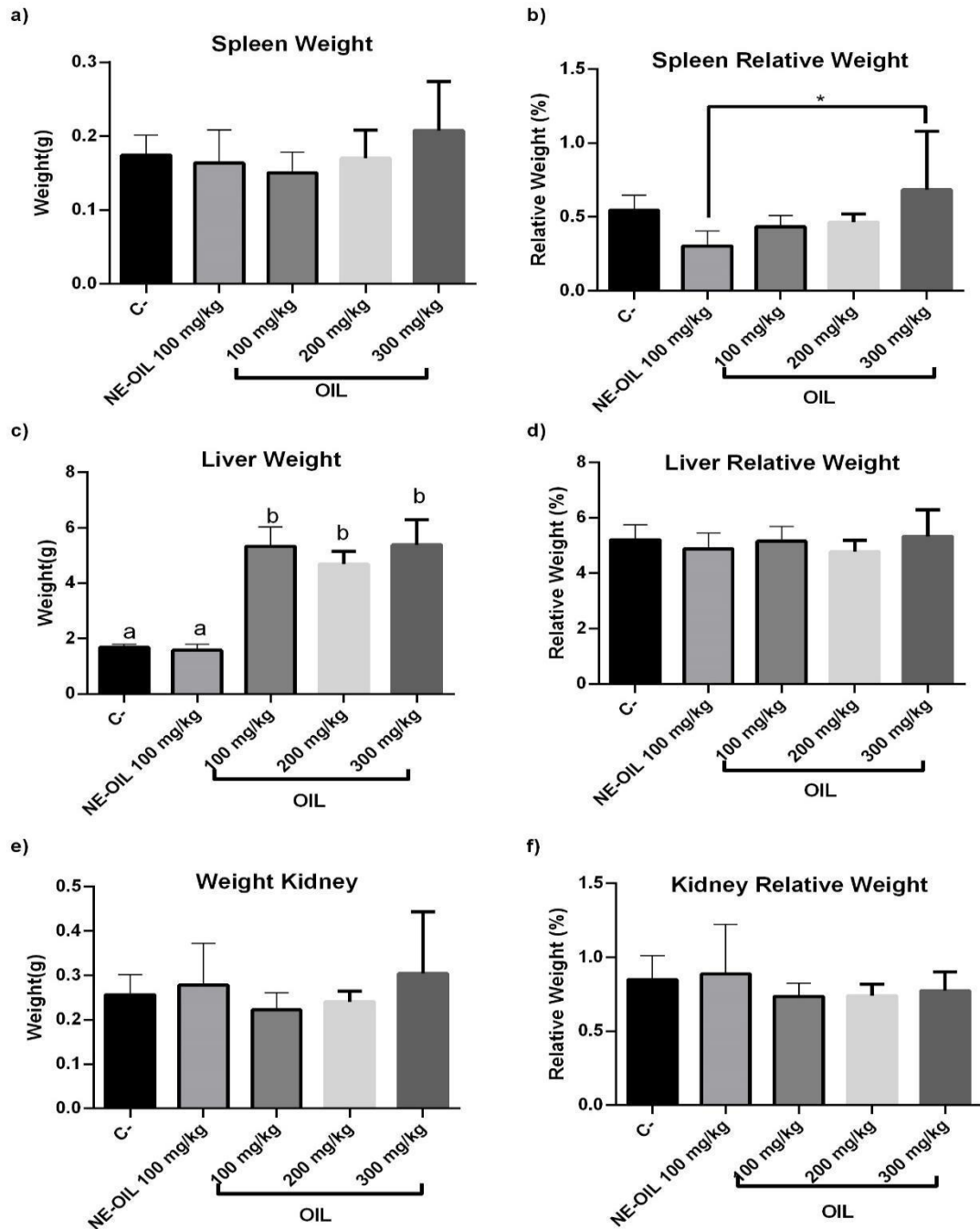
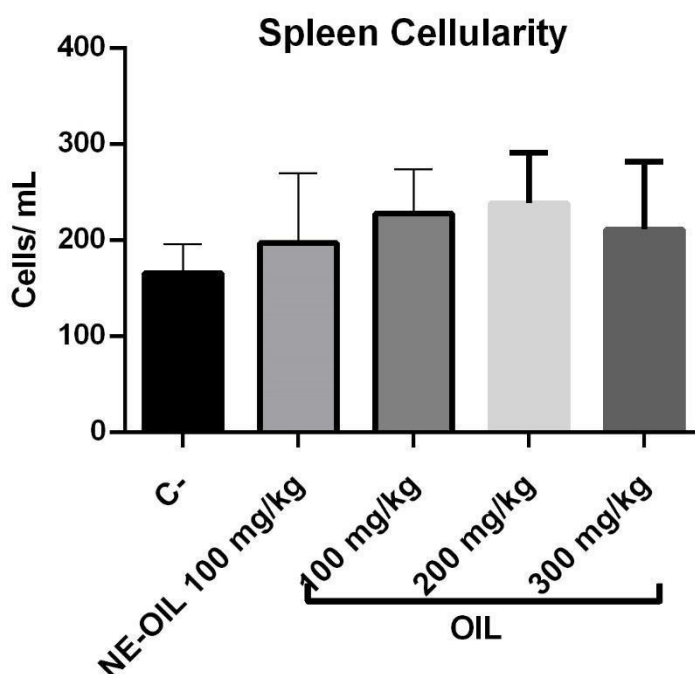


Figura 21 - Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na variação de peso dos animais no final do tratamento. (a) e na cinética do peso ao longo do tratamento. (b). A análise estatística foi efetuada através de um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$.



Observa-se na figura 22 que o óleo e a nanoemulsão não reduziram o número de células do baço. No entanto, as concentrações 100 e 200 mg/kg do óleo aumentaram a celularidade do baço.

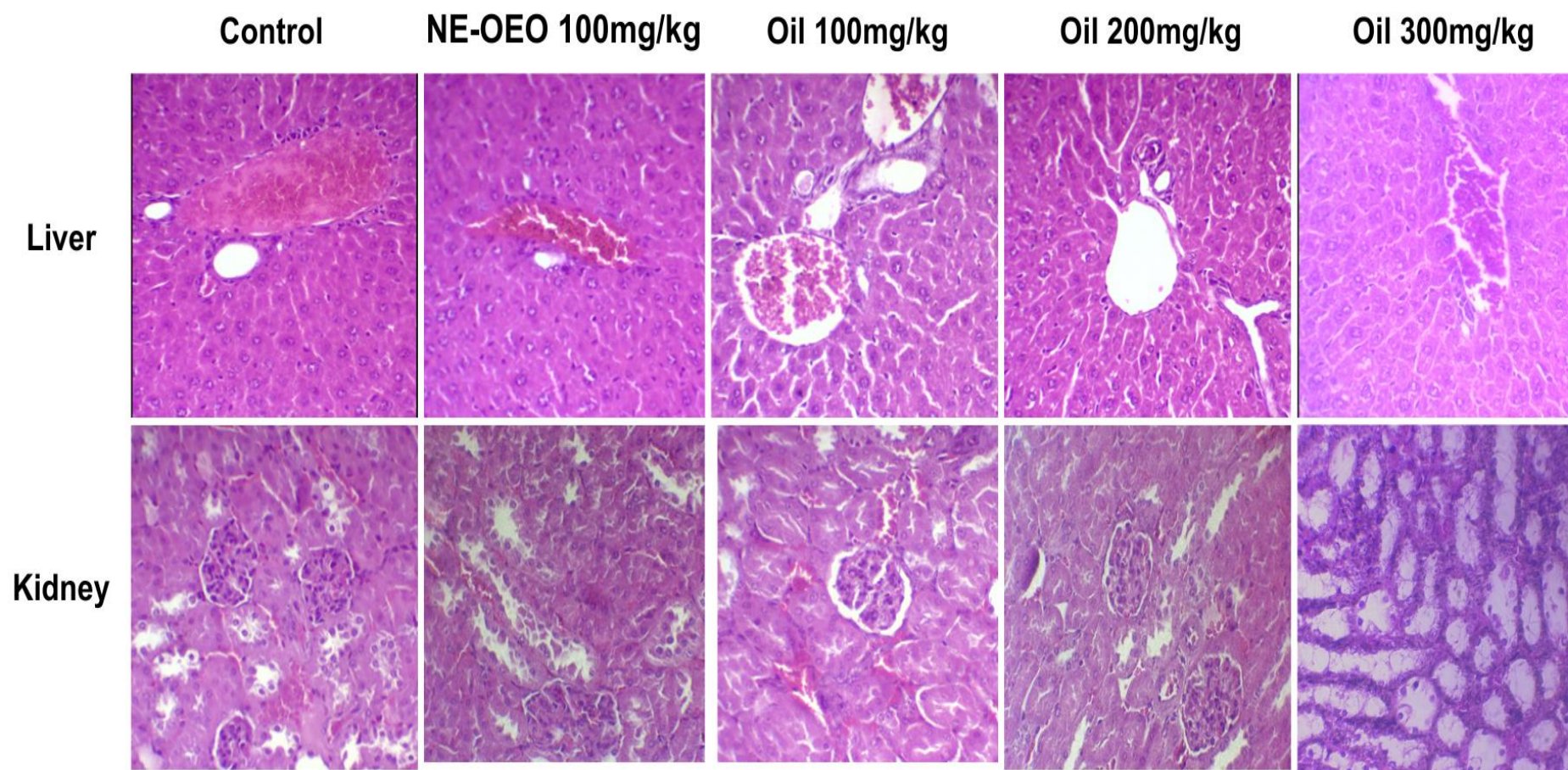
Figura 22 - Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na variação de peso dos animais no final do tratamento. A análise estatística foi efectuada utilizando um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas com um valor de $p < 0,05$.



Avaliação da toxicidade do óleo e NE-OEO *in vivo*

Para avaliar os efeitos tóxicos dos óleo e NE-OEO, concentrações variadas do óleo e NE-OEO foram testadas em camundongos Swiss fêmeas. Neste ensaio não foram observadas alterações nos grupos tratados, os quais foram considerados dentro dos padrões normais em comparação com grupo controle (Figura 23).

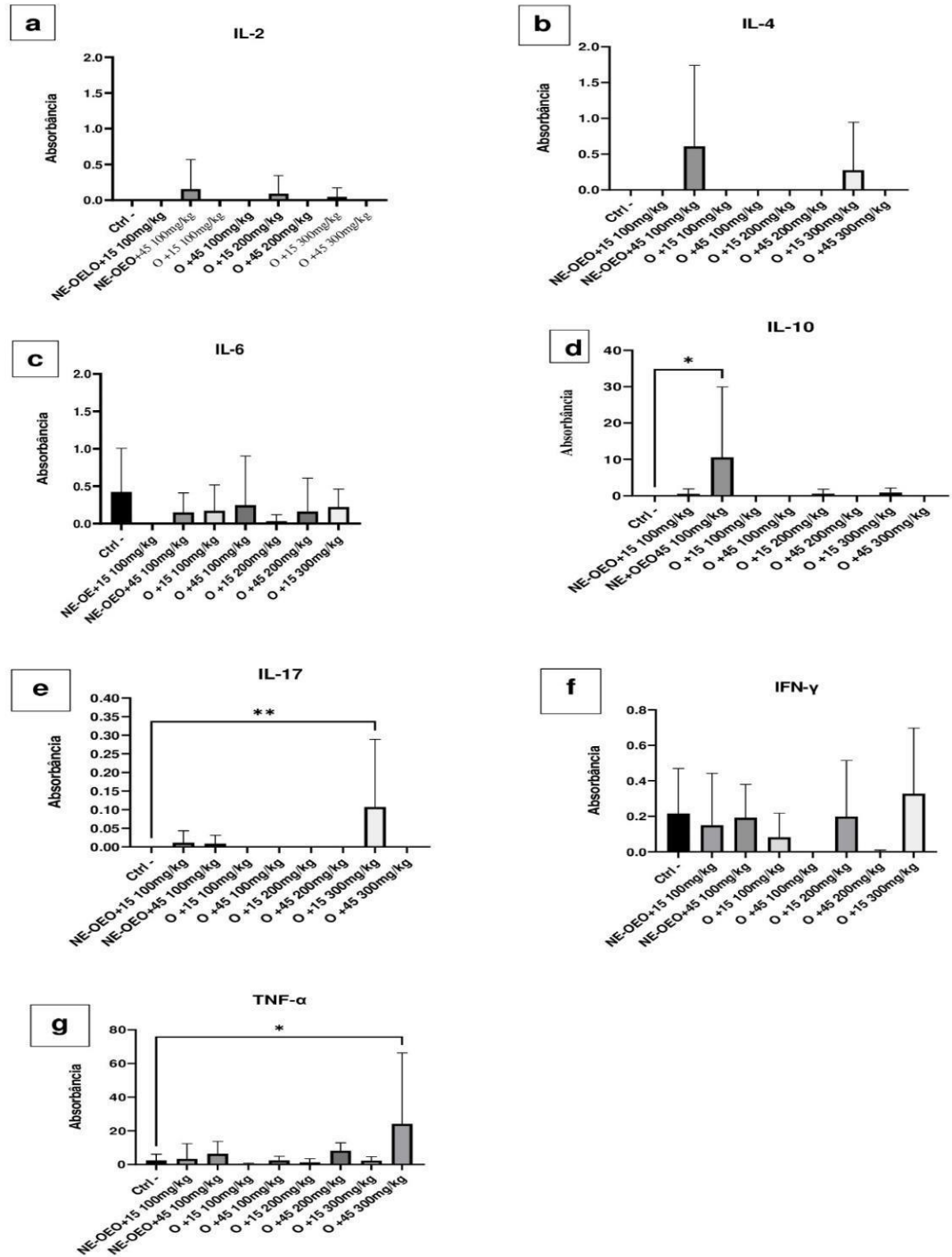
Figura 23 - Secções histológicas do fígado e do rim de Camundongo Swiss fêmeas tratados com óleo de sementes de *Euterpe oleracea* Mart. Coloração com hematoxilina e eosina (HE).



O óleo de semente de açaí e a nanoemulsão de semente de açaí exercem efeitos imunomoduladores

Comparando o efeito do óleo e da NE-OEO na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, observa-se que houve uma leve indução de IL-2, com a NE-OEO aos 45 dias e o óleo 200 mg/kg aos 15 dias (Figura 25-a). Do mesmo modo, na figura 14-b, aos 45 dias, a NE-OEO e o óleo 300 mg/kg induziram IL-4. A Figura 25-c mostra uma ligeira expressão de IL-6, com NE-OEO aos 45 dias, 100 mg/kg de óleo aos 15 e 45 dias, 200 mg/kg de óleo aos 45 dias e 300 mg/kg de óleo aos 15 dias. Verificou-se, então, uma expressão significativa ($p < 0,05$) de IL-10 (Figura 25-d) quando comparada com o controle para NE-OEO aos 45 dias de tratamento. A Figura 25-e mostra que o óleo (300 mg/kg) induziu significativamente ($p < 0,05$) a IL-17. O NE-OEO e o óleo induziram discretamente IFN- γ , com o NE-OEO a induzi-lo em ambos os períodos de tratamento, 15 e 45 dias, enquanto o óleo 100mg/kg, 200 mg/kg e o óleo 300 mg/kg apenas o induziram em 15 dias (figura 25-f). A figura 10-g mostra que o óleo 300mg/mL expressou significativamente ($p < 0,05$) o TNF- α após 45 dias de tratamento.

Figura 24 - -. Efeito de 100, 200 e 300mg/kg de óleo e nanoemulsão (NE-OEO) na expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A análise estatística foi efetuada utilizando um teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação à IFN- γ , com a NE-OEO a induzi-la em ambos os períodos de tratamento, 15 e 45 dias, enquanto o óleo 100mg/kg, 200mg/kg e o óleo 300mg/kg apenas a induziram em 15 dias (figura 25f). A figura 25-g mostra que o óleo 300mg/mL expressou significativamente ($p<0,05$) o TNF- α após 45 dias de tratamento



6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o potencial biotecnológico do óleo da semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e de sua nanoemulsão através da caracterização química, dos parâmetros físico-químicos e dos ensaios *in vitro* - nos quais avaliou-se a atividade antioxidante, antitumoral frente às linhagens de celulares de câncer cervical HeLa e SiHa e o efeito citotóxico em linhagens celulares macrófoga Raw e queratinócitos humanos HaCat. Ensaio *in vivo* também foram avaliados para evidenciar a toxicidade do óleo e da Nanoemulsão. Trata-se de um estudo relevante, sob a ótica do desenvolvimento sustentável, uma vez que mostra o potencial farmacológico do óleo da semente de açaí e agrega valor ao resíduo gerado pelo consumo de açaí.

A maioria das pesquisas com *Euterpe oleracea* (açaí) destaca as propriedades do extrato da polpa e do extrato da semente, nos quais se encontram as antocianinas, as proantocianidinas, os fitoesteróis, os ácidos fenólicos, carotenoides, flavonoides e ácidos graxos (PACHECO-PALENCIA *et al*, 2008; CASTRO 2022). Entretanto, o açaí é uma oleaginosa e sua semente, que representa 85% do fruto, é rica em óleo com diversas propriedades farmacológicas pouco exploradas (SANTOS; NORONHA; SARAIVA, 2019; BARROS *et al*, 2021).

Muitos estudos sobre a composição química comprovam a presença de ácidos graxos no óleo de açaí - que são importantes para a saúde. Os dados analisados nesta pesquisa mostraram que o óleo da semente de açaí contém 17 compostos distintos, nos quais estão uma combinação de ácidos graxos saturados, que representa 49,27% do total, e ácidos graxos insaturados que constituem 50,73%. Entre os ácidos graxos insaturados, destacam-se os ácidos graxos monoinsaturados (29,73%) e os ácidos graxos poliinsaturados (20,85%).

Esses resultados são consistentes com os achados da literatura, Melo *et al.*, (2021) relataram 49,24% de ácidos graxos saturados e 50,76% de ácidos graxos insaturados no óleo de açaí. Da mesma forma, Minighin *et al.* (2020), em estudo semelhante, relataram a presença de ácidos graxos saturados em 23,50% e monoinsaturados em 63,10%. Apesar das variações, esses percentuais sugerem uma consistência na composição química do óleo de açaí; além disso, esta variação é atribuída ao método de extração, condições ambientais de cultivo e variação genética.

Alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados destaca os benefícios do

óleo de açaí na saúde. Dentre esses ácidos, o ácido oleico, é o principal representante; é precursor biológico da família ômega-9, sendo considerado uma molécula energética, nutracêutica e um componente dos fosfolipídios de membranas, atuante na prevenção de doença como cardiovascular, prevenção de Alzheimer, controle do colesterol, e anticâncer (SANTA-MARIA, *et al.*, 2023).

Além desses compostos acima citados, investigou-se o teor dos compostos fenólicos no óleo e na NE-OEO. Os compostos fenólicos representam classes de compostos bioativos presentes nos vegetais com atividades antioxidante, antimicrobiana, anit-inflamatória, e antiproliferativa além de outras (ALBUQUERQUE, *et al.*, 2021).

A NE-OEO apresentou maior concentração, $146,00 \pm 0,259$ mg, e o óleo $127,40 \pm 0,449$ mg EAG g⁻¹ de compostos fenólicos, e flavonoides totais foram encontrados os valores $62,62 \pm 0,930$ mg para o óleo e $113,80 \pm 0,454$ mg EQ g⁻¹ para a NE-OEO. Esses valores indicam a qualidade do óleo e NE-OEO de açaí e seu potencial benéfico e nutricional, corroborando com a literatura.

Os valores físico-químicos avaliados, no óleo de açaí deste estudo, demonstram sua qualidade para consumo. Segundo Moura *et al.*, (2019), para que se possa utilizar os óleos vegetais para saúde, ou qualquer outra finalidade, é muito importante avaliar sua qualidade e sua credibilidade, ou seja, e ser acreditado por normas vigentes - sejam nacionais ou internacionais. Nesse sentido, é através da análise de parâmetros físico-químicos, como densidade, viscosidade, índice de acidez, de iodo, de saponificação, peróxido, umidade, etc., que se conhece a qualidade e pureza do óleo vegetal.

Com relação aos parâmetros físico-químicos do óleo de açaí, foi observado um índice de acidez de 0,3556 e uma umidade de 1,25% p/p, valores que excedem os limites estipulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na RESOLUÇÃO-RDC Nº 270, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005, que estabelece um máximo de 0,6 mg KOH/g para a acidez de óleos refinados. Apesar de ultrapassarem esses parâmetros, esses achados estão de acordo com a literatura existente.

Sabe-se, também, que fatores como temperatura, exposição ao ar atmosférico, luz, estado de maturação dos frutos e umidade podem influenciar significativamente esses parâmetros. A literatura sugere, então, que a percentagem de umidade ligeiramente elevada pode explicar o índice de acidez observado. Santos *et al.* (2016) e De Castro *et al.* (2021) destacam que um teor de água mais elevado pode

comprometer a durabilidade do produto, acelerando processos de degradação.

Quanto ao índice de saponificação (SI) do óleo de semente de açaí, o valor determinado foi de 189,61 mg KOH/g e encontra-se dentro da faixa esperada para óleos e gorduras vegetais, conforme as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O índice de saponificação reflete o teor de grupos carboxílicos e o consumo de KOH na composição química do óleo, sendo um indicador importante da quantidade de ácidos graxos de cadeia longa presentes. Este valor é influenciado por diversos fatores, incluindo a espécie vegetal e a região de origem, como apontado por Santos et al. (2016).

Da mesma forma, o índice de refração obtido foi de 1,4707, e a densidade foi medida em 0,928 g/ml. Ambos os valores estão muito próximos das referências padrões para óleos vegetais e consistentes com estudos anteriores, como o de Pereira (2015), que relatam valores semelhantes. Esses parâmetros são fortemente influenciados pelo grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no óleo, o que reforça a integridade e a pureza do óleo de semente de açaí analisado. Já referente ao teor de cinzas do óleo da semente de açaí, foi 0,42g demonstrando o valor nutricional e a qualidade, onde os maiores teores de cinza indicam maior valor energético (OLIVEIRA; PINTO; REZENDE, 2017).

Assim, com o advento da nanotecnologia, as propriedades benéficas dos óleos vegetais e composições viabilizaram o desenvolvimento de nanoemulsões para contribuir com a entrega de fármacos, auxiliar no diagnóstico e na terapia de várias doenças como o câncer (SANCHES *et al.*, 2023). E assim como os óleos, as nanoemulsões também necessitam da avaliação dos parâmetros físico-químicos para determinar sua estabilidade, qualidade e segurança; bem como, necessitam de métodos adequados para seu desenvolvimento (SORMMERLING *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da nanoemulsão foi pautado no cálculo do EHL, utilizando método de baixa energia com diferentes temperaturas de inversão de fase, que é ideal para nanoformulações em pequena escala, além de ser de baixo custo, e tensoativos não iônicos (MONGE-FUENTES *et al.*, 2017; RABELO *et al.*, 2008).

Neste estudo, a caracterização da NE-OEO demonstrou parâmetros aceitáveis para nanoformulação; no qual, o diâmetro gota foi de 238,37 nm, PDI de 0,38, potencial Zeta foi de -9,59, esses dados indicam estabilidade das gotículas contra agregação e coalescência; estabilidade física contra separação gravitacional e floculação. A literatura mostra que o diâmetro da gota em nanoemulsão varia entre 50

a 500 nm. Esse tamanho nanométrico certifica a estabilidade cinética, aumenta o prazo de validade, e garante segurança da aplicação (YUKUYAMA *et al.*, 2016; MIKULCOVÁ *et al.*, 2017). O potencial Zeta negativo observado pode ser atribuído aos tensioativos não iônicos, que promovem uma estabilização estérica em vez de eletrostática (SAFAYA *et al.*, 2022).

A avaliação do pH é crucial para monitorar a degradação da formulação. O pH neutro da nanoemulsão NE-OEO está de acordo com estudos achados da literatura (OBREDANE *et al.*, 2020). As variações de turbidez refletem a dispersão dos componentes na nanoemulsão; assim, a NE-OEO mostrou aparência translúcida azulada do confirmando a predominância dos padrões para classificar como nanoemulsão (McCLEMENT *et al.*, 2011).

Ao avaliar a atividade antioxidante, o óleo e NE-OEO de açaí exibiram atividade antioxidante significante; no entanto, NE-OEO demonstrou atividade maior que o óleo, sendo o valor do óleo de 5,993 $\mu\text{M ET/g}$, e NE-OEO de 9,993 $\mu\text{M ET/g}$ no ensaio DPPH. e 6,567 $\mu\text{M ET/g}$ 11,9 $\mu\text{M ET/g}$ no ensaio ABTS. Esses dados corroboram com a literatura que afirma que concentrações abaixo de 500 $\mu\text{g/mL}$ indicam um potencial antioxidante significativo, oferecendo benefícios para a saúde e ajudando na prevenção de doenças relacionadas com o stress oxidativo. Dessa forma, relação dose-dependente entre a concentração e a atividade antioxidante realça o potencial do composto (CAMPOS *et al.*, 2003), a proteção contra estresse oxidativo, os benefícios à saúde vascular, prevenção ao envelhecimento precoce, aumento da imunidade e propriedades anti-inflamatórias (MUNTEANU; APETREI, 2021).

Não foram evidenciados efeitos citotóxicos do óleo nas linhagens não neoplásicas de queratinócitos humanos HaCat. No entanto, houve efeito citotóxico nas células de câncer cervical HeLa e SiHa. O óleo reduziu significativamente a viabilidade celular tanto de SiHa quanto de HeLa, com padrões semelhantes, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ nos períodos 24, 48 e 72 horas, com maior intensidade para 50 $\mu\text{g/mL}$.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo realizado por Da Silva *et al* (2023). O óleo da semente de açaí reduziu viabilidade celular após 24h, nas concentrações de 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$, das linhagens celulares Caco-2 HCT-116, e na linhagem celular HT-29 a redução da viabilidade celular apenas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. O efeito antitumoral do óleo de açaí também foi confirmado por Marques *et al.* (2017) que estudaram o óleo de açaí e diferentes células humanas, avaliando a

citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade em linhagens de células HepG2 (hepatoma) e leucócitos humanos.

Diante da atividade citotóxica do Óleo de açaí, frente à linhagem celular HeLa e SiHa, realizamos análise de citometria de fluxo para avaliar a população de células apoptóticas após tratamento com óleo de açaí usando um ensaio de coloração com anexina V e PI. Notavelmente, os resultados demonstraram que o número de células HeLa e SiHa apoptóticas, após tratamento com óleo de açaí - inicial e tardia - aumentou significativamente nos tempos analisados, demonstrando padrões semelhantes para ambas as células (Figuras 15 A e B). Alterações morfológicas nas células HeLa e SiHa foram observadas após serem cultivadas com óleo de açaí (50µg/mL), ocorrendo retração celular, formação de área circular clara ao redor do núcleo e uma redução do tamanho; sugerindo formação de vesículas (Figura 16 C, B, E e F). Esses padrões morfológicos podem estar envolvidos no mecanismo de apoptose.

Assim, produtos naturais, com atividade antitumoral, agem, principalmente, interferindo na divisão celular; causando morte celular por vias de apoptose, necrose ou causando danos oxidativos no material genético (BHALLA *et al.*, 2013). Durante os processos de morte celular, necrose ou apoptose, a célula expressa alterações específicas na expressão de proteínas e na organização do material genético indicando qual o processo morte está ocorrendo. No processo de apoptose, ocorre a exposição do fosfolipídio de membrana fosfatidilserina na superfície da membrana citoplasmática induzindo uma translocação do lipídio; assim, a anexina V-FITC liga-se a fosfolipídios por via dependente de Ca^{+2} emitindo fluorescência, identificando células em estágios de apoptose (BERNARDES-OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Ruttanapattanakul *et al.*, (2021) constataram que o óleo de *Zingiber ottensii* induziu a apoptose de células cancerígenas cervicais humanas HeLa após 24h em diferentes diluições. E JARADAT *et al.*, 2020 quando estudou o efeito do óleo essencial de *Nepeta deflersiana* em linhagem celular HeLa, constatou que óleo de *N. Deflersiana* inibiu a viabilidade celular (IC50 de 0,7465 mg/mL em 24h e 0,4531 mg/mL em 48h) após tratamento.

Foi possível observar nesse estudo, o efeito significativo do óleo de açaí impedindo o fechamento da cicatriz da monocamada de células HeLa e SiHa em 24h e 48h. O desenvolvimento e crescimento do câncer envolve vários mecanismos, dentre eles, a migração celular que está inerente ao desencadeamento de metástase,

no qual células tumorais migram do local primário para um órgão secundário, sendo um processo crítico de invasão (WOO et al., 2011). Este efeito também foi revelado em vários estudos realizados com óleos vegetais, que também possuem a capacidade de reduzir a migração de células tumorais (SURAVAJHALA, 2020; JARADAT *et al.*, 2020; GARCIA *et al.*, 2020).

Outrossim, o óleo de açaí também demonstrou efeito inibitório na formação de colônia das linhagens HeLa e SiHa, sugerindo além de impedir a sobrevivência e proliferação celular, interferir na viabilidade reprodutiva das células e, consequentemente, impede a progressão do tumor. Este ensaio é interessante, pois permite investigar a sobrevivência e a formação de clones de células, frente a produtos naturais, uma vez que uma das características da tumorigênese é a colonização de células tumorais (MUNSHI; HOBBS e MEYN, 2005).

No estudo realizado por Guan e Guan (2020), o sesquiterpeno artemisinina reduziu significativamente o número de colônias de células de câncer de mama altamente agressivo (MDA-MB-123), de maneira concentração-dependente.

Ao avaliarmos a toxicidade do óleo e da NE-OEO em ensaio *in vivo*, não foram encontradas alterações nos tecidos do fígado e dos rins para a maioria dos animais tratados com óleo (100, 200 e 300 mg/mL) e NE-OEO (100 mg/L). No entanto, ao contrário dos nossos dados, De Marques *et al.* (2019) relataram alterações no fígado e nas células da tireoide em animais expostos ao óleo de açaí (300 mg/mL - observando que doses crescentes comprometem a integridade do tecido hepático (DE MARQUES et al., 2019). Alguns fatores, como método de extração do óleo, solvente utilizado, armazenamento podem influenciar negativamente nos resultados.

A respeito da atividade imunomoduladora, ambos induziram a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, NE-OEO induzindo significativamente IL 10 e óleo induziu significativamente IL 17. A IL-10 é uma citocina com efeitos protetores nos vasos sanguíneos e é produzida pelos linfócitos Th2, também modula a expressão de outras citocinas, podendo inibir a ativação de linfócitos Th1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. O aumento da concentração de citocinas dependentes de Th1 (IFN-gama, IL-2) com aumento na concentração de IL-10 sugere um efeito compensatório que antagoniza a inflamação (TOMASZEWSKI *et al.*, 2021). A IL-17 é produzida por células T auxiliares (Th) que são estimuladas por IL-1 β e IL-6 derivadas de fagócitos, como macrófagos, e de células de tecidos (KUWABARA *et al.*, 2017).

Diante desses achados, nota-se uma perspectiva positiva: o óleo da semente de açaí e a NE-OEO mostram-se promissores e seguros para a saúde. É notório, portanto, que mais estudos são necessários para melhor elucidar os efeitos sistêmicos e os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral do óleo, a saber, as vias apoptóticas das células de câncer cervical. Sem dúvidas que o óleo oferece muitos benefícios à saúde e constitui um produto natural atraente para formulações biotecnológicas como as nanoemulsões fonte de novos fármacos.

7 CONCLUSÃO

O óleo de semente de *E. oleracea* Mart. apresentou um alto teor de polifenóis, compostos fenólicos, ácidos graxos saturados, insaturados, monoinsaturados e poliinsaturados, com ácidos láurico, mirístico, palmítico, e antioxidante.

Observou-se também que os padrões físico-químicos, como índice de acidez, refração, cinzas, umidade, saponificação, do óleo estão dentro dos valores esperados corroborando com a literatura.

Além disso, a caracterização da nanoemulsão mostrou ser antioxidante, bem como o valor PDI indica a homogeneidade e a estabilidade da distribuição do tamanho das gotículas da emulsão, apresentou pH neutro, turbidez normal e aparência translúcida.

Dados *in vitro* mostraram que o óleo inibiu a viabilidade celular e proliferação celular de células tumorais, bem como a migração e induziu apoptose inicial e tardia, e não foi citotóxico nas células não tumorais.

Nos resultados *in vivo* nem óleo nem a nanoemulsão foram tóxicos, não havendo alterações no fígado e rim. Além disso, induziu IL2, IL6, IL10, IL17, IFN- γ e TNF α , mostrando atividade imunomoduladora.

REFERÊNCIA

ALBUQUERQUE, B. R.; HELENO, S. A.; OLIVEIRA, M. P. P. B.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F.R. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.

LUTZ, Adolfo. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, v. 2, 1985.

ALMEIDA, Vitor M. et al. Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, p. 606-619, 2020.

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **J Sci Food Agric**, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.

BERNARDES-OLIVEIRA, E. et al. Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2016, n. 1, p. 1-9, 2016. ISSN

BRUNSCHWIG C, LEBA LJ, SAOUT M, MARTIAL K, BEREAU D, ROBINSON JC. CHEMICAL Composition and Antioxidant Activity of *EUTERPE OLERACEA* Roots and Leaflets. **Int J Mol Sci**. 2016 Dec 29;18(1):61. doi: 10.3390/ijms18010061. PMID: 28036089; PMCID: PMC5297696.

CAMPBELL, A. J.; SILVA, F. D. D. S. E.; MAUÉS, M. M.; LEÃO, K. L.; CARVALHEIRO, L. G., MOREIRA, E. F.; MERTENS, F.; KONRAD, M. L. F.; QUEIRO, J. A. L.; Menezes, C. Forest conservation maximises açai palm pollination services and yield in the Brazilian Amazon. **Journal of Applied Ecology**, 60(9), 1964-1976. 2023.

DA SILVA DOS SANTOS, D.; KLAUCK, V.; CAMPIGOTTO, G.; ALBA, D.F.; DOS REIS, J. H.; GEBERT, R.R.; SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M.D.; SCHOGOR, A. L. B.; SANTOS ID, WAGNER R, VEDOVATTO M, DA SILVA AS. Benefits of the inclusion of açai oil in the diet of dairy sheep in heat stress on health and milk production and quality. **J Therm Biol**. 2019 Aug;84:250-258. doi: 10.1016/j.jtherbio.2019.07.007. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31466761.

DA SILVA, M. A. C. N.; WOLFF, L. A. S.; BORGES, K. R. A.; VALE, A. A.M.; DE AZEVEDO-SANTOS, A. P. S.; XAVIER, M. A. P.; BARBOSA, M. DO C. L.; NASCIMENTO, M. DO D.S. B.; DE CARVALHO, J. E. Açai (*EUTERPE OLERACEA* Mart.) byproduct reduces tumor size and modulates inflammation in Ehrlich mice model, **Journal of Functional Foods**, Volume 103, 2023, 105474, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105474>.

DA SILVA, M. A.C. N.; SOARES, C. S.; BORGES, K. R. A.; WOLFF, L. A. S.; BARBOSA, M. DO C. L.; NASCIMENTO, M. DO D. S. B. CARVALHO, J. E. DE Ultrastructural changes induced by açai (*EUTERPE OLERACEA* Mart) in MCF-7 breast cancer cell line, **Ultrastructural Pathology**, 2022. 46:6, 511-518, DOI: 10.1080/01913123.2022.2141404

DE ALMEIDA MAGALHÃES, T.S.S.; DE OLIVEIRA MACEDO, P.C.; KAWASHIMA P. S.Y.; SILVA, S.S.D.; BARBOSA, E.G.; PEREIRA, R.R.; COSTA, R.M.R. SILVA, J. J.; DA SILVA, F M.A, DE ALMEIDA, J. C; ROLIM, N. P. J; CONVERTI, A. N.; DE LIMA, A. A. Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of *EUTERPE OLERACEA* Mart Oil and β -Cyclodextrin or HP- β -Cyclodextrin. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020; 21(3):942. <https://doi.org/10.3390/ijms21030942>

DE ALMEIDA MAGALHÃES, T.S.S.; DE OLIVEIRA MACEDO, P.C.; CONVERTI, A.; NEVES DE LIMA, A.A. The Use of *EUTERPE OLERACEA* Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. **Biomolecules** 2020, 10, 813. <https://doi.org/10.3390/biom10060813>

DE MORAES ARNOSO, B.J.; MAGLIACCIO F.M.; DE ARAÚJO, C.A; DE ANDRADE, S. R; SANTOS, I.B; DE BEM, G.F; FERNANDES-SANTOS, C.; DE SOUSA, J. L.; GUERREIRO, L. H. H.; BERNAR, L. P.; RIBEIRO, H. J. da S.; E OLIVEIRA, R. L.; SANTOS, M. C.; ALMEIDA, H. da S.; JUNIOR, S. D.; BORGES, L. E. P.; DE CASTRO, D. A. R.; MACHADO, N. T. Análise da composição química do Bio-Óleo produzido via pirólise de sementes de Açai (*Euterpe Oleracea*, Mart) / Chemical analysis of Bio-Oil produced by pyrolysis of Açai (*Euterpe Oleracea*, Mart) seeds. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 15549–15565, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-261. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/24661>. Acesso em: 26 may. 2023.

DE SOUSA, L. L.; C.; DE OLIVEIRA, M. S.P.; LIMA, T. M. Morfologia de acessos de açazeiro (*Euterpe* spp) híbridos interespecíficos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 3, p. e14113345214-e14113345214, 2024.

DUARTE, J.; AMADO, J. R. R.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRU, R. A. S.; FALCÃO, D. Q.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 189-192, 2015.

FARDOUS, J.; OMOSO, Y.; JOSHI, A.; YOSHIDA, K.; PATWARY, M. K. A., Development and characterization of gel-in-water nanoemulsion as a novel drug delivery system. **Materials Science and Engineering: C**, v. 124, p. 112076, 2021

FILHO, W. E. M.; ALMEIDA-SOUZA F.; VALE, A. A.M, VICTOR E.C; ROCHA, M.C.B; SILVA, G. X; TELES, A. M; NASCIMENTO F. R.F; MORAGAS-TELLIS, C.J. CHAGAS, M.D.S.D.S;

BEHRENS M.D.; HARDOIM, D.J.; TANIWAKI, N. N; LIMA; J. A.; ABREU-SILVA, A. L.; GIL DA COSTA R. M. CALABRESE, K.D.S.; AZEVEDO-
2023. "Antitumor Effect of Açaí (*EUTERPE OLERACEA* Mart.) Seed Extract in LNCaP Cells and in the Solid Ehrlich Carcinoma Model" *Cânceres* 15, no. 9: 2544. <https://doi.org/10.3390/cancers15092544>

FRIEDRICH, P. R. M. L.; SANTOS, J.; LIBRELOTTO, D. R. N. ; Luana Haselein MAURER, L. H.; EMANUELLI, T.; da SILVA, C. de B.; ADAMS, A. I. H. Desonide nanoencapsulation with açai oil as oil core: Physicochemical characterization, photostability study and in vitro phototoxicity evaluation, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Volume 199, 2019, 111606, ISSN 1011-1344,

FURLANETO, F. DE P. B.; SOARES, A. DE A. V. L.; FURLANETO, L. B. Parâmetros tecnológicos, comerciais e nutracêuticos do açaí (*Euterpe oleracea*). *Revista Internacional De Ciências*, 10(1), 91–107. 2020. <https://doi.org/10.12957/ric.2020.46945>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa 2023. Ministério Da Saúde Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Aceso em: 03 mar. 2023. JONES, D.L. Palms: throughout the world. Washington: Smithsonian Institution. 410p, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2022.

KARAN, D.; DUBEY, S.; PIRISI, L.; NAGEL, A.; PINA I.; CHOO, Y.M.; HAMANN, M.T. The Marine Natural Product Manzamine A Inhibits Cervical Cancer by Targeting the SIX1 Protein. *J Nat Prod*. 2020 Feb 28;83(2):286-295. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b00577. **Epub** 2020 Feb 5. PMID: 32022559; PMCID: PMC7161578.

KUMAR, M.; BISHNOI, R. S.; SHUKLA, A. K.; PRAKASH, C. J.. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: a review. **Preventive Nutrition And Food Science**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 225-234, 30 set. 2019. The Korean Society of Food Science and Nutrition. <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225>.

KUWABARA T, ISHIKAWA F, KONDO M, KAKIUCHI T. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Mediators Inflamm**. 2017;2017:3908061. doi: 10.1155/2017/3908061. **Epub** 2017 Feb 20. PMID: 28316374; PMCID: PMC5337858.

LOUREIRO-CONTENTE, D. M; PEREIRA, R. R, RODRIGUES, A.M.C.; DA SILVA, E.O.; RIBEIRO-COSTA, R. M; CARRERA SILVA-JUNIOR, J.O. (2020). Nanoemulsões de óleo de açaí: caracterização físico-química para aplicação tópica de antifúngicos. **Engenharia química e tecnologia** , 43 (7), 1424-1432.

MOHITE P, RAJPUT T, PANDHARE R, SANGALE A, SINGH S, PRAJAPATI BG. Nanoemulsão no Tratamento do Câncer Colorretal: Desafios e Perspectivas Futuras. **Nanofabricação** . 2023; 3(2):139-166. <https://doi.org/10.3390/nanomanufacturing3020010>

MARTINEZ, R. M; GUIMARÃES, D.A.B.; BERNIZ, C.R.; ABREU, J.P.; ROCHA APMD, MOURA RS, RESENDE AC, TEODORO AJ. Açai (EUTERPE OLERACEA Mart.) Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. **Foods**. 2018 Oct 26;7(11):178. doi: 10.3390/foods7110178. PMID: 30373103; PMCID: PMC6262440.

MASSARWEH, O.; ABUSHAUKHA, A. S. The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances. **Energy Reports**, v. 6, p. 3150-3178, 2020. ISSN 2352-4847. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.009>.

MARQUES E.S.; FRODER J.G.; CARVALHO, J.C.T.; ROSA P.C.P.; PERAZZO F.F.; MAISTRO, E.L.. Evaluation of the genotoxicity of Euterpe oleraceae Mart. (Arecaceae) fruit oil (açaí), in mammalian cells in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, Volume 93, 2016, 13-19, ISSN 0278-6915, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.018>.

MARQUES, E. D. S., FRODER, J. G., OLIVEIRA, P. R. D., PERAZZO, F. F., ROSA, P. C. P., GAIVÃO, I. O., MATHIAS, M. I.C.; MAISTRO, E. L. (2019). Cytotoxic effects of Euterpe oleraceae fruit oil (açaí) in rat liver and thyroid tissues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 29, 54-61.

MAZZOCCHI, A.; LEONE, L., AGOSTONI, C.; PALI-SCHÖLL, I. The Secrets of the Mediterranean Diet. Does [Only] Olive Oil Matter?. **Nutrients**, 11(12), 2941. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11122941>

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MELO, P.S.; SELANI, M.M.; GONÇALVES, R.H. ; OLIVEIRA, J. ; MASSARIOLI, P. A.P.; de ALENCAR, S. M. Açai seeds: An unexplored agro-industrial residue as a potential source of lipids, fibers, and antioxidant phenolic compounds, **Industrial Crops and Products**, Volume 161, 2021, 113204, ISSN 0926-6690,

MORAES, E.R.L.; RAMOS, I. N. de F.; REGO, J. de A. R. Do; BRASIL, D. do S. B.; de OLIVEIRA, S. C. P.; ARAÚJO, S. O.; RODRIGUES, T. V. P.; SILVA, M. F.; KHAYAT, A. S. Evaluation of the cytotoxicity of EUTERPE OLERACEA (açaí) oil in neoplastic cell lines. In: 3rd **International Meeting on Oncology Research** - Belém - PA, 2023. Disponível em: <<https://www.doity.com.br/anais/3-imor/trabalho/267872>>.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021.

OGNIBENE, D.T.; DE MOURA, R.S; RESENDE, A.C.; DALEPRANE, J.B.; COSTA, C.A.D. Açaí seed extract (ASE) rich in proanthocyanidins improves cardiovascular remodeling by increasing antioxidant response in obese high-fat diet-fed mice. **Chem Biol Interact**. 2022 Jan 5;351:109721. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109721. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34715092.

DE OLIVEIRA, M. S. P. DE CARVALHO J. E. U. DO NASCIMENTO, W. M. O. Cultivado Açaizeiro para Produção de Frutos. EMBRAPA. 2002.

PETROPOULOS, SA; FERNANDES, Â.; ARAMPATZIS, DA; TSIROPOULOS, NG; PETROVIC, J.; SOKOVIĆ, M.; BARROS, L.; FERREIRA, ICFR Óleo de semente e subprodutos de óleo de semente de beldroegas (Portulaca oleracea L.): Uma nova visão sobre fontes vegetais ricas em ácidos graxos ômega-3. LWT Ciência Alimentar. **Tecnologia**. 2020 , 123 , 109099

PAVONI, L.; PERINELLI, D. R.; CIACCIARELLI, A.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; MIANO, A.; CASETTARI, L.; CESPI, M.; BONACUCINA, G.; PALMIERI, G. F. Properties and stability of nanoemulsions: How relevant is the type of surfactant?. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 58, 101772–.2020. doi:10.1016/j.jddst.2020.101772

ROSA, P.; FRIEDRICH, M. L.; DOS SANTOS, J.; LIBRELOTO, N.; MAURER, L. H.; EMANUELI, T.; DA SILAV, C. B.; ADAMS, A. I. H. . Desonide nanoencapsulation with acai oil as oil core: Physicochemical characterization, photostability study and in vitro phototoxicity evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 199, p. 111606, 2019.

SANCHES, S. C. C.; RÉ, M. I.; SILVA-JUNIOR, J. O. C.; RIBEIRO-COSTA, R. M. "Organogel do Óleo de Açaí em Cosméticos: Microestrutura, Estabilidade, Reologia e Propriedades Mecânicas" **Géis** 9, no. 2: 150, 2023.. <https://doi.org/10.3390/gels9020150>

SOMMERLING, J. H.; DE MATOS, M. B. C.; HILDERBRANDT, E.; DESSY, A.; KOK, R. J.; HIRSCHL, H.; LENEWEIT, G.; Instability Mechanisms of Water-in-Oil Nanoemulsions with Phospholipids: Temporal and Morphological Structures. **Langmuir**, v. 34, n. 2, p. 572-584, 2018.

QIAN, H.; BAGLAMIS, S.; REDEKER, F.; RAAIJMAN, J.; HOEBE, R.A.; SHERATON, V.M.; VERMEULEN, L.; KRAWCZYK, P.M. High-Content and High-Throughput Clonogenic Survival Assay Using Fluorescence Barcoding. **Cancers** 2023, 15, 4772. <https://doi.org/10.3390/cancers15194772>

ROMÃO, M. H.; de BEM, G. F.; SANTOS, I. B.; de Andrade Soares R.; OGNIBENE, D. T.; SOARES de MOURA, R.; da COSTA, C. A.; ROMÃO, C. A. Açaí (*EUTERPE OLERACEA* Mart.) seed extract protects against hepatic steatosis and fibrosis in high-fat diet-fed mice: Role of local renin-angiotensin system, oxidative stress and inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103726, 2020.

ROSSI, C. G. F.T; DANTAS, T. N.; DEC, D.; NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. *Rev Ciên Ex Terra Serop*. 2007; 26(1-2): 45-67. Disponível em: [Link]. Acesso em: 18 de nov. 2019.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012

RUTTANAPATTANAKUL, J.; WIKAN, N.; CHINDA, K.; JEARANA KULVANICH, T.; KRISANURUKS, N.; MUANGCHA, M.; OKONOGI, S.; POTIKANOND, S.; NIMLAMOOL, W. Óleo Essencial de *Zingiber officinale* Induz Apoptose de Células de Câncer Cervical Humano e Inibe Cascatas de Sinalização MAPK e PI3K/AKT. **Plantas** 2021, 10, 1419. <https://doi.org/10.3390/plants10071419>

TAVARES, F. F.C.; ALMEIDA, M. D. C.; SILVA, J. A. P.; ARAÚJO, L. L.; CARDOSO, N. S. M.; SANTANA, R. M. C. Thermal treatment of açaí (*Euterpe oleracea*) fiber for composite reinforcement. **Polímeros**, v. 30, p. e2020003, 2020.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Journal Advances in Colloid and Interface Science**, p. 303-318, 2004.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current opinion in colloid e interface science**, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2012.

TEIXEIRA, M. I.; GOMES, P. S.; GIACOMIN, A. C.; DA SILVA, B. E.; KAUFFMANN, C.; HOEHNE, L.; PÉRICO, E.; ETHUR, E. M. Relação entre diversidade e etnoconhecimento de “raizeiros” sobre plantas medicinais no sul da Amazônia, Brasil. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, 15(12), 17341-17362. 2023.

SANTOS, A.C.A.; MARQUES, M.M.P.; SOARES, A.K.O.; FARIAS, L.M.; FERREIRA, A.K.A.; Carvalho, M.L. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: Revisão sistemática. **R. Interd.**, 2014, 7(3), 149-156

SANTOS, A.P.S.; NASCIMENTO, M.D.D.S.B. Antitumor Effect of Açaí (*EUTERPE OLERACEA* Mart.) Seed Extract in LNCaP Cells and in the Solid Ehrlich Carcinoma Model. **Cancers** (Basel). 2023 Apr 28;15(9):2544. doi: 10.3390/cancers15092544. PMID: 37174010; PMCID: PMC10177358.

SANTA-MARÍA, C.; LÓPEZ-ENRÍQUEZ, S.; MONTSERRAT-DE LA PAZ, S.; GENIZ, I.; REYES-QUIROZ, M.E.; MORENO, M.; PALOMARES, F.; SOBRINO, F.; ALBA, G. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid. **Nutrients** 2023, 15, 224. <https://doi.org/10.3390/nu15010224>

SÁ- FILHO, G. F de; SILVA, A. I. B da.; COSTA, E. M da.; NUNES, L. E; RIBEIRO, L. H. de F.; CAVALCANTI, JRL de P.; GUZEN, F. P; OLIVEIRA, L. C de.; CAVALCANTE, J. de S. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico de metabólitos secundários: uma revisão. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 13, pág. e140101321096, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21096. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21096>. Acesso em: 22 mar. 2024.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E.; GUERRA, M.; DIAS-FERREIRA, J.; LOPEZ-MACHADO, A.; ETTCHETO, M.; CANO, A.; ESPINA, M.; CAMINS, A.; GARCIA, M.L.; SOUTO, E.B. Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics. **Nanomaterials** 2019, 9, 821. <https://doi.org/10.3390/nano9060821>

SAAD M. ALSHAHRANI, A. judicious review on the applications of chemotherapeutic loaded nanoemulsions in cancer management, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Volume 68, 2022, 103085, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.103085>.

SCHAUSS, A. G; WU, X.;PRIOR RL; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* mart. (acai). **J Agric Food Chem**. 2006 Nov 1;54(22):8598-603. doi: 10.1021/jf060976g. PMID: 17061839.

SILVA, D. F.; DA SILVA, M. A.C.N.; RODRIGUES, G. M.; VIDAL, F. C. B.; BARBOSA, M.A do C. L.; BRITO, L. M.O.; BEZERRA, G. F. de B.; FILHO, W. E. M., BORGES K. R. A.; ROSA I. G.; CARVALHO, J. E. DE; NASCIMENTO, M.do D.S.B. "Açaí (*EUTERPE OLERACEA* Mart) Consumption and Prevention of Chronic

Diseases: Is There an Association? A Preliminary Study", **The Scientific World Journal**, vol. 2020, Article ID 5782485, 7 pages, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/5782485>

DA SILVA, M.A.C.N.; COSTA, J.H.; PACHECO-FILL, T.; RUIZ, A.L.T.G.; VIDAL, F.C.B.; BORGES, K.R.A.; GUIMARÃES, S.J.A.; AZEVEDO-SANTOS, A.P.S.D.; BUGLIO, K.E.; FOGLIO, M.A.; BARBOSA, M.D.C.L.; NASCIMENTO, M.D.D.S.B.; DE CARVALHO, J.E. Açai (*EUTERPE OLERACEA* Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Molecules** 2021, 26, 3546. <https://doi.org/10.3390/molecules26123546>

BURKI T. W. H. O's new vision for traditional medicine. **The Lancet**. 2023 Sep 2;402(10404):763-4.

TAVARES, F. F. D. C.; ALMEIDA, M. D. C. D.; SILVA, J. A. P. D., ARAÚJO, L. L., CARDOZO, N. S. M.; SANTANA, R. M. C.. Thermal treatment of açai (*Euterpe oleracea*) fiber for composite reinforcement. **Polímeros**, 30, e2020003. (2020)

TAVARES T.B.; SANTOS I.B.; DE BEM G.F.; OGNIBENE D,T, D.A ROCHA APM, DE MOURA R.S, RESENDE A.C, DALEPRANE J.B, DA COSTA C.A. Therapeutic effects of açai seed extract on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obesity in male mice: a comparative effect with rosuvastatin. **J Pharm Pharmacol**. 2020 Dec;72(12):1921-1932. doi: 10.1111/jphp.13356. Epub 2020 Aug 27. PMID: 32856322.

TOMASZEWSKI, M.; BĘBNOWSKA, D.; HRYNKIEWICZ, R.; DWORZYŃSKI, J.; NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ, P.; KOPEĆ, G.; GRYWALSKA, E. Papel dos elementos do sistema imunológico na hipertensão arterial pulmonar. **J. Clin. Med**. 2021 , 10 , 3757

HARWANSI, RANJIT K.; DESHMUKH, ROHITAS; RAHMAN, MD AKHLAQUER. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 224-233, 2019.

TEWARI, D.; RAWAT, P.; SINGH, PAWAN KUMAR. Adverse drug reactions of anticancer drugs derived from natural sources. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 522-535, 2019.

WILSON, RJ, LI, Y., YANG, G. E ZHAO, CX. Nanoemulsões para liberação de medicamentos. **Particuologia** , 64 , 85-97. 2022.

WOO, C.C. et al. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR-g pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 464–475, 2011.

XIONG, J., F.V. MATTA, M. GRACE, M.A. LILA, N.I. WARD, M. FELIPE-SOTELO, AND D. ESPOSITO. Phenolic content, anti-inflammatory, and dermal wound repair properties of industrially processed and non-processed acai from the Brazilian 2020. Amazon. **Food Funct** 11(6):4903–4914. doi: 10.1039/C9FO03109J.

XAVIER, G.S.; TELES, A.M.; MORAGAS-TELLIS, C.J.; CHAGAS, M.D.S.D.S.; BEHRENS, M.D.; MOREIRA, W.F.D.F.; ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.D.S.; NASCIMENTO, M.D.D.S.B.; ALMEIDA-SOUZA, F. Inhibitory Effect of Catechin-Rich Açaí Seed Extract on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells and Carrageenan-Induced Paw Edema. **Foods** 2021, 10, 1014. <https://doi.org/10.3390/foods10051014>

YANG X, CHEN H, SANG S, CHEN H, LI L, YANG X. Burden of All Cancers Along With Attributable Risk Factors in China From 1990 to 2019: Comparison With Japan, **European Union, and USA. Front Public Health.** 2022 May 26;10:862165. doi: 10.3389/fpubh.2022.862165. PMID: 35692329; PMCID: PMC9178089.

YUKUYAMA, M.N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in comestics – a review. **International Journal of Comestics Science**, v. 38, n. 1, p. 13-24, fev. 2016.

ANEXO

ANEXO A



19/05/2023 870230042172
14:35

29409162304168384

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2023 009729 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila
Bacanga.

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: ageufma.cprp@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÕES DE ADJUVANTES IMUNOLÓGICOS À BASE DE ÓLEO DO FRUTO DE EUTERPE OLERACEA MART. MÉTODO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Resumo: A presente invenção refere-se à obtenção de formulação de adjuvante imunológico a base de óleo da semente Euterpe oleracea Mart, PBS 1X (solução tampão) e tensoativos não iônico hidrofílico e lipofílico, através de método de baixo custo e sustentável com potencial para imunoterapia anticâncer associada ou não ao vírus HPV, além de agregar valor ao resíduo gerado de processo extrativista de importância regional.

Figura a publicar: 03

Nome: KATIA REGINA ASSUNÇÃO BORGES

CPF: 68496060349

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Virgílio Domingues no 328 – Condomínio Una dos Moraes apt 306 – São Francisco

Cidade: São Luís

Estado: MA

CEP: 65076-340

País: BRASIL

Telefone: (98) 323 51583

Fax:

Email: kareborges@gmail.com

ANEXO C

current issues in
molecular biology

Article

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Oil and Its Nanoemulsion: Chemical Characterisation, Toxicity Evaluation, Antioxidant and Anticancer Activities

Katia Regina Assunção Borges ¹, Lais Araújo Souza Wolff ², Marcos Antonio Custódio Neto da Silva ³, Allysson Kayron de Carvalho Silva ¹, Carmem Duarte Lima Campos ⁴, Franciscilany Silva Souza ⁵, Amanda Mara Teles ⁶, André Álvares Marques Vale ⁴, Henrique Pascoa ⁷, Eliana Martins Lima ⁷, Eduardo Martins de Sousa ⁸, Ana Clara Silva Nunes ⁹, Rui M. Gil da Costa ^{4,10,11,12,13}, Ana Isabel Faustino-Rocha ^{10,14,15,*}, Rafael Cardoso Carvalho ⁴ and Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento ^{1,2,*}



Citation: Borges, K.R.A.; Wolff, L.A.S.; da Silva, M.A.C.N.; de Carvalho Silva, A.K.; Campos, C.D.L.; Sousa, E.S.; Teles, A.M.; Vale, A.A.M.; Pascoa, H.; Lima, E.M.; et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Oil and Its Nanoemulsion: Chemical Characterisation, Toxicity Evaluation, Antioxidant and Anticancer Activities. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, *46*, 3763–3793. <https://doi.org/10.3390/cimb46050235>

Academic Editor: Anna Kowalczyk

Received: 30 February 2024

Revised: 1 April 2024

Accepted: 4 April 2024

Published: 23 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- Northeast Biotechnology Postgraduate Program, Rencóbio, Federal University of Maranhão (UFMA), Avenida dos Portugueses, 1966 Bacanga, São Luís 65080-085, Maranhão, Brazil; kariborges@gmail.com (K.R.A.B.); allysson.carvalho@ufma.br (A.K.C.S.)
- Adult Health Master's Postgraduate Program—PPGSA/D, Federal University of Maranhão (UFMA), Avenida dos Portugueses, 1966 Bacanga, São Luís 65080-085, Maranhão, Brazil; laisewolff19@gmail.com
- Medicine Course, Federal University of Maranhão, Imperatriz 65915-060, Maranhão, Brazil; marcosantonio@ufma.br
- Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão (UFMA), Avenida dos Portugueses, 1966 Bacanga, São Luís 65080-085, Maranhão, Brazil; carmemduarte@ufma.br (C.D.L.C.); andre_serravallo@hotmail.com (A.A.M.V.); rui.m.gil@ufma.br (R.M.G.d.C.); cnevalso.na@ufma.br (R.C.C.)
- Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the Bionorte Network, Federal University of Maranhão (UFMA), Avenida dos Portugueses, 1966 Bacanga, São Luís 65080-085, Maranhão, Brazil
- Professional Postgraduate Program in Animal Health Defense, State University of Maranhão, Av. Odebrecht, 2220-São Cristóvão, São Luís 65010-120, Maranhão, Brazil; damarcos@ufma.br
- Farmaceut Laboratory at the Federal University of Goiás, Campus Samambaia da UFG, Goiânia 74690-631, Goiás, Brazil; henriquepascoa@ufg.br (H.P.); emilim@ufg.br (E.M.L.)
- Graduate Program in Biosciences Applied to Health, CEUMA University, São Luís 65075-120, Maranhão, Brazil; eduardo.martins@ufma.br
- Coordination of the Chemical Engineering course, Center for Exact Sciences and Technology, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-085, Maranhão, Brazil
- Center for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal
- Molecular Oncology and Viral Pathology Group, Research Center of IPO Porto (CI-IPO)/RISBCC-IPOP (Health Research Network), Portuguese Oncology Institute of Porto (IPO Porto), Porto Comprehensive Cancer Center (Porto.CCC), 4200-072 Porto, Portugal
- Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy (LEPBE), Faculty of Engineering, University of Porto (FEUP), 4200-465 Porto, Portugal
- Associate Laboratory in Chemical Engineering (ALiCE), University of Porto (FEUP), 4200-465 Porto, Portugal
- Comprehensive Health Research Center (CHRC), 7006-554 Évora, Portugal
- Department of Zootechnics, School of Sciences and Technology, University of Évora, 7002-554 Évora, Portugal
- *Correspondence: anafastino@uaeu.ac.ae (A.I.F.-R.); m.desterrosoares@gmail.com (M.d.D.S.B.N.)

Abstract: This study explores a nanoemulsion formulated with açai seed oil, known for its rich fatty acid composition and diverse biological activities. This study aimed to characterise a nanoemulsion formulated with açai seed oil and explore its cytotoxic effects on HeLa and SiHa cervical cancer cell lines, alongside assessing its antioxidant and toxicity properties both in vitro and in vivo. Extracted from fruits sourced in Brazil, the oil underwent thorough chemical characterization using gas chromatography–mass spectrometry. The resulting nanoemulsion was prepared and evaluated for stability, particle size, and antioxidant properties. The nanoemulsion exhibited transparency, fluidity, and stability post centrifugation and temperature tests, with a droplet size of 238.37, PDI 9.59, pH 7, and turbidity 0.267. In vitro assessments on cervical cancer cell lines revealed antitumour effects, including inhibition of cell proliferation, migration, and colony formation. Toxicity tests conducted in cell cultures and female Swiss mice demonstrated no adverse effects of both açai seed oil and

ANEXO D



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO (08/2021)

Certificamos que a proposta intitulada: "DESENVOLVIMENTO DE ADJUVANTE VACINAL COM ÓLEO DA SEMENTE DE *Euterpe oleracea* MART. CONTRA O CÂNCER", Processo n. 23115.002306/2021-66, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 24/02/2021.

We certify that the proposal: "DEVELOPMENT OF VACCINE ADJUVANT WITH OIL FROM THE SEED OF *Euterpe oleracea* MART. AGAINST CANCER", Process n. 23115.002306/2021-66, under the responsibility of Prof. Dr. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 02/24/2021.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 05/07/2021 a 05/07/2022

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

Espécie: Camundongos **Sexo:** Fêmeas **Idade:** 60 dias
Swiss **Peso:** 25 - 30g

AMOSTRA

38

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão - CCBS/UFMA.

São Luís, 24 de março de 2021.


Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFMA