



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Curso de Doutorado

Bianca Rodrigues Acacio

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO FARMACOTOXICOLÓGICA DE
NANOCÁPSULAS CARREGADAS COM ÓLEO DOS FRUTOS DE *Attalea
phalerata* (MARTIUS EX. SPRENG.) BURRET (ACURIZEIRO)**

Campo Grande, Mato Grosso do Sul

2023

Bianca Rodrigues Acacio

**Desenvolvimento e avaliação farmacotóxica de nanocápsulas
carregadas com óleo dos frutos de *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.)
Burret (Acurizeiro)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Jesús Rafael Rodriguez Amado.
Co-orientador: Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero

Campo Grande, Mato Grosso do Sul

2023



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DOUTORADO

Aos dezesseis dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e três, às oito horas e trinta minutos, na Sala de Videoconferência da FAFAN, Bloco 19, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO (UFMS), MARCO ANTONIO UTRERA MARTINES (UFMS), RENATA TRENTIN PERDOMO (UFMS), TATIANE PEREIRA DE SOUZA (UFAM) e TEOFILO FERNANDO MAZON CARDOSO (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: BIANCA RODRIGUES ACÁCIO, CPF 10353530670, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "Desenvolvimento e avaliação fármaco-toxicológica de nanocápsulas carregadas com óleo dos frutos de *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret (Acurizeiro)" e orientação de Jesus Rafael Rodriguez Amado. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

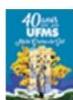
Dr. JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO (Interno)
Dra. TATIANE PEREIRA DE SOUZA (Externo)
Dr. MARCO ANTONIO UTRERA MARTINES (Interno)
Dra. RENATA TRENTIN PERDOMO (Interno)
Dr. TEOFILO FERNANDO MAZON Cardoso (Interno)
Dra. NAJLA MOHAMAD KASSAB (Interno) (Suplente)
Dr. EDUARDO BENEDETTI PARISOTTO (Interno) (Suplente)

RESULTADO FINAL: Aprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:



Documento assinado eletronicamente por **BIANCA RODRIGUES ACACIO, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 08:09, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Teofilo Fernando Mazon Cardoso, Professor do Magisterio Superior**, em 20/03/2023, às 09:44, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Utrera Martines, Professor do Magisterio Superior**, em 20/03/2023, às 10:13, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 13:25, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Pereira de Souza, Usuário Externo**, em 20/03/2023, às 13:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Trentin Perdomo, Professora do Magistério Superior**, em 21/03/2023, às 09:13, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3925985** e o código CRC **264B76B3**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Dedico este trabalho à minha querida prima Thaís Silva Acácio
e ao meu amado avô Reinaldo Baís Rodrigues,
que ficariam orgulhosos de mim.
(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho. Em especial, ao professor Jesús, que me acolheu e me ensinou muito, sempre com paciência e humanidade.

Agradeço ao Lucas, meu amor, por ser meu parceiro, companheiro, amigo, confidente. Agradeço por cuidar de mim, sempre me incentivando com muito carinho e compreensão.

Agradeço a minha família, meus pais Rose e Wellington Acácio, meu irmão Breno e meus avós, por me incentivarem a estudar e a nunca desistir. Agradeço também por todo amor e por nunca deixarem que eu me sentisse sozinha.

Agradeço aos Rodrigues e aos Acácio espalhados pelo mundo, pelas risadas e companheirismo. Agradeço também aos Secco, minha segunda família, em especial aos meus sogros, Dona Nina e Sr. Luiz Secco que me ajudaram, literalmente, a quebrar coquinho.

Sou grata aos meus amigos lindos e colegas de trabalho maravilhosos que me ajudaram a descarregar a pressão do dia a dia me ouvindo desabafar, dando conselhos valiosos, compartilhando momentos *relax* e relevando o fato de eu estar mais ausente do que presente durante a elaboração do trabalho.

Obrigada à Giovana Bicudo, Leonard e todos os técnicos que me ajudaram no acesso à laboratórios e na realização dos ensaios. A contribuição de vocês fez com que este trabalho pudesse nascer.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por fazer parte da minha vida desde 2010 na graduação em Farmácia, passando pelo mestrado e pelo trabalho como servidora na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia desde 2017. Os aprendizados compartilhados pelos professores e colegas de estudo e de serviço vão estar sempre presentes na minha vida.

“Tanto o insignificante quanto o extraordinário
são arquitetos do mundo natural.”

Carl Sagan

“Gosto mais das coisas feitas do que das
que estão por fazer.”

Júlio Verne,

Livro Vinte Mil Léguas Submarinas

RESUMO

Os processos inflamatórios não controlados são um problema de saúde pública no mundo. Apesar de existirem medicamentos anti-inflamatórios eficazes, geralmente desenvolvem efeitos adversos, principalmente gastrointestinais, renais e cardiovasculares. Na biodiversidade, podemos encontrar frutos com potencial uso no tratamento destas doenças, porém, em baixa escala e com pouco valor agregado. O emprego de processos nanobiotecnológicos para veiculação de óleos vegetais é uma metodologia que permite valorizar este tipo de produtos. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar o óleo de *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret (acuri), e desenvolver nanocápsulas poliméricas carregadas com esse óleo. Além disto foi avaliada a atividade anti-inflamatória, antiproliferativa de células tumorais, e a toxicidade aguda (14 dias) e crônica (28 dias) das nanocápsulas desenvolvidas. O óleo possui, como ácidos graxos majoritários, 43,33% de ácido láurico; 18% ácido oleico e 10,8% ácido mirístico. As nanocápsulas desenvolvidas têm um tamanho de 368,97nm, uma boa homogeneidade, com índice de polidispersão 0,298, e um potencial zeta de -69,20mV. A eficiência de encapsulação do processo foi de 88,77%. As nanocápsulas na concentração 10 mg/kg demonstraram atividade anti-inflamatória, com efeito analgésico, antiedema e uma significativa inibição da migração leucocitária na cavidade articular. As nanocápsulas possuem efeito antiproliferativo contra três linhagens de células tumorais: PC-03 (GI₅₀ 2,09 µg/mL; Índice de seletividade (IS) 119,61), 786-0 (GI₅₀ 3,03 µg/mL; IS 82,45) e HepG2 (GI₅₀ 98,33, IS 2,54), demonstrando uma possível utilidade como antitumoral. Nem nos animais tratados com nanocápsulas, nem o próprio óleo, mostraram sinais na morfologia externa dos órgãos internos, nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais, que possam ser relacionados a efeitos tóxicos sistêmicos associados a essas substâncias, nas concentrações utilizadas. Estes ensaios mostraram que a administração em dose única (2000 mg/kg) e em dose repetida (1000 mg/kg/dia) produzem um efeito hipolipêmico, diminuindo os níveis de colesterol total e de triglicérides, sugerindo que, tanto as nanocápsulas carregadas com óleo como o próprio óleo *in natura*, poderiam ser usados com essa finalidade e para o emagrecimento.

Palavras-chave: acuri, inflamação, nanocápsula, nanotecnologia, anti-inflamatório

ABSTRACT

Uncontrolled inflammatory processes represent a public health problem worldwide. Although there are effective anti-inflammatory drugs, they are related to the development of adverse effects, mainly gastrointestinal, renal and cardiovascular. In biodiversity, we can find fruits with potential for use in the treatment of these diseases, however, on a small scale and with little added value. The use of nanobiotechnological processes for conveying vegetable oils is a methodology that allows adding value to this type of product. The objective of this work was to obtain and characterize the oil of *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret (acuri), and to develop polymeric nanocapsules loaded with this oil. In addition, the anti-inflammatory and anti-proliferative activity of tumor cells, and the acute (14 days) and subchronic (28 days) toxicity of the developed nanocapsules (NC) were evaluated. The oil has, as major fatty acids, 43.33% lauric acid; 18% oleic acid and 10.8% myristic acid. The developed NCs have a size of 368.97nm, good homogeneity, with a polydispersion index of 0.298, and a zeta potential of -69.20mV. The encapsulation efficiency of the process was 88.77%. Nanocapsules at a concentration of 10 mg/kg generated anti-inflammatory activity, with distressing, anti-edema effect and a significant tension of leukocyte migration in the joint cavity. The nanocapsules have an antiproliferative effect against three tumor cell lines: PC-03 (GI50 2.09 $\mu\text{g/mL}$; Selectivity Index (SI) 119.61), 786-0 (GI50 3.03 $\mu\text{g/mL}$; IS 82, 45) and HepG2 (GI50 98.33, IS 2.54), demonstrating a possible use as an antitumor. Neither the animals treated with nanocapsules, nor the oil itself, observed signs in the external morphology of the internal organs, nor in the biochemical and hematological parameters of the animals, which can be related to systemic effects associated with these substances, in the concentrations used. These trials, found that administration in a single dose (2000 mg/kg) and in repeated doses (1000 mg/kg/day) produced a hypolipemic effect, observed the levels of total cholesterol and triglycerides, suggesting that both the nanocapsules loaded with oil as the oil itself *in natura* could be used for this purpose, and for weight loss.

Keywords: acuri, inflammation, nanocapsule, nanotechnology, anti-inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Registros fotográficos do fruto do acurizeiro	32
Figura 2 – Representação esquemática de um corte transversal de Nanocápsulas e Nanoesferas	37
Figura 3 – Ilustração do potencial zeta de uma partícula carregada em suspensão	40
Figura 4 – Fluxograma da coleta e obtenção do material vegetal	42
Figura 5 – Tamanho de partículas (A) e Potencial Zeta (B) das Nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i>	60
Figura 6 – Efeito antinociceptivo das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i> no teste de contorções abdominais em camundongos <i>Swiss</i> ..	64
Figura 7 – Efeito de redução do edema induzido por carragenina das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i>	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais efeitos dos mediadores inflamatórios	22
Quadro 2 - Ácidos graxos conhecidos e suas fontes	34
Quadro 3 - Métodos de preparação de Nanocápsulas.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas do óleo da amêndoa de <i>Attalea phalerata</i>	54
Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa de <i>Attalea phalerata</i>	56
Tabela 3 – Resultados do planejamento experimental utilizado para o desenvolvimento das nanocápsulas carregadas com óleo de acuri.	58
Tabela 4 – Atividade antiproliferativa de nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i> , em diversas culturas de células tumorais.....	61
Tabela 5 – Índice de seletividade das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i> em diversas culturas de células tumorais	62
Tabela 6 – Resultados do estudo de atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação articular induzido por zymosan.	67
Tabela 7 – Consumo de água e alimentos	69
Tabela 8 – Comportamento do peso corporal dos animais.....	69
Tabela 9 – Peso relativo dos órgãos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral	70
Tabela 10 – Parâmetros bioquímicos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral	71
Tabela 11 – Parâmetros hematológicos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral.....	72
Tabela 12 – Consumo de alimentos e água, ao longo do tempo, dos animais no ensaio de toxicidade subcrônica (28 dias)	73
Tabela 13 – Peso dos animais ao longo de 28 dias de tratamento	74
Tabela 14 – Peso relativo dos órgãos dos animais tratados por 28 dias com uma dose de 1000 mg/kg das nanocápsulas carregadas com óleo de acuri.	75
Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 28 dias com uma dose de 1000 mg/kg das Nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i>	75
Tabela 16 – Parâmetros hematológicos dos animais tratados por 28 dias com uma dose de 1000 mg/kg das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de <i>Attalea phalerata</i>	75

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Índice de Acidez.....	43
Equação 2 - índice de Iodo	43
Equação 3 - Índice de Saponificação	44
Equação 4 - Densidade Relativa	45
Equação 5 - Eficiência de Encapsulação	48
Equação 6 - Índice de Seletividade	49
Equação 7 - Redução da nocicepção.....	50
Equação 8 - Redução do Edema	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COX	Ciclo-oxigenase
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DORT	Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OAA	Óleo das amêndoas de acuri
NC	Nanocápsulas poliméricas carregada com óleo das amêndoas de acuri
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACA	Poli (alquil-ciano acrilato)
PCL	Policaprolactona
PLA	Poli (ácido lático)
PLGA	Poli (ácido lático-co-glicólico)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
YLD	<i>Years of healthy life lost due to disability</i> , ou anos vividos com incapacidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	INFLAMAÇÃO.....	21
3.1.1	Doenças Inflamatórias	24
3.1.2	Medicamentos usados no tratamento para inflamação.....	25
3.1.2.1	Anti-inflamatórios não esteroidais	25
3.1.2.2	Anti-inflamatórios esteroidais	27
3.1.2.3	Outros medicamentos	28
3.2	BIODIVERSIDADE E PLANTAS DE INTERESSE.....	29
3.2.1	Palmeira <i>Attalea phalerata</i>	30
3.2.2	Ácidos graxos.....	32
3.3	NANOTECNOLOGIA	35
3.3.1	Nanopartículas poliméricas	36
3.3.2	Métodos de preparação de nanopartículas.....	37
3.3.3	Estabilidade das nanopartículas	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	41
4.2	EXTRAÇÃO DO ÓLEO	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO	42
4.3.1	Determinação do índice de acidez	42
4.3.2	Determinação do índice de Iodo.....	43
4.3.3	Determinação do índice de refração	44
4.3.4	Determinação do índice de saponificação.....	44
4.3.5	Densidade Relativa	44
4.4	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CG/MS	45
4.5	PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS	46
4.5.1	Seleção do polímero	46
4.5.2	Formulação das nanocápsulas.....	46
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS	47

4.6.1	Tamanho de partícula	47
4.6.2	Potencial zeta	47
4.7	ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	48
4.7.1	Atividade antiproliferativa de células tumorais	48
4.8	ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i>	49
4.8.1	Animais.....	50
4.8.2	Ensaio de nocicepção.....	50
4.8.3	Ensaio edema de pata.....	51
4.8.4	Atividade anti-inflamatória articular em modelo de artrite induzida por zymosan	51
4.9	ESTUDOS DE TOXICIDADE	52
4.9.1	Toxicidade Aguda Oral	52
4.9.2	Toxicidade Subcrônica Em 28 Dias	53
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO.....	54
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	57
5.3	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	61
5.4	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	63
5.5	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	65
5.6	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA ARTICULAR.....	67
5.7	ESTUDOS DE TOXICIDADE	68
5.7.1	Toxicidade Oral Aguda	68
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO.....	93
	ANEXO 2 – PATENTE SUBMETIDA	110

1 INTRODUÇÃO

Processos inflamatórios contribuem para o agravamento de doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (FURMAN et al., 2019). Estas doenças estão entre as principais causas de morbimortalidade no mundo (VOS et al., 2020). A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo que tem como objetivo neutralizar agentes prejudiciais, remover os efeitos da lesão e recuperar o tecido lesado. Embora benéfica, a inflamação se torna prejudicial quando não controlada (crônica), causando danos irreversíveis se não for tratada adequadamente (ASGHAR; JAMALI, 2015).

Doenças incapacitantes também estão associadas a processos inflamatórios. São os casos de distúrbios músculo esqueléticos como artrite reumatoide, osteoartrite, gota e as dores no pescoço e costas. No Brasil, a prevalência destes distúrbios é de 21,6% na população adulta (BEZERRA *et al.*, 2018). Os problemas crônicos de coluna e artrite, que produzem incapacidade intensa ou muito intensa para realizar atividades rotineiras, estão entre os mais prevalentes (MALTA *et al.*, 2015). Segundo o INSS, as doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo foram a segunda maior causa de afastamentos do trabalho no ano de 2021 (BRASIL, 2022).

Para o tratamento da inflamação existem medicamentos eficazes disponíveis no mercado, em especial, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE). Estes, estão entre as classes de medicamentos mais utilizadas mundialmente, porém seu uso está associado a efeitos adversos graves, como gastroenteropatias, nefropatias e danos ao tecido cardiovascular (ANDRADE CARVALHO; SALES CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; BATLOUNI, 2010; LUCAS *et al.*, 2018; MITCHELL; WARNER, 2006). A percepção dos efeitos adversos dos medicamentos comercializados, aliado à uma tendência atual da valorização de produtos naturais, fizeram com que as propriedades medicinais de plantas de uso popular fossem foco de pesquisas orientadas a descobrir novos anti-inflamatórios (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; EKIERT; SZOPA, 2020; NUNES *et al.*, 2020).

A palmeira *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret, popularmente conhecida como acurizeiro, é uma das espécies mais conhecidas da região do Cerrado-Pantanal do Mato Grosso do Sul. Seu fruto, o acuri, contém uma amêndoa,

protegida por um rígido endocarpo, rica em óleo fixo que é utilizada como alimento pelos moradores das planícies alagáveis do Pantanal. Além disso, ela é um alimento excelente para a fauna da região, especialmente das araras (DE LIMA; LESCANO; DE OLIVEIRA, 2021). O óleo da amêndoa do acuri, é utilizado na Bolívia como descongestionante pulmonar, antiedema articular e antipirético. Também tem sido usado em cosméticos infantis para o tratamento da caspa (BALSLEV; MORAES, 1989; MÓNICA MORAES; BORCHSENIUS; BLICHER-MATHIESEN, 1996).

Os ácidos graxos presentes nos óleos dos frutos de palmeiras possuem atividade farmacológica importante. O ácido oleico (ômega-9), presente no azeite de oliva, é associado com efeito anti-inflamatório, anticarcinogênico e com a melhora do perfil lipídico em soro, especialmente, ao aumento das frações sanguíneas de colesterol HDL e diminuição de LDL (CARRILLO; CAVIA; ALONSO-TORRE, 2012a, b; MASSARO; CARLUCCIO; DE CATERINA, 1999). O ácido láurico, componente predominante do óleo de coco, apresenta atividade antimicrobiana, antioxidante, anticarcinogênica e anti-inflamatória (BARLINA *et al.*, 2022; MATSUE *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2020; WALLACE, 2019). Ácidos graxos de cadeia média, como o ácido láurico, cáprico e caprílico, têm sido associados a um efeito termogênico e com o emagrecimento. (CANSIZ *et al.*, 2021; HUANG; GAO; CHEN, 2021; LEE; KANG, 2017).

Os desafios envolvendo o uso oral de óleos naturais relacionam-se principalmente com a baixa solubilidade em água (características lipofílicas), labilidade de seus constituintes e baixa estabilidade nos fluidos gastrointestinais o que, conseqüentemente, prejudica sua biodisponibilidade na circulação sistêmica. Sobretudo na utilização via oral, forte odor e sabor amargo também podem dificultar a adesão ao tratamento (VERGALLO, 2020). Além disso, os óleos sofrem oxidação, o que causa perda de seus efeitos terapêuticos. Devido a estas características, sua utilização em formulações farmacêuticas e cosméticas pode ser prejudicada (FEREIDON; YING, 2010). Por fim, estão sujeitos à sazonalidade e nem sempre há disponibilidade suficiente para serem inseridos em processos produtivos de maior escala, o que limita a agregação de valor nestes produtos.

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que vem desenvolvendo um papel fundamental na área biofarmacêutica. Sua particularidade é que, em escala

nanométrica, modificam-se as propriedades físico-químicas e comportamentais das substâncias (BAYDA *et al.*, 2020). Do ponto de vista tecnológico, os sistemas nanoparticulados apresentam significativas vantagens em relação as substâncias ativas *in natura*. (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; VERGALLO, 2020).

Dentre as vantagens da utilização de nanocápsulas poliméricas para a veiculação de substâncias ativas estão: maior estabilidade, promovida pela proteção que o invólucro polimérico fornece aos princípios ativos contra fatores de degradação, como pH e luz, e a ação enzimática. As nanopartículas tendem a otimizar a solubilidade. No organismo, as nanocápsulas apresentam melhora na biodisponibilidade devido ao aumento de captação intracelular, muitas vezes com redução da toxicidade. Também oferecem a possibilidade de controlar a liberação do princípio ativo. Esses fatores contribuem para uma maior eficácia terapêutica (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

As nanocápsulas poliméricas, quando produzidas utilizando polímeros gastrorresistente, representam uma tecnologia inteligente, que permite veicular fármacos insolúveis. A cobertura polimérica permite proteger os constituintes ativos de possíveis alterações físico-químicas que poderiam acontecer no pH ácido do estômago, reduzir a quantidade do ativo a ser utilizado, além de melhorar sua a biodisponibilidade e eficácia. (VERGALLO, 2020).

Apesar de seu uso popular, estudos sobre o uso do óleo das amêndoas de acuri (OAA) e formulações farmacêuticas são escassos na literatura. No presente trabalho o OAA foi extraído, caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e foi desenvolvida uma formulação de nanocápsulas utilizando um polímero gastrorresistente (Kollicoat® MAE 100P), carregadas com este óleo. Além disso, foi avaliada sua atividade anti-inflamatória, antiproliferativa de células cancerígenas, e a toxicidade aguda oral e subcrônica do óleo e das nanocápsulas. O trabalho procura valorizar este produto extrativista que pode ser uma fonte de renda importante para os produtores regionais, pois sua aplicação numa escala produtiva, no futuro, pode ser inserida nas cadeias produtivas do setor farmacêutico, alimentar e cosmético e contribuir com o desenvolvimento regional do Mato Grosso do Sul.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar a atividade farmacotóxica de nanocápsulas poliméricas carregadas com óleo da amêndoa de *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret (acuri).

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar física e quimicamente o óleo da amêndoa do acuri.
- Desenvolver e caracterizar uma a formulação de nanocápsulas poliméricas contendo óleo da amêndoa do acuri.
- Avaliar a atividade analgésica e anti-inflamatória da formulação de nanocápsulas.
- Avaliar a atividade antiproliferativa das nanocápsulas em diversas linhagens de células tumorais.
- Avaliar a toxicidade aguda oral e subcrônica das nanocápsulas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico desencadeado nos tecidos vascularizados em resposta ao dano celular causado por um agente agressor, como micro-organismos, substâncias químicas, estressores físicos e reações imunológicas. Este processo protege o organismo, eliminando a causa da lesão, e/ou removendo células mortas ou comprometidas para restaurar a homeostase ao final do processo de reparo tecidual (KUMAR *et al.*, 2010).

A inflamação aguda inicia-se quando a microcirculação do tecido lesionado é afetada em uma sequência de eventos que promovem uma vasoconstrição arteriolar passageira, de curta duração, seguida de uma vasodilatação capilar e arteriolar associada com aumento do fluxo sanguíneo local. Sequencialmente, há aumento da permeabilidade vascular que, juntamente com uma redução da velocidade do fluxo sanguíneo, promovem exsudação e estase, respectivamente, causando um edema intersticial e uma redução acentuada ou a parada do fluxo sanguíneo local. Por fim, ocorre a marginação leucocitária, na qual os leucócitos ativados saem da luz vascular para o interstício tecidual, em um movimento conhecido como diapedese. Estes eventos propiciam um ambiente temporário para que a causa da lesão seja eliminada e o tecido afetado seja reparado (DIEGELMANN; EVANS, 2004; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013).

Para que este processo ocorra, mediadores inflamatórios são ativados e atuam em sinergia. Os mediadores são originários de células ou proteínas plasmáticas e, em sua maioria, possuem curta meia-vida após ativação. Os estímulos que podem ativar os mediadores estão relacionados com a presença de micro-organismos, proteínas plasmáticas do sistema complemento ativadas e substâncias liberadas por células necróticas e tecidos lesionados, o que assegura que a inflamação ocorra somente no momento e local necessários (KUMAR *et al.*, 2010; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013).

Entre os principais mediadores inflamatórios estão: aminas vasoativas, que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade celular; metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas) e citocinas, responsáveis pelo aumento da nocicepção, aumento da temperatura e edema; quimocinas que

estimulam o movimento leucocitário para o local (quimiotaxia) e óxido nítrico que atua na vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e morte de micro-organismos (KUMAR *et al.*, 2010; MEDZHITOV, 2008; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013; YEUNG *et al.*, 2018). No **Quadro 1** estão os principais mediadores inflamatórios e seus efeitos.

Quadro 1 - Principais efeitos dos mediadores inflamatórios

Mediador	Fontes	Efeitos
<i>Derivados de Células</i>		
Histamina	Mastócitos, basófilos, plaquetas	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, ativação endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada
Prostaglandinas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, dor, febre
Leucotrienos	Mastócitos, leucócitos	Permeabilidade vascular aumentada, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos
Fator ativador de plaquetas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, adesão de leucócitos, quimiotaxia, degranulação, explosão oxidativa
Espécies reativas de oxigênio	Leucócitos	Morte dos micro-organismos, dano tecidual
Óxido Nítrico	Endotélio, macrófagos	Relaxamento do músculo liso vascular, morte dos micro-organismos
Citocinas (Fator de Necrose Tumoral, Interleucina-1)	Macrófagos, células endoteliais, mastócitos	Ativação endotelial local (expressão de moléculas de adesão), febre/dor/anorexia/hipotensão, resistência vascular diminuída (choque)
Quimiocinas	Leucócitos, macrófagos ativados	Quimiotaxia, ativação de leucócito
<i>Derivados de Proteínas do Plasma</i>		
Cininas	Plasma (produzido no fígado)	Permeabilidade vascular aumentada, contração de músculo liso, vasodilatação, dor
Produtos do complemento (C5a, C3a, C4a)	Plasma (produzido no fígado)	Quimiotaxia e ativação de leucócito, vasodilatação (estimulação de mastócito)
Proteases ativadas durante a coagulação	Plasma (produzido no fígado)	Ativação endotelial, recrutamento de leucócito

Fonte: ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010

O processo inflamatório é complexo e dinâmico, já que um mediador pode estimular a liberação de outros mediadores. Além disso, mediadores secundários podem ter as mesmas ações dos mediadores iniciais, mas também efeitos diferentes

e até opostos. Desta maneira, esta cascata de eventos pode amplificar ou neutralizar as ações do mediador inicial (KUMAR *et al.*, 2010; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013).

Macroscopicamente, o processo inflamatório se caracteriza pela presença dos clássicos 4 sinais cardinais descritos por Celsius: tumor (edema), rubor (vermelhidão), calor (aquecimento do local), e dor (aumento da sensibilidade). No século XIX, foi adicionado um quinto sinal da inflamação, que é a alteração ou perda da função do local afetado (KUMAR *et al.*, 2010).

Os eventos descritos até o momento são característicos da inflamação aguda, que é uma rápida resposta (duração de minutos, horas ou até alguns dias) do hospedeiro a uma lesão tecidual ou infecção. De maneira geral, após a neutralização do agente que desencadeou o processo inflamatório, mecanismos anti-inflamatórios endógenos são ativados e o indivíduo retorna ao seu estado normal de saúde (KUMAR *et al.*, 2010; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013).

Existem também os processos inflamatórios crônicos decorrentes da não eliminação do agente agressor. A inflamação crônica tem longa duração e é caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos (infiltrado de células mononucleares), proliferação vascular e fibrose. Este processo inflamatório prolongado pode durar semanas ou meses, e o dano ao tecido e sua tentativa de reparo se manifestam concomitantemente, em diferentes intensidades e combinações (KUMAR *et al.*, 2010; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013).

Apesar de ser um processo fisiológico e desejável, a inflamação pode ser prejudicial ao organismo. Uma inflamação excessiva é característica das reações de hipersensibilidade que podem ser contra micro-organismos, contra antígenos ambientais ou contra as próprias células e tecidos do organismo (autoimunidade). Quando não é propriamente controlado, os mecanismos voltados para a eliminação do agente infeccioso ou tecido lesionado acabam por danificar os tecidos normais (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; MOTA PINTO; SANTOS ROSA, 2013; YEUNG *et al.*, 2018).

Uma outra origem da inflamação crônica não envolve a manifestação aguda do processo, e sim, um desenvolvimento insidioso, latente. A inflamação crônica é a causa de dano tecidual em algumas das mais comuns e incapacitantes doenças humanas, como a artrite reumatoide, osteoartrite, aterosclerose, tuberculose, úlcera

péptica, sinusite e fibrose pulmonar. Também está associada a progressão do câncer, síndrome metabólica e doenças neurodegenerativas (FURMAN *et al.*, 2019).

3.1.1 Doenças Inflamatórias

Uma das mais importantes descobertas médico-científicas dos últimos 20 anos é o envolvimento de processos inflamatórios nas principais causas de morbimortalidade no mundo. Cerca da metade de todos os óbitos estão relacionados à inflamação crônica, também chamada de inflamação crônica sistêmica, já que afeta o metabolismo do indivíduo como um todo (FURMAN *et al.*, 2019).

A maior causa de mortalidade mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é a isquemia cardíaca (WHO, 2020). Trata-se de uma doença arterial coronariana em que placas de ateroma se acumulam na luz do endotélio vascular impedindo o sangue de oxigenar e nutrir o tecido (HODZIC, 2018). A isquemia cardíaca é a manifestação clínica da inflamação crônica e as células e vias inflamatórias contribuem para o início, a progressão e as complicações das lesões ateroscleróticas (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010).

Além de fatais, as doenças inflamatórias crônicas podem ser incapacitantes. Um indicador da OMS para quantificar a magnitude da perda de saúde por causas específicas é o YLD ("*years of healthy life lost due to disability*"). O YLD é uma estimativa relacionada aos anos vividos com incapacidade. A OMS incluiu os distúrbios músculo esqueléticos entre as doenças que mais incidem no YLD representando 13% em 2019 (WHO, 2013a, WHO, 2020). Entre os distúrbios músculo esqueléticos mais significativos estão a artrite reumatoide, osteoartrite, gota e dores no pescoço e costas.

No Brasil, a prevalência de distúrbios músculo esqueléticos é de 21,6% na população adulta (BEZERRA *et al.*, 2018). Problemas crônicos na coluna e artrite estão entre os mais prevalentes. Os distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho (DORT), estão diretamente ligados à incapacidade intensa ou muito intensa para realizar atividades rotineiras (MALTA *et al.*, 2015).

Os DORT ocorrem quando o esforço é repetitivo e/ou a atividade é excessiva e podem gerar dor musculoesquelética, que pode ser aguda ou crônica, focal ou difusa. Essas dores podem ser incapacitantes e gerar perdas da produtividade por absenteísmo. O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) apurou

que, no Brasil, entre os anos de 2007 e 2012, cinco milhões de jornadas de 8 horas não foram trabalhadas em decorrência de dores musculoesqueléticas (HAEFFNER *et al.*, 2018). Segundo o INSS, as doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo constituíram a segunda maior causa de afastamento do trabalho no ano de 2021 (BRASIL, 2022).

A fisiopatologia da dor osteomuscular não é completamente esclarecida. Nela estão implicadas a inflamação, fibrose, degradação tissular e neurotransmissores. No processo inflamatório, a lesão induz um aumento sistêmico de citocinas e mediadores pró-inflamatórios nos tecidos afetados. Este aumento leva à sensibilização periférica de nociceptores (NAKAMURA; FERREIRA, 1987). No processo de reparo, a inflamação pode induzir uma cicatriz fibrótica e degradação no local afetado, que reduzem o deslizamento dos tecidos durante o movimento, causando perda de movimento e mais dor. Níveis elevados de neurotransmissores, mediadores inflamatórios e citocinas, causam sensibilização periférica dos nociceptores causando amplificação central da dor (JAIN, *et al.*, 2008; NAKAMURA; FERREIRA, 1987).

As mais diversas condições de saúde estão associadas à processos inflamatórios e suas consequências, principalmente a dor, edema e perda de função (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010).

3.1.2 Medicamentos usados no tratamento para inflamação

3.1.2.1 Anti-inflamatórios não esteroidais

As doenças inflamatórias são comumente tratadas com fármacos cujos alvos terapêuticos são a inibição da produção, da liberação ou da atividade de mediadores inflamatórios. Os medicamentos também podem induzir a produção de fatores anti-inflamatórios endógenos (PERRETTI *et al.*, 2015). As duas principais classes de fármacos usados são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e os glicocorticoides (anti-inflamatórios esteroidais). Em casos graves, analgésicos opioides são prescritos para diminuir a dor associada a processos inflamatórios e, em casos de doenças autoimunes, podem-se utilizar imunossupressores (FERREIRA, SÉRGIO HENRIQUE *et al.*, 2009).

Os AINE constituem uma das classes de medicamentos mais usadas no mundo. Eles exercem ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica e, portanto, são

eficazes no controle do edema, febre e dor. São indicados tanto para uso na fase aguda como na fase crônica da inflamação (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010; YEUNG *et al.*, 2018). Os AINE, junto com os analgésicos, representam cerca de 50% dos medicamentos vendidos sem prescrição médica no Brasil (ARRAIS *et al.*, 2016).

A ação farmacológica dos AINE é baseada na inibição das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX), também chamada de prostaglandina sintase. As isoformas COX-1 e COX-2 possuem similaridades estruturais, porém, possuem particularidades quanto a suas funções. A COX-1, chamada de enzima constitutiva, está presente nas células em condições fisiológicas (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins, entre outros). Sua função é catalisar as reações que formam as prostaglandinas (PGD₂, PGE₂), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TxA₂), e seus consequentes efeitos fisiológicos, como termorregulação, manutenção do fluxo sanguíneo renal, controle da agregação plaquetária, proteção gástrica e homeostase vascular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A COX-2 também é expressa em vários tecidos e órgãos (como rins, cérebro, ovário, útero, cartilagem, ossos e endotélio vascular). Ela é induzida, em especial, nos processos inflamatórios, sendo chamada de enzima indutiva. Está presente em células envolvidas na inflamação, como macrófagos e monócitos, e sua indução é mediada por vários fatores (IL-1, IL-2, TNF) e sua ação gera PGI₂ e PGE₂ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Quando ocorre uma lesão na membrana celular, a exposição dos fosfolípidos ali presentes, desencadeiam citocinas inflamatórias que ativam a enzima fosfolipase A₂, presente nos leucócitos e plaquetas (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010). Esta enzima degrada fosfolípidos, resultando na produção de ácido araquidônico que, ao ser metabolizado pela ação da COX, gera prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos que fazem a mediação do processo inflamatório. Sendo assim, o efeito terapêutico dos AINE está relacionado, principalmente, com a inibição da produção de prostaglandinas inflamatórias a partir da inibição da COX. (YEUNG *et al.*, 2018).

De maneira geral, no processo inflamatório, as prostaglandinas são mediadores químicos produzidos principalmente por mastócitos e neutrófilos e causam vasodilatação e potencializam a formação de edema. Também estão envolvidas na patogenia da hiperalgesia e aumento da temperatura na inflamação. A prostaciclina está presente predominantemente no endotélio vascular e atua causando vasodilatação e inibição da adesão plaquetária. O tromboxano A₂, presente

nas plaquetas, causa efeitos contrários, como vasoconstrição e agregação plaquetária.

Sendo assim, com a ação dos AINE, há também inibição da produção de derivados do ácido araquidônico envolvidos em funções fisiológicas relevantes, o que contribui para a ocorrência de efeitos adversos (ANDRADE CARVALHO; SALES CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; MITCHELL; WARNER, 2006). Os AINE podem interferir na citoproteção gástrica mediada pela inibição da COX-1, que inibe a síntese de prostaglandinas que atuam na produção de muco e secreção de bicarbonato, o que aumenta a susceptibilidade da mucosa gástrica à lesão, um dos mais conhecidos efeitos adversos dos AINE (KUMAR *et al.*, 2010).

Esta classe medicamentosa pode também comprometer o fluxo renal, por inibir a PGE2 e PGI2 e, conseqüentemente, diminuir a vasodilatação. Por inibição da COX presente nas plaquetas, estes medicamentos também podem prolongar o tempo de sangramento. Outros efeitos indesejáveis incluem lesões intestinais com alterações na microbiota intestinal, hipertensão, hiperglicemia, aumento da susceptibilidade à infecção, osteoporose, glaucoma e problemas cardiovasculares (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020; GARCÍA-RAYADO; NAVARRO; LANAS, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Com o objetivo de atenuar os efeitos adversos e sanar a inibição da COX-1, a indústria desenvolveu inibidores seletivos da COX-2. Estes são conhecidos como “coxibes” e possuem as mesmas propriedades anti-inflamatórias dos AINE, porém sem o efeito de inibição plaquetária e interferência na proteção gástrica. Apesar de inicialmente promissores, a utilização destes medicamentos também demonstrou graves efeitos adversos, como trombose, hipertensão e problemas cardíacos severos quando em utilização prolongada, tanto que alguns medicamentos da classe foram retirados do mercado (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

3.1.2.2 Anti-inflamatórios esteroidais

Outra classe de medicamentos anti-inflamatórios são os anti-inflamatórios esteroidais. São os glicocorticoides sintéticos (corticosteroides, ou corticoides) que são derivados do cortisol. Os glicocorticoides possuem poucas diferenças estruturais e tem atividade mais potente do que o cortisol, um hormônio fisiológico sintetizado na glândula adrenal (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Seu principal representante é

o cortisol e desempenham funções de cicatrização, redução da resposta inflamatória, função cardíaca, controle do crescimento e outras funções essenciais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Os anti-inflamatórios esteroidais possuem efeitos sistêmicos e atuam em praticamente todas as etapas do processo inflamatório. Eles inibem duplamente a cascata do ácido araquidônico a partir da inibição da enzima fosfolipase A2 e da inibição da COX, o que resulta em redução da expressão de prostaglandinas, prostaciclina e proteínas ligadas ao processo inflamatório. Além disso, inibem a síntese e liberação de TNF- α , interleucinas (1 a 8), interferon γ e a ativação de células T por citocinas. Por possuírem efeito inibidor da função de fibroblastos, com redução na produção de colágeno e glicosaminoglicanos, interferem também na cicatrização e no reparo tecidual. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; ORAY *et al.*, 2016).

Os corticoides produzem efeitos adversos importantes que podem causar modificações na aparência e funcionamento do corpo (ORAY *et al.*, 2016). O uso contínuo de corticoides está relacionado a diminuição da absorção intestinal de cálcio e conseqüente risco de osteoporose e fraturas. Também está relacionado com Síndrome de Cushing iatrogênica, com incidência de cataratas e glaucoma em indivíduos predispostos geneticamente e com hiperglicemia e diabetes. Este último, devido à interferência no metabolismo glicêmico. Os corticoides têm sido associados também a supressão da resposta a infecções, com agravamento de infecções oportunistas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

3.1.2.3 Outros medicamentos

Exemplos de medicamentos com atividade anti-inflamatória desenvolvidos mais recentemente são os anticorpos monoclonais, inibidores de citocinas, antagonistas de receptores específicos e inibidores de quinases. No entanto, esses medicamentos apresentam alto custo e dificuldades com a via de administração, além de efeitos adversos como danos gastrointestinais, hepáticos e renais (MEDZHITOV, 2008).

Este cenário evidencia a necessidade por novos compostos para o tratamento de doenças inflamatórias. Visando a diminuição de efeitos adversos dos medicamentos sintéticos, e a redução de custos, uma das alternativas mais usadas é a utilização de plantas medicinais. Esta é uma prática ancestral que continua

relevante, já que mesmo com os avanços observados na farmacoterapêutica, cerca de 30% de todos os agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

3.2 Biodiversidade e plantas de interesse

O desenvolvimento da civilização está intimamente ligado à utilização da natureza para fins terapêuticos. Nossos antepassados exploravam, na natureza, recursos para melhorar sua condição de vida, especialmente plantas nutritivas e de uso medicinal, aumentando suas chances de sobrevivência (BRASIL, 2012).

A literatura mostra que algumas espécies de plantas alimentícias não convencionais apresentam valores nutricionais superiores aos de plantas tradicionalmente encontradas para comercialização (KINUPP; DE BARROS, 2008). Além de fontes de nutrientes, determinados alimentos e especiarias também são considerados plantas medicinais, devido ao conteúdo de vitaminas, minerais e fitoquímicos de interesse para a saúde humana. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o conceito de planta medicinal como: “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WHO, 1998).

A partir das plantas medicinais, surgiu o conceito dos medicamentos fitoterápicos. Legalmente, estes são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, com comprovada eficácia e segurança, excluindo substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal (BRASIL, 2004). Tanto a utilização de fitoterápicos, como a de plantas medicinais, se enquadram na medicina tradicional e na medicina complementar e alternativa. A OMS (WHO, 2023) recomendou a integração destas práticas nas políticas de saúde dos países e, em 2006, foi aprovada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, que institucionaliza o uso de plantas medicinais e fitoterápicos disponibilizados para população (BRASIL, 2015).

Diante dos efeitos adversos produzidos pelos medicamentos sintéticos, além de uma mudança cultural que passou a valorizar a biodiversidade e os produtos naturais, as propriedades medicinais de plantas vem sendo foco de pesquisas. (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; EKIERT; SZOPA, 2020; NUNES *et al.*, 2020). Houve avanços e descobertas significativas nos últimos anos, o que levou a indústria farmacêutica a

desenvolver um crescente interesse em investigar produtos naturais como fonte de moléculas inovadoras. O mercado dos fitoterápicos movimentava milhões de dólares anualmente (BRASIL, 2012; WHO, 2019, 2013b).

O Brasil é conhecido mundialmente por sua biodiversidade, porém poucos medicamentos desenvolvidos no país. Um dos exemplos de sucesso é o medicamento anti-inflamatório tópico Acheflan® (Achê), desenvolvido a partir do óleo essencial da planta *Cordia verbenaceae* (Borraginaceae). Além deste, a Farmacêutica Achê produziu o fitoterápico ansiolítico Sintocalmy® preparado com o extrato de *Passiflora incarnata* (Passifloraceae). A Apsen Farmacêutica desenvolveu Fitoscar®, uma pomada formulada com uma mistura de derivados fenólicos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.). Estes poucos exemplos de produtos oriundos da biodiversidade brasileira evidenciam a necessidade de desenvolvimentos de estudos nesta área, além do potencial econômico a ser explorado (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018)

3.2.1 Palmeira *Attalea phalerata*

Apesar da extensão territorial do Brasil, mesmo com muitos grupos de pesquisa, ainda existe um grande número de plantas com conhecido uso etnobotânico que não tem sido estudada, como por exemplo, algumas, espécies de palmeiras (família Arecaceae). O açaí, o óleo de palma (azeite de dendê) e o óleo de coco são exceções conhecidas mundialmente, entretanto, a maioria das espécies ainda é subutilizada (DE LIMA; LESCANO; DE OLIVEIRA, 2021).

As palmeiras fornecem frutas que podem ser alimentos tanto para humanos como para animais. No bioma Pantanal, o fruto das palmeiras é o principal alimento de aves nativas, como as araras, além de outros animais, como antas, cotias e capivaras (JANICK, 2006). As amêndoas de algumas palmeiras possuem perfis nutricionais interessantes e são utilizadas na alimentação e na medicina popular devido à sua composição em ácidos graxos (LEE; BALICK, 2008; TEIXEIRA; IBAÑEZ; BLOCK, 2022).

A variedade de palmeiras brasileiras é grande. São cerca de 480 espécies nativas, nos diversos biomas (DE SOUZA *et al.*, 2020). No Cerrado e Pantanal são conhecidas mais de 50 espécies de Arecaceae (LORENZI *et al.*, 2010). Dentre estas, a palmeira *Attalea phalerata* (Mart. ex Spreng.) Burret ocupa um lugar importante. Esta palmeira é conhecida popularmente como palmeira acuri, acurizeiro, uricurí, ganguri,

cabeçudo e bacuri (HENDERSON; GALEANO-GARCES; BERNAL, 1995; POTT; POTT, 1994).

O acurizeiro tem ampla distribuição no Brasil. É encontrado naturalmente em estados no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (HENDERSON; GALEANO-GARCES; BERNAL, 1995; LORENZI *et al.*, 2010). Também pode ser encontrado na Bolívia, com o nome popular “motacu”, no Peru, conhecido popularmente como “shapaja” e no extremo sul da Colômbia (HENDERSON; GALEANO-GARCES; BERNAL, 1995; MORAES; BORCHSENIUS; BLICHER-MATHIESEN, 1996).

Segundo Henderson e colaboradores (1995), *Athalea* é um gênero que possui 29 espécies com presença de hibridização entre várias delas. A classificação botânica do acuri segue da seguinte maneira (HENDERSON; GALEANO-GARCES; BERNAL, 1995; LORENZI *et al.*, 2010):

Divisão - Magnoliophyta

Classe - Liliopsida

Subclasse - Arecidae

Ordem - Arecales

Família - Arecaceae

Gênero - *Attalea* Kunth

Epíteto - *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng.

Sinonímia - *Scheelea phalerata* (Mart.) Bur.

Outros sinônimos: *Attalea princeps* Mart., *Attalea corumbensis* (Barb. Rodr.) Barb. Rodr., *Attalea martiana* Burret, *Attalea microspadix* Burret, *Attalea princeps* Mart., *Attalea principes* var. *corumbensis* Barb. Rodr., *Attalea excelsa* Mart. ex Spreng., *Attalea princeps* Mart.

O acurizeiro tem diversos usos populares. Suas folhas são usadas como forragem com a finalidade de proteger o solo. Seus frutos para consumo animal, cobertura para habitação coletiva e matéria-prima para artesanato. É considerada uma planta ornamental, sendo utilizado em paisagismo (DE LIMA; LESCANO; DE OLIVEIRA, 2021). Do caule, pode-se retirar o palmito do qual é feito um licor alcoólico utilizado popularmente como fortificante (HENDERSON; GALEANO-GARCES; BERNAL, 1995; LORENZI *et al.*, 2010; POTT; POTT, 1994). Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA; IBAÑEZ; BLOCK, 2022), usaram o extrato n-hexânico das brácteas de acurizeiro como repelente do mosquito *Aedes aegypti*.

O fruto do acurizeiro é constituído por casca (exocarpo), polpa (endocarpo), um rígido mesocarpo e a amêndoa (semente) (LESCANO *et al.*, 2018). A polpa dos frutos *in natura* e na forma de farinha são utilizados na alimentação humana e animal (HIANE *et al.*, 2003). O extrato hexânico da polpa tem efeito ansiolítico com ausência de sedação em modelo animal (FREITAS DE LIMA *et al.*, 2019). Na **Figura 1** encontram-se fotografias dos frutos no acurizeiro, frutos já colhidos e um corte transversal de um acuri mostrando três amêndoas no seu interior.

Figura 1 – Registros fotográficos do fruto do acurizeiro



Da esquerda para a direita: os frutos no pedúnculo na palmeira-acuri, no meio os frutos colhidos e, a direita, um corte transversal do fruto mostrando três amêndoas em seu interior.

Fonte: A autora.

Das amêndoas se extrai o óleo. Na Bolívia o óleo tem sido usado como descongestionante pulmonar, anti-inflamatório, antitérmico, e para o tratamento de caspa (MORAES; BORCHSENIUS; BLICHER-MATHIESEN, 1996). O óleo também possui potencial como biocombustível (NEGRELLE, 2015). O óleo administrado em ratos hiperlipidêmicos reduziu o colesterol sérico e a massa corporal dos animais (DA SILVA BALDIVIA *et al.*, 2018; NEGRELLE, 2015)

3.2.2 Ácidos graxos

Óleos e gorduras são substâncias de origem vegetal ou animal e são classificados como lipídios. Os lipídios são um grupo de compostos apolares solúveis em solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, benzeno, éter, álcool). Possuem uma cabeça hidrofílica (grupo carboxila: -COOH) e sua polaridade depende da cadeia carbônica apolar, chamada de cauda. As gorduras são lipídios constituídos por glicerídeos de ácidos graxos saturados, são sólidas à temperatura ambiente e provém

de fonte animal. Os óleos são formados por glicerídeos de ácidos graxos insaturados, são líquidos à temperatura ambiente e são produzidos por plantas. Os ácidos graxos são um dos principais grupos de moléculas encontradas nas células (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2011).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos com cadeias curtas (4 a 6 carbonos), médias (8 a 12 carbonos), longas (14 a 18 carbonos) ou muito longas (20 a 36 átomos de carbono). De modo geral, tem procedência natural e costumam possuir cadeia linear e número par de carbonos, tendo em vista a adição destes átomos aos pares para alongamento de sua cadeia, que pode ser saturada ou insaturada (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2011; NELSON; COX, 2011).

O comprimento da cadeia e seu grau de insaturação influenciam nas propriedades físicas dos ácidos graxos. Por exemplo, o ponto de fusão aumenta com o aumento do número de átomos de carbonos na cadeia e diminuem com o número de insaturações. Sua nomenclatura é dada pelo número de carbonos, pela posição da primeira dupla ligação e pelo número de duplas ligações. A localização da primeira dupla ligação, contada a partir da terminação metila é designada pela letra grega “ ω ” (ômega). A nomenclatura do ácido linoleico (ω -6) é C18:2n6c. Isto é, possui uma cadeia com 18 carbonos (C18) e duas duplas ligações (2n), sendo que a primeira ligação está no sexto carbono (6c) a partir da terminação metila (NELSON; COX, 2011).

Os ácidos graxos desempenham funções essenciais no organismo humano. Por exemplo, formam parte da composição estrutural das membranas celulares, participam do armazenamento de energia como triglicerídeos nos adipócitos e no fornecimento dessa energia por meio da beta-oxidação (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010). Alguns ácidos graxos são essenciais, ou seja, não podem ser sintetizados e devem ser consumidos na alimentação como os ácidos graxos poli-insaturados, em especial os das classes ω -6 (ácido Linoleico) e classes ω -3 (ácido α – linolênico). No **Quadro 2** se apresentam alguns dos ácidos graxos saturados e insaturados mais conhecidos, sua fonte alimentar, o número de carbonos que possuem em sua estrutura, e se são essenciais ou não.

Quadro 2 - Ácidos graxos conhecidos e suas fontes

Nome do ácido	Nº de C	Tipo	Essencial	Fonte Alimentar
Palmítico	16	Saturado	Não	Óleo de Palma
Estearico	18	Saturado	Não	Gordura Animal
Oleico	18	Monoinsaturado	Não	Óleo de oliva
Linoleico	18	Poli-insaturado	Sim	Óleo de cártamo
Linolênico	18	Poli-insaturado	Sim	Óleo de soja
Araquidônico	20	Poli-insaturado	Sim	Carne e laticínios
Eicosapentaenoico	20	Poli-insaturado	Sim	Óleo de peixe, algas

Fonte: WHITE (2009)

Os ω -6 e ω -3 são precursores de biomoléculas. O ácido linoleico (ω -6) é convertido em ácido araquidônico (também essencial), este último, por sua vez, é precursor de biomoléculas como as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos (eicosanoides). Essas biomoléculas são mediadores nos processos inflamatórios. Os óleos ω -6 e ω -3 também participam do controle da pressão arterial, frequência cardíaca, dilatação vascular, coagulação sanguínea (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010). O ácido linoleico é o ácido graxo poli-insaturado mais predominante na dieta ocidental. Suas fontes são os óleos vegetais como o óleo de soja, óleo de milho e óleo de algodão (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010). Os ácidos ω -3, favorecem a produção de prostaciclina que previnem a formação de coágulo e causam vasodilatação. Suas fontes incluem óleo de linhaça, algumas algas e óleos de peixes marinhos (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010).

Outros ácidos graxos presentes nos óleos vegetais não são essenciais, mas suas atividades no organismo conferem-lhes interesse farmacológico. O ácido oleico (ω -9), é um ácido monoinsaturado que auxilia na redução dos níveis sanguíneos de colesterol LDL (*low density lipoprotein*, ou lipoproteína de baixa densidade). Chamado também de colesterol ruim, o LDL é uma molécula que, quando oxidada, participa do processo de formação das placas ateroscleróticas. Além disso, o ácido oleico aumenta os níveis sanguíneos de HDL (*high density lipoprotein*, ou lipoproteína de alta densidade). O HDL, ou colesterol bom, atua absorvendo e removendo moléculas de colesterol das artérias e transportando-as para o fígado, contribuindo para a diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol e, conseqüentemente, prevenindo riscos de doenças cardiovasculares e suas complicações (MARCELINO *et al.*, 2019). Suas fontes incluem o azeite de oliva, mas atualmente, o ω -9 é adicionado a outros óleos e alimentos para prevenção de doenças cardiovasculares

(ILLAM; NARAYANANKUTTY; RAGHAVAMENON, 2017; SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

O ácido oleico também possui relevância na indústria cosmética servindo de aditivo para a fabricação de sabões, sabonetes e cremes. Ele adiciona propriedades lubrificantes, emolientes e hidratantes às preparações de cremes e géis. O ácido oleico também pode ser encontrado em produtos para aplicação pós sol, já que possui propriedades regenerativas para a pele (POLJŠAK; KREFT; KOČEVAR GLAVAČ, 2020).

O ácido láurico é o componente primário do óleo de coco (45-53 %). As propriedades metabólicas e fisiológicas do ácido láurico são responsáveis por muitas das propriedades do óleo de coco. O ácido láurico é rapidamente absorvido, transportado e metabolizado no fígado. A maior parte do ácido láurico ingerido é diretamente convertido em energia e outros metabólitos, em vez de ser armazenado como gordura. É o ácido graxo que menos contribui para o acúmulo de gordura. O ácido láurico possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e vários fungos e vírus. O ácido láurico, tem atividade antimicrobiana, antioxidante, anticarcinogênica (BARLINA *et al.*, 2022; MATSUE *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2020; WALLACE, 2019)

3.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar da ciência que tem avançado rapidamente nos últimos anos. A característica que identifica a nanotecnologia é a utilização de materiais em escala nanométrica, ou seja, 10^{-9} metros. O princípio é que, devido ao pequeno tamanho, os materiais nanoparticulados possuem uma grande área de superfície e, por isso, geralmente, possuem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas, físicas ou químicas que diferem de partículas e superfícies de maior tamanho (BAYDA *et al.*, 2020; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A nanotecnologia consiste na manipulação do design, síntese e aplicação de ferramentas e dispositivos cujas dimensões sejam menores que 1000 nm. Como exemplo de produtos da nanotecnológicos utilizados no dia a dia estão as películas que revestem lentes de óculos. As películas nanométricas fornecem a estas lentes

propriedades autolimpantes, antirreflexo, entre outras. Outro exemplo comum são os circuitos elétricos complexos a nível da nanoescala, possibilitando a confecção de computadores, smartphones e equipamentos eletrônicos inteligentes, cada dia menores de tamanho (BAYDA *et al.*, 2020).

Durante as últimas décadas, o potencial da nanotecnologia na área médica vem sendo explorado. Uma das áreas da medicina na qual a nanotecnologia apresentou mais avanços foi o campo da oncologia. Houve melhora da eficácia de quimioterápicos, por exemplo, a doxorrubicina, para várias células tumorais, como, câncer de mama, ovário e estômago (PATEL *et al.*, 2018). Esses avanços foram alcançados direcionando as moléculas de interesse (moléculas funcionais, nanopartículas com função de anticorpos e agentes citotóxicos) ao local do tumor. Este tipo de liberação é chamado de “*target*” *delivery*. Com este direcionamento, aliado à nanotecnologia, podem se melhorar as respostas aos tratamentos dos tumores, além de reduzirem significativamente a toxicidade dos quimioterápicos tradicionais (PATEL *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2017). Sendo assim, os métodos nanotecnológicos podem auxiliar na melhora do tratamento do câncer.

3.3.1 Nanopartículas poliméricas

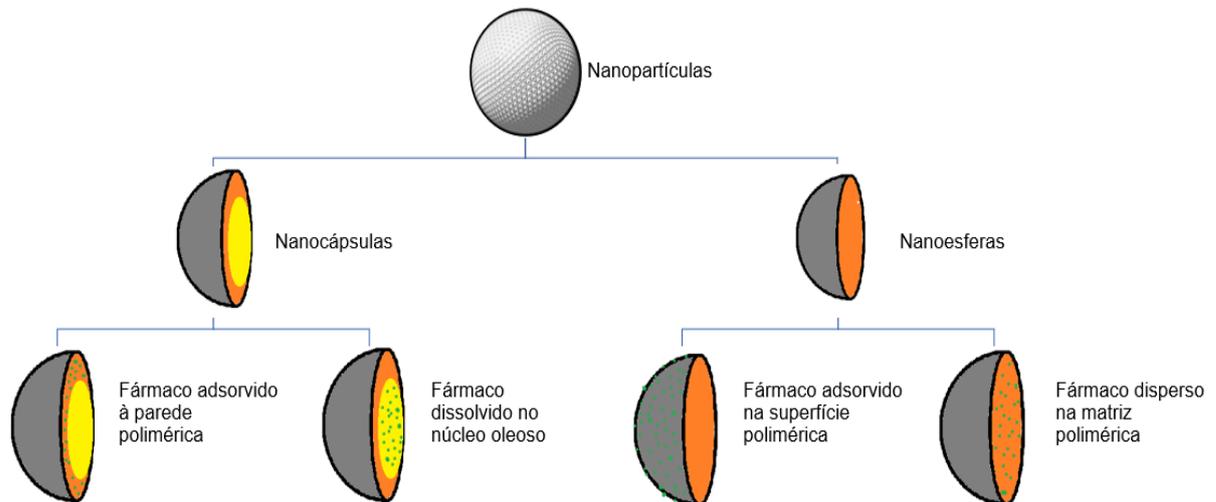
Sistemas nanocarregadores estão sendo estudados para a liberação de fármacos. Os nanocarregadores mais relevantes são as nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, microemulsões, lipossomas e niossomas (MANJU; SREENIVASAN, 2010).

Entre os sistemas nanoparticulados mais importantes estão nanoesferas e nanocápsulas. Estas preparações, constituídas geralmente por polímeros biodegradáveis, são sistemas coloidais de tamanho variando entre 100 e 500 nm que podem ser usados como carregadores de substâncias ativas. As substâncias ativas podem ser encapsuladas, adsorvidas ou dispersas na matriz das nanopartículas (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

As nanoesferas e nanocápsulas se diferenciam em sua estrutura. As nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica, onde a substância pode ficar retida ou adsorvida e não possuem óleo em sua composição. Já as nanocápsulas são sistemas nano-vesiculares em que a substância ativa está na forma líquida, sólida ou como dispersão molecular e confinada em uma cavidade lipofílica cercada por

revestimento polimérico (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A **Figura 2** apresenta as principais diferenças entre as nanocápsulas e nanoesferas.

Figura 2 – Representação esquemática de um corte transversal de Nanocápsulas e Nanoesferas



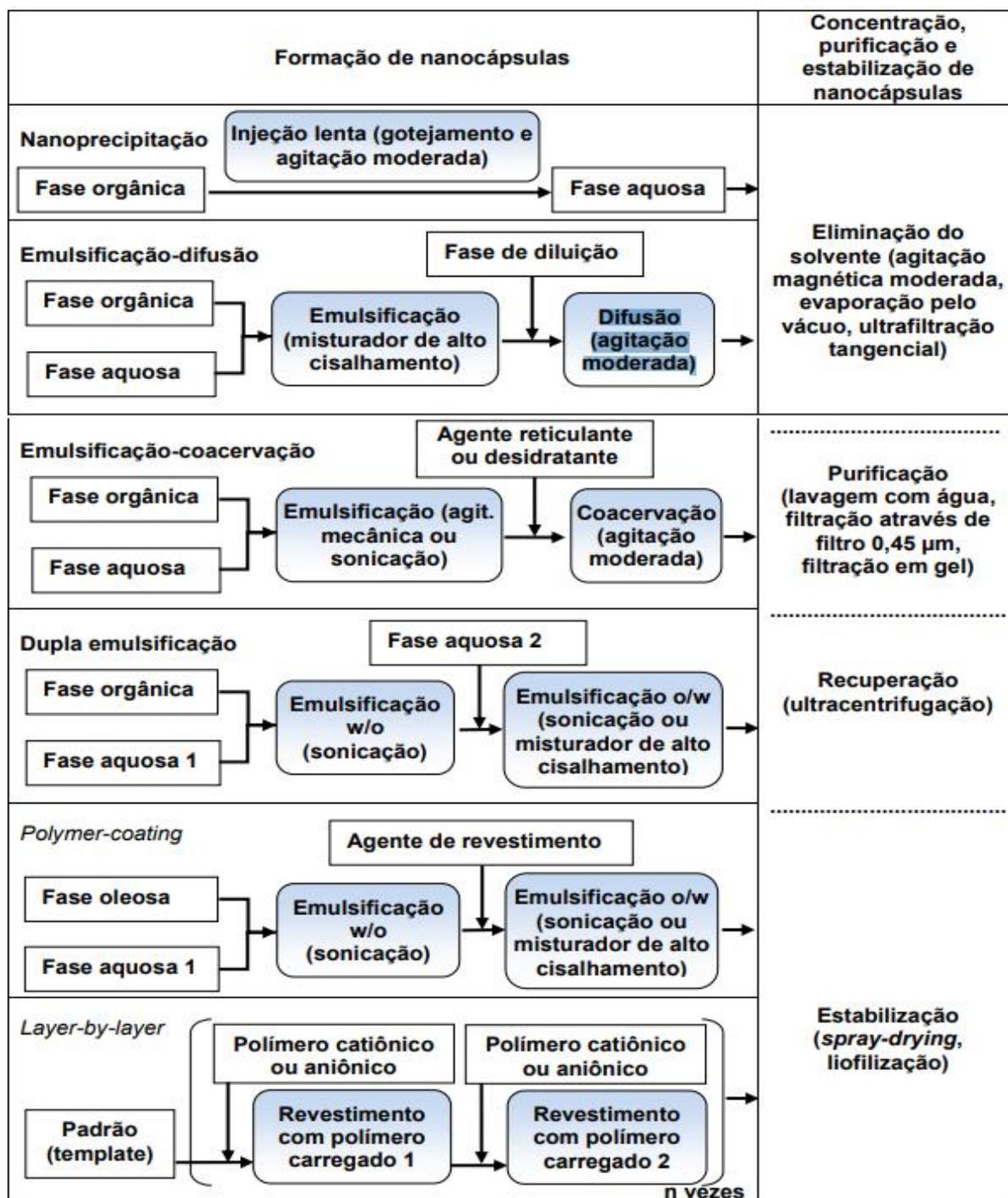
Fonte: O autor

Para a veiculação de substâncias ativas, os sistemas nanoparticulados apresentam significativas vantagens em relação aos métodos tradicionais. Dentre elas estão a liberação modificada do princípio ativo, maior permeabilidade intracelular; redução de toxicidade e aumento da estabilidade das substâncias ativas promovida pela proteção do invólucro polimérico contra fatores de degradação, como pH e luz. (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; VERGALLO, 2020).

3.3.2 Métodos de preparação de nanopartículas

Existem seis métodos para a preparação de nanocápsulas usando polímeros pré-formados: nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsificação, emulsão-coacervação, método camada por camada e método de revestimento de polímero (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Esses métodos estão resumidos no **Quadro 3**.

Quadro 3 - Métodos de preparação de Nanocápsulas



Fonte: Adaptação (STECANELLA, 2011). Original (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010)

O método de nanoprecipitação, também chamado de deposição de polímero seguido de deslocamento de solvente, é um método simples que necessita de duas fases, uma aquosa e uma orgânica. A fase orgânica é constituída basicamente por um ou mais solventes orgânicos, por uma substância formadora de filme (geralmente um polímero), pela substância ativa (dissolvida ou não em óleo), e

um tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrofílico lipofílico). A fase aquosa é formada por um líquido que não seja solvente para a substância formadora de filme (geralmente água destilada ou solução tampão) e por um ou mais tensoativos de alto EHL (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para a nanoencapsulação podem ser usados polímeros naturais (alginatos, gelatina, quitosana) e polímeros sintéticos. Os polímeros sintéticos são mais usados devido a maior pureza e reprodutibilidade. Entre os polímeros sintéticos, os mais usados são poli-ε-caprolactona (PCL), poli (ácido lático) (PLA) e poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA). O Eudragit® (polímero derivado de ácido metacrílico) e o poli (alquilciano acrilato) (PACA) também são usados como outros polímeros formadores de película. Para reduzir possíveis toxicidades causados pelos polímeros sintéticos, alguns são polimerizados com polietilenoglicol (PEG) para diminuir sua detecção pelo sistema imunológico (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Os tensoativos mais utilizados na preparação de nanocápsulas são os não iônicos como os ésteres de sorbitano: Tween e Span. Para dissolver os polímeros, é recomendável usar acetona, etanol, éter etílico ou misturas destes, por serem os menos danosos à saúde do manipulador e mais fáceis de eliminar por evaporação a baixas temperaturas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Para a preparação das nanocápsulas, a fase orgânica deve ser adicionada, gota a gota, sobre a fase aquosa sob agitação moderada com ou sem aquecimento e assim forma-se uma suspensão coloidal. Após a formação desta suspensão, o solvente deve ser eliminado em evaporador rotativo com pressão negativa (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O método de nanoprecipitação permite obter tamanho médio de partículas entre 250 e 500 nm. É o método mais utilizado na literatura (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

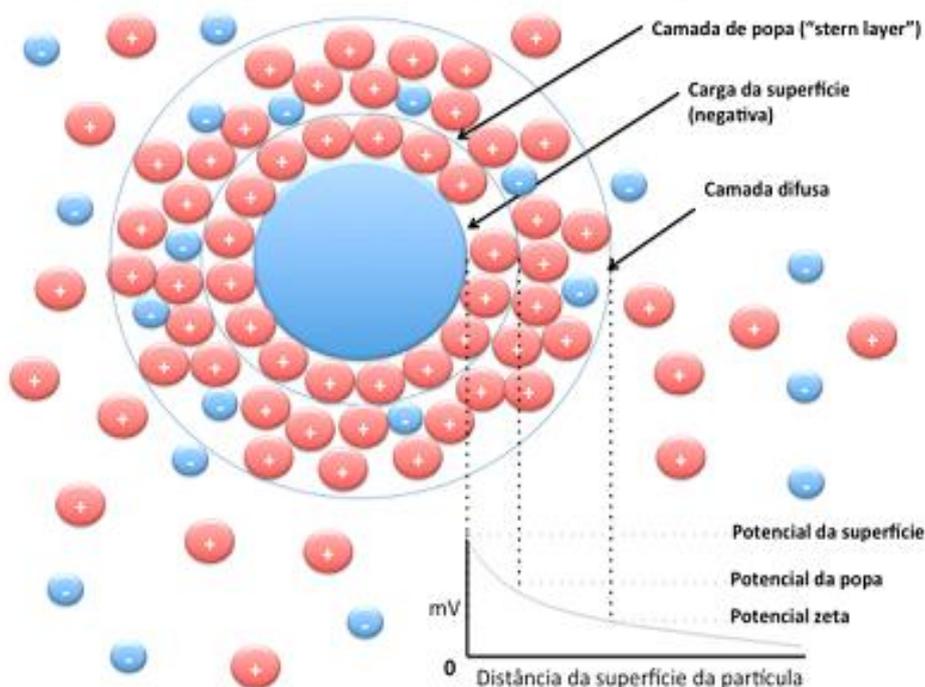
3.3.3 Estabilidade das nanopartículas

A estabilidade física dos sistemas nanoparticulados, assim como para outros sistemas coloidais, é a capacidade de não agregação e de se manter dispersos homoganeamente nas soluções. Seu desempenho *in vivo* depende de uma boa

estabilidade. A carga das nanopartículas tem muito a ver com a estabilidade (JAIN; THAREJA, 2019). As nanopartículas possuem uma dupla camada elétrica ao redor da sua superfície. A camada de Stern (*Stern layer*) é composta principalmente por íons de carga oposta à da partícula, fortemente ligados em sua superfície e que não se alteram facilmente frente a mudanças do meio. Em seguida, está a Camada Difusa, que é facilmente afetada por choque térmico, concentração de íons, entre outras variações do meio. A estabilidade das partículas coloidais é determinada pela carga na camada difusa (o potencial zeta) e pela estrutura da superfície. Isto é, quanto maior a carga (negativa ou positiva) maior a repulsão, e se manterá uma maior distância entre as partículas, tornando o meio mais estável (CLOGSTON; PATRI, 2011; SALOPEK; KRASI; FILIPOVI, 1992).

A determinação do potencial zeta (ζ) fornece informações sobre a carga das nanopartículas, portanto, fornece um sinal da repulsão ou atração elétrica entre elas (**Figura 3**). O potencial zeta é frequentemente determinado pelo método de espalhamento eletroforético da luz. Neste método, um campo elétrico fraco é passado através da suspensão diluída de nanopartículas contidas em uma cuba eletroforética e a velocidade das espécies carregadas se movendo em direção ao eletrodo de carga oposta (CLOGSTON; PATRI, 2011).

Figura 3 – Ilustração do potencial zeta de uma partícula carregada em suspensão



Fonte: Adaptação ZAMBERLAN, 2018. Original LAHORE et al., 2010

Potencial zeta maior que ± 30 mV indicam estabilidade da dispersão e indicam que há repulsão elétrica e bloqueio de contato entre as partículas. O potencial zeta também pode determinar se um material ativo com carga conhecida está adequadamente encapsulado no centro da nanocápsula ou adsorvida à superfície (MOHANRAJ; CHEN, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

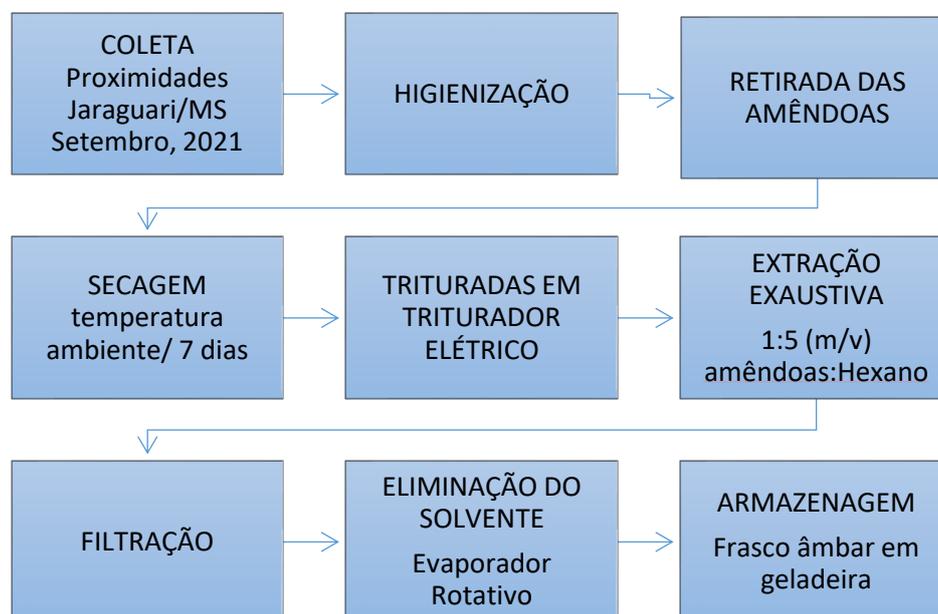
4.1 Material vegetal

Os frutos maduros da espécie foram colhidos no município de Jaraguari, Mato Grosso do Sul, nas coordenadas 20° 6' 58" S 54° 25' 44" O. A colheita foi feita no mês de setembro de 2021. A identificação botânica da espécie foi confirmada pelo departamento de Botânica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.2 Extração do óleo

Os frutos maduros foram secos em temperatura ambiente por 7 dias. Posteriormente, as amêndoas foram separadas e trituradas em triturador elétrico. Logo, procedeu-se à extração com n-hexano (Synth) utilizando uma proporção 1:5 m/v (amêndoa: solvente). A mistura permaneceu em ambiente escuro durante 7 dias e foi agitada ocasionalmente. A seguir, o extrato n-hexânico contendo o óleo foi filtrado com papel filtro para retirada de impurezas físicas e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório a vácuo, à 50°C. O óleo foi armazenado em frasco âmbar em geladeira até sua utilização (**Figura 4**).

Figura 4 – Processo de coleta e obtenção do material vegetal



4.3 Caracterização físico-química do óleo

Foram avaliados o índice de acidez, o índice de iodo, índice de saponificação, seguindo as metodologias do Instituto Adolfo Lutz (2008) e métodos oficiais da *American Oil Chemists' Society* (AOCS). Foram determinados também, o índice de Refração e a densidade relativa a 25°C seguindo as metodologias da Farmacopeia brasileira (2019).

4.3.1 Determinação do índice de acidez

Pesou-se $2 \pm 0,05$ g de óleo em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foi adicionado 25 mL de uma combinação de éter etílico (Synth) e etanol (Synth) (2:1) e duas gotas de indicador fenolftaleína. Este conjunto foi titulado utilizando solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 M. O ponto final da titulação foi determinado pelo aparecimento de coloração rósea que persistiu por 30 segundos. O volume total de NaOH utilizado para a titulação foi empregado no cálculo do índice de acidez,

segundo método oficial AOCS e Instituto Adolfo Lutz (AOCS, 2017; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O ensaio foi realizado em triplicata.

Equação 1 - Índice de Acidez

$$\text{Índice de acidez (mg de KOH/g de óleo)} = \frac{V \times f \times 5,61}{P}$$

Sendo:

V = Volume (mL) de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

f = fator da solução de hidróxido de sódio

5,61 = equivalente grama KOH

P = massa de amostra (g).

4.3.2 Determinação do índice de Iodo

Em um frasco Erlenmeyer (com tampa) de 500 mL, foi pesado 0,25g do óleo, com uma precisão de 0,005g em balança analítica (Sartorius, Alemanha). Em seguida, foi adicionado 10 mL de tetracloreto de carbono. Utilizando uma bureta, foi transferido 25 mL de solução de Wijs para o frasco Erlenmeyer. O frasco foi então tampado e agitado cuidadosamente com movimento de rotação até completa homogeneização. A mistura permaneceu em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, foi adicionado 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água recentemente fervida e fria à mistura.

Procedeu-se então a titulação com solução tiosulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Após a percepção desta coloração, adicionou-se 2 mL de solução indicadora de amido 1%, que fornece uma coloração azul. Em seguida, retomou-se a titulação até o completo desaparecimento da cor azul anteriormente citada. O ensaio foi realizado em triplicata e uma amostra branco também foi preparada. (AOCS, 1995; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

.

Equação 2 - índice de Iodo

$$\text{Índice de Iodo (g iodo/100g óleo)} = \frac{[(Vb - Va)] \times M \times 12,69}{P}$$

Sendo:

M = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃)

Vb = Volume (mL) de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco em mililitros

Va = Volume (mL) de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra em mililitros

P = massa da amostra em gramas

4.3.3 Determinação do índice de refração

Ajustou-se previamente o refratômetro de Abbé (TECNAL, Brasil) com água a 40°C até a estabilização da temperatura e calibrou-se o equipamento com água destilada (AOCS, 1990a). Os prismas foram limpos, completamente secos e então gotas suficientes foram posicionadas até cobertura do prisma. Após dois minutos de estabilização, a luz foi ajustada para obter a leitura do índice de refração. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.4 Determinação do índice de saponificação

Em um tubo de ensaio de 100mL, foram adicionados $4 \pm 0,05$ g de amostra de óleo e 50 mL de solução alcoólica de KOH (Synth). Os tubos foram acondicionados em um sistema de refluxo, onde permaneceram sob temperatura de 100°C por uma hora. Após o resfriamento do frasco, foi adicionado 1 mL de fenolftaleína e titulado com solução de ácido clorídrico 0,5 M (Dinâmica) até o desaparecimento da cor rósea (AOCS, 1993; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Equação 3 - Índice de Saponificação

$$\text{Índice de Saponificação (mg de KOH/g de óleo)} = \frac{28,05 \times F \times (B - A)}{P}$$

Sendo:

A = volume solução de ácido clorídrico 0,5 M gasto na titulação da amostra

B = volume solução de ácido clorídrico 0,5 M gasto na titulação do branco

F = fator da solução de HCl 0,5 M

P = massa de óleo (g)

4.3.5 Densidade Relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro, a 25°C (AOCS, 1990b). A massa de um picnômetro de vidro de 10 mL vazio foi determinada

usando uma balança analítica ($e=0,0001g$). Posteriormente foi determinada a massa do picnômetro preenchido com óleo das amêndoas de acuri e com água MiliQ. Para estabilizar a temperatura os picnômetros tampados foram mantidos em termostato a $25 \pm 0,1^{\circ}C$ por 30 minutos. A densidade relativa do óleo foi calculada usando a equação 4. O ensaio foi realizado em triplicata.

Equação 4 - Densidade Relativa

$$D_{25^{\circ}C} = \frac{A - B}{C}$$

Sendo:

A = massa do recipiente contendo óleo

B = massa do recipiente vazio

C = massa da água à temperatura de $25^{\circ}C$

4.4 Determinação do perfil de ácidos graxos por CG/MS

Foi avaliado o perfil de ácidos graxos do óleo das amêndoas de acuri por Cromatografia Gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG/MS) (Shimadzu, modelo GC-2010, Japão) utilizando um detector de ionização de chama (FID), com injetor do tipo “split/splitless”. A separação foi feita em coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento, 0,25mm diâmetro, BPX-70 (70% Cianopropil polisilfenilsiloxano). Os parâmetros de operação foram: temperatura do detector $250^{\circ}C$, temperatura do injetor: $250^{\circ}C$. A temperatura inicial da coluna foi de $80^{\circ}C$ (3 min), subindo gradativamente até $140^{\circ}C$ a $10^{\circ}C /min$ e depois até $240^{\circ}C$ a $5^{\circ}C/min$ e permanecendo nessa temperatura por 11 min. Para o gás de arraste, foi utilizado hélio com fluxo na coluna de 1,0 mL/min, ar sintético e hidrogênio como gás para o detector e nitrogênio como gás auxiliar, “make-up”. O volume de injeção foi de $1\mu L$. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção (tr) de ésteres metílicos de ácidos graxos da amostra e do padrão (FAME mix, 100mg – 37 componentes). A quantificação foi expressa em porcentagem do total de ácidos graxos identificados.

4.5 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

4.5.1 Seleção do polímero

Foi publicada uma revisão bibliográfica (Anexo I) que justificou a seleção do polímero Kollicoat® MAE 100 P como material de recobrimento das nanocápsulas. Este, é um polímero aniônico derivado do ácido metacrílico, com um comportamento de ácido fraco, que permanece intato em meios com pH <5,5. É utilizado como material de revestimento para comprimidos gastrorresistentes. Seu uso como revestimento de nanocápsulas poliméricas é escasso na literatura, porém promissor, pois tem mostrado especial aplicabilidade para encapsulação de ativos tanto de origem natural como químicos sintéticos (NETO *et al.*, 2021; PRADA *et al.*, 2019).

4.5.2 Formulação das nanocápsulas

As nanocápsulas contendo o óleo das amêndoas de acuri (NC) foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010), utilizando o polímero Kollicoat® MAE 100 P como agente formador da camada de recobrimento. A fase orgânica foi preparada dissolvendo 0,5 g de polímero Kollicoat® MAE 100P em 20 mL de uma mistura etanol: acetona (3:1) sob agitação a 400 rpm, durante 7 min. Em seguida, foi adicionado 0,5 g do óleo das amêndoas de acuri mantendo a agitação durante 10 minutos. A fase aquosa foi constituída por 100 mL de água destilada e 0,5g do tensoativo Tween 80. A fase orgânica foi adicionada gota a gota sobre a fase aquosa, sob agitação. A agitação foi aumentada para 650 rpm e a mistura foi mantida sob agitação durante 15 min. Logo após, o solvente foi evaporado em placa aquecedora a 50°C e agitação a 650 rpm. As nanocápsulas em solução foram transferidas para um frasco de cor âmbar, e preservado a temperatura ambiente por 24h até sua caracterização.

Para os testes de atividade biológica, foi preparada uma formulação de nanocápsulas branco, feita usando a mesma metodologia e quantidades de substâncias, mas sem a presença do óleo de acuri.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

4.6.1 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão foram medidos pela técnica de *Espalhamento Dinâmico da Luz*, utilizando o equipamento Zetasizer (Malvern, UK). As nanopartículas foram diluídas 1:9 (v/v) em água ultrapura. As leituras foram realizadas em um comprimento de onda do laser de 633 nm, 173° de ângulo de espalhamento, a 25°C. O comprimento de onda do laser foi equilibrado por 30 minutos antes da medição. Três medidas foram realizadas para cada amostra e a média \pm desvio padrão foi relatada (ISO 22412, 2008; MCNEIL, 2018).

4.6.2 Potencial zeta

O potencial Zeta das nanocápsulas foi medido usando a técnica de *Espalhamento eletroforético da luz* usando um equipamento Zetasizer (Malvern, UK). As amostras foram transferidas para cubetas de policarbonato com eletrodos de ouro (DTS1060). As amostras foram diluídas 1:9 (v/v) em água ultrapura e as medidas foram realizadas a 25°C, utilizando uma tensão de 150 V. Foram feitas três réplicas e se informou a média \pm desvio padrão (ISO 22412, 2008; MCNEIL, 2018).

4.6.3 Eficiência De Encapsulação

Uma amostra de 1,0 mL de suspensão de nanocápsulas foi transferida para tubos Eppendorf de 2 mL, e centrifugada a 21 krpm em uma ultracentrífuga Analítica (Optima XPN 80, Brasil) por 15 min, a 5 °C. O sobrenadante foi descartado. As nanocápsulas separadas no fundo do Eppendorf, foram lavadas três vezes e com água acidulada com HCl 0,01N, utilizando vórtex para resuspensão e centrifugadas a 21 krpm por 15 min a 5 °C. Posteriormente, foram dissolvidas em 1 mL de tampão PBS (pH 7,4) a 45°C, filtradas por uma membrana de 0,45 μ m (Millipore, USA). Em seguida, 0,20 μ L de filtrado foram diretamente injetados no sistema cromatográfico com as seguintes especificações: Cromatografia Gasosa (equipamento Shimadzu, Japão). Coluna

Zebron ZB-FFAP (recheio de ácido nitrotereftálico modificado/Polietileno Glicol) especial para ácidos graxos não derivatizados.

A coluna possuía dimensões: 60 metros x 0,25mm x 0,25 µm; injetor do tipo split/splitless e um volume de injeção de 0,2 µl. Hélio foi usado como gás de arraste, em fluxo constante de 2 mL/min. O programa de aquecimento do forno foi 40-260 °C a 5 °C/min. Foi usado um detector FID (detector de ionização de chama) a uma temperatura de 250 °C.

A identificação/quantificação foi feita por comparação com uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia C4-C40 (Sigma, USA). A quantificação foi expressa como porcentagem total de ácidos graxos.

A eficiência da encapsulação (EE) do processo foi determinada através da quantificação do óleo presente nas nanocápsulas em relação à quantidade original utilizada para a produção das nanopartículas e expressas em porcentagem. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Equação 5 - Eficiência de Encapsulação

$$EE (\%) = \frac{QO_{nc} \times 100}{QO_{inicial}}$$

Sendo:

QO_{NC} = Massa de óleo determinada

QO inicial = Massa de óleo usada na preparação

4.7 ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

4.7.1 Atividade antiproliferativa de células tumorais

Foi realizado um ensaio para avaliar o efeito antiproliferativo das nanocápsulas poliméricas carregadas com o óleo das amêndoas de *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret (acuri) frente a linhagens de células não tumorais e neoplásicas. Foram testados fibroblastos normais de murino NIH/3T3 (ATCC CRL-1658), fibroblastos normais de prepúcio humano HFF-1 (ATCC SCRC-1041), células tumorais prostáticas PC-3 (ATCC CRL-1435), células de adenocarcinoma renal humano 786-O [786-0] (ATCC CRL-1932), células tumorais de câncer de mama MCF7 (ATCC HTB-22), células de carcinoma hepático Hep G2 [HEPG2] (ATCC HB-8065) e

células de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231 (ATCC HTB-26). Este ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório de Cultura Celular Avançado (LCCA/FACFAN/UFMS).

As linhagens celulares HepG2, HFF-1 e NIH/3T3 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco-Invitrogen, Brasil) e as linhagens MCF7, MDA-MB-231, PC-3 em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco-Invitrogen, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco-Invitrogen, Brasil) e foram mantidas em condições adequadas (37°C, 5% de CO₂ e umidade) até a densidade celular ideal para o plaqueamento (5x10³/poço). Após 24h de adaptação, as células foram tratadas por 48h com concentrações de 0,25 a 250 µg/mL das nanocápsulas carregadas com óleo de acuri e 0,025 a 25 µg/mL de doxorrubicina. As células foram fixadas usando ácido tricloroacético 20% e, após enxague e secagem, foram coradas com Sulforrodamina B 0,1%.

Os controles usados foram: controle da ação do DMSO; Controle positivo (doxorrubicina), controle negativo, branco da amostra e leitura em tempo zero (antes do tratamento). A densidade óptica foi obtida a 540nm em leitor de microplacas de 96 poços (Spectramax 190) conforme metodologia de (SKEHAN *et al.*, 1990). A porcentagem de crescimento de cada linhagem de células tumorais avaliadas foi calculada em programa Excel 2003/2007, utilizando as fórmulas de Monks e colaboradores (1991). Os resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes (n=3) e para calcular a GI₅₀ foi usado o software Origin 6.0.

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre a GI₅₀ da substância teste para a linhagem de células não-tumorais (NIH/3T3) e a GI₅₀ nas células neoplásicas.

Equação 6 - Índice de Seletividade

$$\text{Índice de Seletividade (IS)} = \frac{GI_{50} \text{ NIH/3T3}}{GI_{50} \text{ células neoplásicas}}$$

4.8 Atividade biológica *in vivo*

4.8.1 Animais

Todos os testes com animais foram realizados em parceria com a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFAM sob Documento nº 019/2019 e da UFMS nº 1.249/2022. No ensaio de nocicepção foram usados camundongos *Swiss (Mus musculus)*, machos de 8 semanas de idade, com peso corporal entre 24-28 g. Para os ensaios de edema de pata, inflamação articular induzido por zymosan, toxicidade aguda oral e toxicidade em doses repetidas, foram usados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos, com peso corporal entre 180-220 g, de 12 semanas de idade. Em ambos os casos, os animais foram aclimatados nas condições de laboratório durante uma semana, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os animais tiveram acesso livre à água e ração padronizada para roedores durante todo o tempo de aclimatação.

4.8.2 Ensaio de nocicepção

Foi realizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético conforme metodologia descrita por Koster, Anderson e de Beer (1959). Foram formados aleatoriamente 7 grupos de três camundongos cada. O Grupo I foi usado como controle normal e a ele foi administrado somente por via oral, utilizando uma cânula intragástrica. O Grupo II (controle positivo) foi tratado com Diclofenaco de sódio (10 mg/kg). Já os Grupos III, IV, V receberam doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg das nanocápsulas carregadas com óleo de acuri (NC), respectivamente. O Grupo VI recebeu a dose de 10 mg/kg de óleo de acuri. Ao Grupo VII, Controle Negativo, foi administrado 10 mg/kg de nanocápsulas “branco”. Uma hora após a administração das substâncias de teste, aos grupos II ao VII, administrou-se por via intraperitoneal 0,5 mL de solução de ácido acético 0,6% em água para injeção. Em seguida, os animais foram colocados em jaulas individuais e observou-se o comportamento de cada animal durante 30 minutos, contabilizando o número de contorções abdominais. O cálculo da redução de nocicepção, em porcentagem, foi realizado usando a seguinte expressão:

Equação 7 - Redução da nocicepção

$$\text{Redução da Nocicepção (\%)} = \frac{[(C - T)] \times 100}{C}$$

Sendo:

C: número de contorções no controle negativo

T: número de contorções do tratamento

4.8.3 Ensaio edema de pata

O ensaio foi realizado conforme metodologia proposta por Morris (2003) e Winter, Risley, Nuss (1962) com algumas modificações. Foram formados seis grupos experimentais: o Grupo I com três animais e restante com cinco animais cada. Uma hora antes da aplicação da carragenina, os grupos experimentais foram tratados por via oral da seguinte forma:

Grupo I: Controle Negativo - 10 mg/kg de nanocápsulas branco (sem ativo).

Grupo II: Controle Positivo - Indometacina 10 mg/kg em solução salina

Grupo III: Nanocápsulas de óleo de amêndoas de acuri (NC) - 0,1 mg/kg

Grupo IV: NC - 1 mg/kg

Grupo V: NC - 10 mg/kg

Grupo VI: Óleo de amêndoa de acuri - 10 mg/kg

O edema foi induzido na pata posterior direita dos animais, por injeção intraplantar de 30 µL de uma solução 0,5 % de carragenina em solução salina. A pata esquerda foi usada como controle. O volume do edema foi medido em um pletismômetro (Ugo Basile, Itália) até a articulação tíbiotársica, nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 horas, após a injeção de carragenina. Cálculo da redução do edema:

Equação 8 - Redução do Edema

$$\text{Redução do Edema (\%)} = \frac{[(T_o - T)] \times 100}{T_o}$$

Sendo:

(To): Volume de edema no grupo controle negativo (mL)

(T): Volume de edema no grupo experimental, em cada tempo.

4.8.4 Atividade anti-inflamatória articular em modelo de artrite induzida por zymosan

Foram utilizados sete grupos experimentais com cinco animais cada. Uma dose de 0,5 mg de *zymosan* (Sigma-Aldrich) em 50 μ L de solução salina estéril foi administrada na cavidade intra-articular fêmoro-tibial da pata posterior direita dos animais (Grupos II ao VIII). Uma hora após da indução do efeito inflamatório, foram administrados os diferentes tratamentos, via oral, usando uma cânula intragástrica, seguindo o seguinte esquema:

Grupo I: Controle normal – 2 mL de água destilada.

Grupo II: Controle negativo – 10 mg/kg de peso de nanocápsulas branco.

Grupo III: Controle positivo – Dexametasona, 2 mg/kg

Grupo IV: Nanocápsulas de óleo de amêndoa de acuri (NC) – 0,1 mg/kg

Grupo V: NC – 1 mg/kg

Grupo VI: NC – 10 mg/kg

Grupo VII: Óleo de amêndoa de acuri – 10 mg/kg

Após seis horas da administração do *zymosan*, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e procedeu-se a lavagem da cavidade femoro-tibial com 10 μ L de solução salina contendo EDTA 10mM em solução tampão PBS, através da membrana sinovial (KEYSTONE *et al.*, 1977). O líquido da lavagem foi coletado por aspiração com uma seringa e 100 μ L do aspirado foram diluídos com 0,4 mL de solução de EDTA em solução salina estéril. O líquido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para contagem total leucócitos (expresso como número de leucócitos totais $\times 10^6$ /mL) e a determinação de óxido nítrico (μ M) (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

4.9 Estudos de toxicidade

4.9.1 Toxicidade Aguda Oral

Avaliação da toxicidade aguda oral foi realizada segundo as diretrizes OECD (2002). Foi utilizado o método das Classes de Toxicidade Aguda, empregando um grupo controle (composto por três animais) e dois grupos experimentais (com cinco animais cada). O Grupo I (controle) recebeu 1 mL de solução de carboximetilcelulose 0,5% em água. O Grupo II recebeu 2000 mg/kg de nanocápsulas carregadas com o óleo, suspensas na solução de carboximetilcelulose, enquanto que o Grupo III

recebeu igual dose (2000 mg/kg) de óleo de amêndoa de acuri puro, suspenso na solução de carboximetilcelulose.

Após a administração da dose única via oral, os animais foram observados durante 14 dias, sendo que, nos três primeiros dias, as observações foram a cada uma hora. Foi avaliada sua resposta motora, sua respiração, cor das mucosas da boca e os olhos, e sua pele e pelagem. Os animais foram pesados em uma balança digital com uma precisão de 0,01 g, nos dias 0, 7 e 14. Também foram determinados o consumo de alimentos e água ao longo do experimento.

Foram realizadas análises hematológicas (hemoglobina, hematócrito, eritrócitos, leucócitos e plaquetas) usando utilizando um analisador hematológico automático (Mytic, Switzerland). Também foram monitorados parâmetros bioquímicos como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), triglicerídeos, colesterol total, ureia, creatinina, e proteínas totais) usando Kit comerciais.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com solução xilazina-cetamina 0,2 mL/100 g (8,75 mL de cetamina (100 mg/mL) e 1,25 mL de xilazina (100 mg/mL), seguido de deslocamento cervical (CLOSE *et al.*, 1996; FLECKNELL, 2016; KOHN *et al.*, 1997). Os órgãos (rins, coração, pulmões e fígado) foram então extraídos cuidadosamente, lavados com soro fisiológico, secos com papel de filtro e pesados. O peso relativo de cada órgão foi determinado dividindo a massa do órgão pelo peso corporal do animal e expresso em porcentagem.

4.9.2 Toxicidade Subcrônica Em 28 Dias

O ensaio foi feito seguindo a metodologia da Guia (OECD, 2008b). Os animais foram divididos em três grupos e tratados durante 28 dias da seguinte maneira:

- Grupo I (Controle): O Grupo I (controle) recebeu 1 mL de solução de carboximetilcelulose 0,5% em água.
- Grupo II (Nanocápsulas): 1000 mg/kg de nanocápsulas carregadas com o óleo, suspensas na solução de carboximetilcelulose.
- Grupo III (óleo): 1000 mg/kg óleo de amêndoa de acuri, suspenso na solução de carboximetilcelulose.

Os animais foram pesados em uma balança digital com uma precisão de 0,01g, nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Também foram determinados o consumo de alimentos e

água ao longo do experimento. Ensaio bioquímicos e hematológicos, assim como o procedimento de eutanásia e peso relativo dos órgãos ao final do experimento, foram feitos usando a mesma metodologia descrita no ensaio de toxicidade aguda oral.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado o teste ANOVA de uma via, seguido do teste HSD de Tukey, para avaliar diferenças estatísticas entre as medias dos parâmetros de mais de dois grupos experimentais (ensaio de toxicidade). Para comparação de medias entre dois grupos foi utilizado o teste t-Student. Em todos os casos a diferença estatística foi estabelecida com um nível de significância $p < 0,05$. Foi usado o pacote estatístico StatGraphics Centurion v. XVI (StatEase Co., USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do óleo

O óleo das amêndoas de acuri (OAA) obtido neste trabalho por extração a frio usando n-hexano, é um líquido amarelo claro, translúcido, e não viscoso. Tem o aroma característico da fruta madura fresca. Possui um índice de refração de 1,4530, que é levemente maior do que o índice de refração do óleo de coco (1,4492) (BRASIL, 1999). Do mesmo modo o OAA possui uma densidade relativa (a 30°C) de 0,902, que é levemente menor do que a densidade relativa do óleo de coco refinado que varia entre 0,915 e 0,920 (BRASIL, 1999). Em geral a densidade e o índice de refração dependem da temperatura e da composição dos óleos. O índice de refração é maior, na medida que aumenta o número de insaturações (BIJLA *et al.*, 2021). A **Tabela 1** sintetiza as características físico-químicas do óleo das amêndoas de acuri (OAA).

Tabela 1 – Características físico-químicas do óleo da amêndoa de *Attalea phalerata*

Parâmetro	Resultado
Índice de refração (40°C)	1,4530 ± 0,0010
Densidade relativa	0,902 ± 0,003
Índice de acidez (mg de KOH/g de óleo)	2,66 ± 0,18
Índice de Iodo (mg de iodo/kg de óleo)	23,23 ± 2,35

Índice de saponificação (mg de KOH/g de óleo)	242,53 ± 6,46
-----------------------------------------------	---------------

O índice de acidez é o teor de ácidos graxos livres, quantificado como a quantidade de hidróxido de potássio (KOH) em gramas, necessários para neutralizar um grama de óleo. É um parâmetro utilizado pelos órgãos reguladores, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2021) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006), para determinar a qualidade dos óleos. Reações de hidrólise ou oxidação nas cadeias de ácidos graxos do óleo liberam íons hidrogênio, que aumentam sua acidez. Altos índices de acidez indicam que o óleo pode não ser apropriado para o consumo humano. A maior parte dos processos de degradação dos óleos são catalisados por ácidos (VERGALLO, 2020).

De acordo com o MAPA (2006), o teor máximo de acidez aceitável é de 3,00 mg KOH/g de óleo. A acidez do OAA neste estudo foi $2,66 \pm 0,18$ mg KOH/g, valor dentro dos padrões aceitáveis para consumo. Existem poucos estudos na literatura descrevendo fisicoquimicamente o OAA, porém, em um estudo desenvolvido com o objetivo de avaliar a utilização deste óleo como biodiesel, houve variações importantes entre lotes do fruto, com índices de acidez variando entre 1,33 e 8,72 mg KOH/g de óleo (BARRETO; NUNOMURA, 2008). Em outro estudo, obteve-se índice de acidez mais baixo, 0,12 % (BALDIVIA, 2018). Esta variação mostra que, por se tratar de um produto natural, é possível que ocorram variedades intrínsecas ao fruto.

O índice de iodo é uma medida da quantidade de insaturações dos ácidos graxos presentes em um óleo. Também indica a quantidade de iodo que se liga as insaturações dos ácidos graxos do óleo (BIJLA *et al.*, 2021). O OAA apresentou um índice de iodo de 23,23 (mg de iodo por grama de óleo). Isso indica que o óleo possui uma relativa alta quantidade de ácidos graxos insaturados, se comparado com o valor máximo estabelecido (11 mg de iodo /g de óleo) para o óleo de coco refinado (BRASIL, 1999). No entanto, os óleos mais insaturados são considerados os mais saudáveis para consumo humano. Também, os óleos com alta quantidade de ácidos graxos insaturados têm uma forte propensão a oxidar, sendo importante armazená-los adequadamente para evitar a deterioração (BIJLA *et al.*, 2021; GAGOUR *et al.*, 2022).

O índice de saponificação é um indicador da massa molecular dos triglicerídeos presentes em um óleo (BIJLA *et al.*, 2021). É um indicador muito importante para a

produção de sabão, xampus e bases para cremes. O OAA mostrou um índice de saponificação de 242,53 mg de KOH por grama de óleo. Esse valor é similar ao índice de saponificação do óleo de coco refinado que é de 248 mg de KOH por grama de óleo (Brasil, 1999). Isso sugere que ambos os óleos têm uma composição similar de ácidos graxos. Por essa razão, provavelmente, é que o OAA é usado muitas vezes como substituto de óleo de coco.

A **Tabela 2** apresenta o perfil de ácidos graxos do OAA, obtido por cromatografia gasosa. O óleo apresentou 79,60% de ácidos graxos saturados e 20,35% de ácidos graxos insaturados. O ácido láurico (433,26 mg/g) foi o ácido insaturado presente em maior proporção, e o ácido oleico (180,06 mg/g) tem a maior presença entre os ácidos insaturados com 18,01%.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos do óleo da amêndoa de *Attalea phalerata*

Cadeia	Nome Ácido Graxo	(mg/g)
<i>Saturados</i>		
C _{8:0}	Ácido octanoico (caprílico)	87,30
C _{10:0}	Ácido decanoico (cáprico)	79,05
C _{12:0}	Ácido dodecanoico (láurico)	433,26
C _{14:0}	Ácido tetradecanoico (mirístico)	107,99
C _{16:0}	Ácido hexadecanoico (palmítico)	66,87
C _{18:0}	Ácido octadecanoico (esteárico)	22,02
<i>Insaturados</i>		
C _{18:1n9c}	ácido 9-octadecenóico (oleico)	180,06
C _{18:2n6c}	ácido 9,12-octadecadienoico (linoleico)	23,45

Ácidos graxos saturados: 79,65%, Ácidos graxos saturados: 20,35 %

O perfil de ácidos graxos do OAA foi investigado em apenas outros dois estudos recentes disponíveis na literatura. Em ambos os casos, o óleo foi extraído por prensagem a frio, metodologia diferente deste estudo, que utilizou n-hexano para a extração. No estudo de Barreto (2008), o conteúdo de ácido láurico foi de 405,6 mg/g, e o conteúdo de ácido oleico foi 136,5 mg/g. Baldivia encontrou uma predominância similar 64% de ácidos graxos saturados e 36 % de insaturados. O ácido láurico foi majoritário, com 28,87%. (BALDIVIA *et al.*, 2018; BARRETO, Andreza Cruz; NUNOMURA, 2008).

O ácido dodecanoico (C₁₂, ácido láurico), tem mostrado capacidade para reduzir o colesterol, reduzir inflamações, e manter o peso corporal. A manutenção do peso corporal causada pelo ácido dodecanoico está associada ao fato de que ele é rapidamente convertido em energia pelo fígado, sem acúmulo de gorduras (DAYRIT, 2015). Os ácidos 9,12-octadecadienoico (C_{18:2n6c}, ômega 6) e ácido 9-octadecenóico (C_{18:1n9c}, ômega 9) são conhecidos como ácido linoleico e ácido oleico, respectivamente. Eles são ácidos graxos essenciais para o organismo humano e contribuem para reduzir o colesterol total e o colesterol de baixa densidade (LDL), além de melhorar a sensibilidade à insulina, e reduzir a pressão arterial (SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2015). Ambos os ácidos possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Por essa razão, o consumo desses ácidos é associado com a redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes e a morte prematura por essas causas (BIJLA *et al.*, 2021; GAGOUR *et al.*, 2022).

A composição de ácidos graxos do OAA, e as atividades farmacológicas associadas aos ácidos graxos nele contido, fazem deste óleo um produto que pode contribuir muito ao combate de diversas doenças. É, então, imprescindível, a agregação de valor ao OAA, para contribuir ao desenvolvimento do extrativismo regional das comunidades tradicionais.

5.2 Caracterização das nanocápsulas

As nanocápsulas foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação. Neste método de baixa energia, se usa uma fase aquosa (contendo água e surfactante) e uma fase orgânica (contendo solventes, polímero, um dispersante e o ativo, neste caso o óleo de acuri). A fase orgânica é gotejada sobre a fase aquosa com agitação, reduzindo a solubilidade do polímero e provocando a difusão do solvente orgânico. Nesse processo se formam as nanocápsulas em suspensão aquosa e se consegue eliminar o solvente. Este é um método reprodutível, robusto e escalável, que é economicamente acessível para laboratórios de pesquisa e indústria (LAMMARI *et al.*, 2020; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Os resultados dos testes para a selecionar a melhor composição das nanocápsulas estão expressos na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Resultados do planejamento experimental utilizado para o desenvolvimento das nanocápsulas carregadas com óleo de acuri.

Fórmula	Variáveis Independentes			Variáveis independentes	
	Tensoativo	Polímero (g)	Agitação (rpm)	Tamanho (nm)	Polidispersão
1	0,25	0,75	250	232,0 ± 203,10	0,380 ± 0,08
2	0,5	0,75	250	*	*
3	0,25	0,5	250	550,70 ± 50,34	0,340 ± 0,29
4	0,5	0,5	250	362,20 ± 225,50	0,412 ± 0,12
5	0,25	0,75	450	308,20 ± 185,90	0,437 ± 0,09
6	0,5	0,75	450	378,40 ± 287,50	0,607 ± 0,26
7	0,25	0,5	450	430,30 ± 130,32	0,230 ± 0,28
8	0,5	0,5	450	368,97 ± 8,90	0,298 ± 0,03

Valores expressos como a média de triplicatas após 24 h de preparo; *, indica separação de fases.

Uma maior quantidade de polímero (0,75 mg, fórmulas 1, 2, 5 e 6) independentemente da velocidade da velocidade de agitação e da quantidade de tensoativo, produziu um aumento significativo do tamanho de partículas e do alto índice de polidispersão. Essas formulações apresentaram separação de fases após 48 horas de preparação. Provavelmente a maior quantidade de Kollicoat, polímero do tipo dibloco contendo dodecilsulfato de sódio e Tween 80 na sua composição (BASF, 2019) teve maior efeito como formador de micela polimérica que como formador de camada, e depois de 48 h as micelas quebraram, e aconteceu a separação de fases.

A velocidade de agitação mais baixa (250 rpm, fórmulas 1, 2, 3 e 4) independentemente da quantidade de polímero e de tensoativo causou aumento significativo do índice de polidispersão, com distribuições bi e tri modais e do mesmo modo, as preparações mostraram separação de fase após 48 horas de preparação.

Uma maior velocidade de agitação (450 rpm) combinado com a menor quantidade de polímero (0,5 g), e a maior quantidade de tensoativo (0,5 g) na fórmula 8 apresentou um tamanho de 368,97 nm e uma polidispersão de 0,298, que, ao contrário das demais formulações, e não apresentou separação se fases, mantendo sua cor e transparência após 48 horas de preparação. Esta formulação foi selecionada para a caracterização e os estudos de atividade biológica.

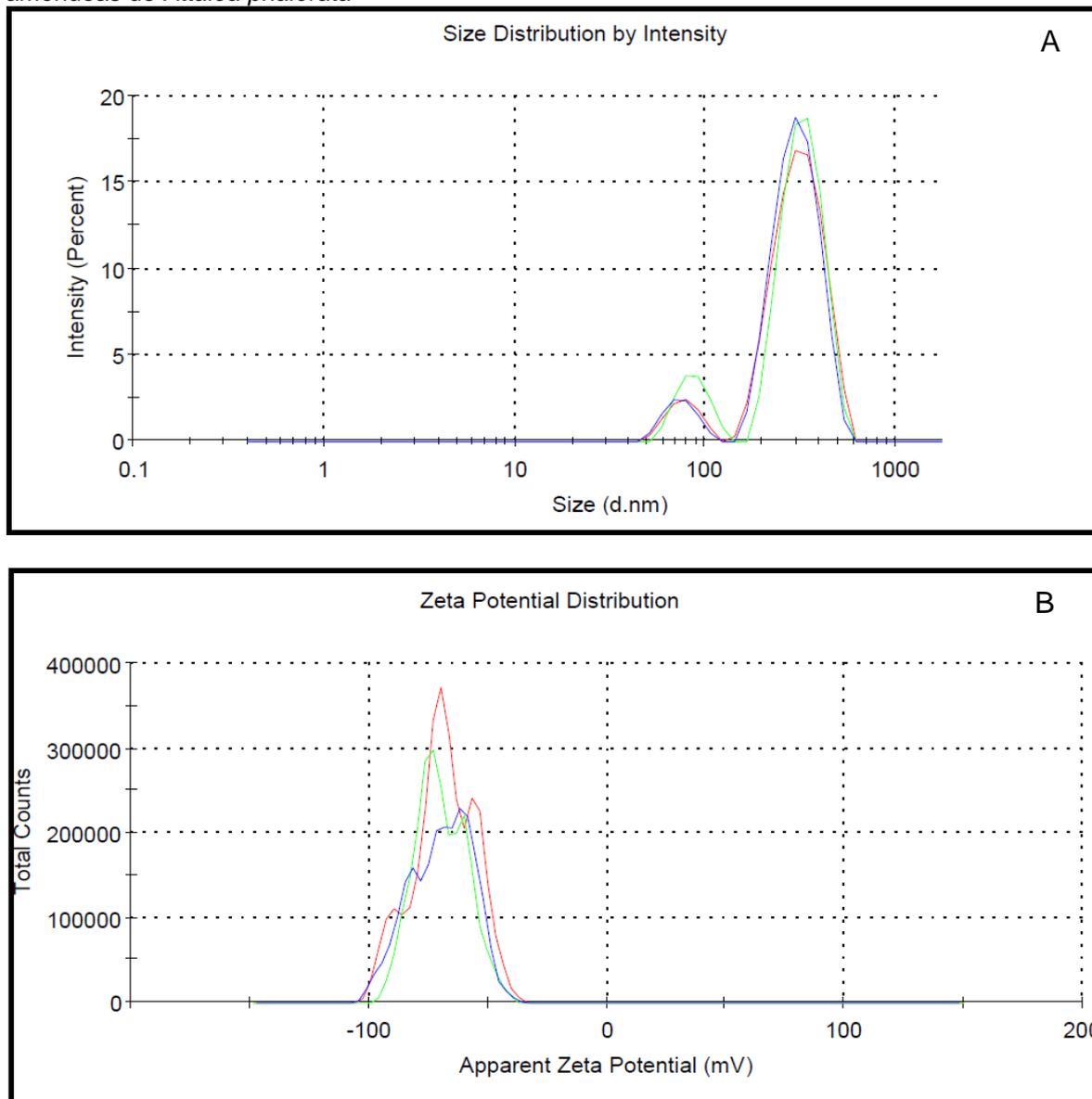
Neste trabalho, a utilização do polímero Kollicoat® MAE 100P, que contém em sua fórmula polisorbato 80 (2,3%) e lauril sulfato de sódio (0,7%), dispensou o uso de surfactante baixo EHL na fase orgânica. Este polímero é ainda pouco utilizado para a formação de nanocápsulas, mas tem grandes vantagens, como ausência de toxicidade, formação de uma camada dura e flexível, proteção contra o pH estomacal, entre outras. (ACACIO et al., 2023; PRADA, *et al.*, 2016; PRADA *et al.*, 2019).

A suspensão de nanocápsulas carregadas com o óleo das amêndoas de acuri (NC) apresentou, uma cor esbranquiçada, opaca, de aparência homogênea e sem material precipitado, o que indica uma boa estabilidade, após 24 h de sua preparação. Apresentou um pH de $5,05 \pm 0,05$, característico das formulações de nanocápsulas revestidas com Kollicoat® MAE 100P (NETO *et al.*, 2021; PRADA *et al.*, 2019). Um pH menor que 5,5 favorece a manutenção da camada de recobrimento das nanocápsulas, pois pH maiores que 5,5 dissolvem o Kollicoat® MAE 100P (BASF, 2019). As nanocápsulas mostraram uma distribuição de tamanho (índice de polidispersão: $0,298 \pm 0,03$) relativamente homogênea e um tamanho de $368,97 \pm 8,90$ nm (**Figura 5**), que justifica a opacidade na aparência da suspensão de nanocápsulas. Um alto ζ -potencial ($-69,20 \pm 0,61$), contribui para a manutenção da estabilidade, com nanopartículas suspensas homoganeamente, que não se agregam nem precipitam devido à grande repulsão eletrostática.

A característica fundamental de um sistema nanoparticulado é o tamanho de partícula, que deve ser menor de 1000 nm ($1\mu\text{m}$). A faixa entre 100 - 300 nm é o tamanho normalmente obtido pelo método de nanoprecipitação (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). O tamanho de partícula obtido neste estudo ($368,97 \pm 8,90$ e $401,93 \pm 12,67$ após 30 dias) condiz com o geralmente encontrado na literatura para nanocápsulas preparadas pelo método de nanoprecipitação com a utilização de polímero pré-formado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998).

O potencial zeta está relacionado à carga (potencial elétrico) e a estabilidade do sistema nanoparticulado. De modo geral, quanto maior o valor modular do potencial zeta mais estáveis serão os sistemas coloidais. Na literatura, tem se estabelecido que, valores maiores que 30 mV e menores que -30 mV promovem melhor estabilidade, mediada por repulsão eletrostática, prevenindo a agregação das partículas (MOHANRAJ; CHEN, 2007b).

Figura 5 – Tamanho de partículas (A) e Potencial Zeta (B) das Nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata*



O processo de preparação das nanocápsulas apresentou uma excelente eficiência de encapsulação de $88,77 \pm 0,51$ %. A eficiência obtida neste trabalho foi melhor do que a eficiência obtida em outros processos de preparação de nanocápsulas usando a mesma metodologia e o mesmo polímero. Por exemplo, a eficiência do processo de encapsulação de α -amirina foi de 65,47% (NETO *et al.*,

2021). Essa diferença poderia estar relacionada à utilização de ultrassom no processo de formação das nanocápsulas de acuri, que poderia ser mais efetivo que a agitação em Instrumento de dispersão de alto desempenho, usada para nanoencapsular a α -amirina.

5.3 Atividade antiproliferativa

O câncer é a segunda causa de morte no Brasil (INCA, 2022) e uma das primeiras causas de morte natural no mundo. Nos Estados Unidos, o câncer de próstata é a segunda principal causa de morte por câncer em homens (AMERICAN SOCIETY OF CANCER, 2022). Assim, pesquisas orientadas para a descoberta de novos ativos e novos tratamentos contra os diversos tipos de câncer são imprescindíveis. Neste trabalho foi feita a avaliação da atividade antiproliferativa das NC frente a diversas linhagens de células tumorais. Na **Tabela 3** se apresentam Valores de GI_{50} e na **Tabela 4** os valores de índice de seletividade das nanocápsulas obtidas neste trabalho.

Tabela 4 – Atividade antiproliferativa de nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata*, em diversas culturas de células tumorais.

<i>Linhagens celulares</i>	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Doxorrubicina</i>	<i>NC de acuri</i>
NIH/3T3 fibroblastos normais de murino	3,89 \pm 0,41	>250
HFF-1 fibroblastos normais de prepúcio humano	2,45 \pm 0,03	61,56 \pm 0,32
HepG2 células de carcinoma hepático	0,25 \pm 0,02	98,33 \pm 2,11
MCF-7 células tumorais de câncer de mama	0,19 \pm 0,01	>250
MDA-MB-231 células de câncer de mama triplo negativo	1,51 \pm 0,03	>250
PC-3 células tumorais prostáticas	0,28 \pm 0,01	2,09 \pm 0,11
786-0 células de adenocarcinoma renal humano	0,26 \pm 0,02	3,03 \pm 0,12

GI_{50} = concentração que causa 50% de inibição do crescimento das células tumorais.

NC = nanocápsulas carregadas com óleo das amêndoas de acuri

Tabela 5 – Índice de seletividade das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata* em diversas culturas de células tumorais

Índice de Seletividade	Nanocápsulas de acuri
PC-3 células tumorais prostáticas	119,61 ± 1,33
786-0 células de adenocarcinoma renal humano	82,45 ± 1,34
HepG2 células de carcinoma hepático	2,54 ± 0,37

As NC não apresentaram atividade inibidora do crescimento das células não tumorais (NIH/3T3, $GI_{50} > 250$ mg/mL). Opostamente, as nanocápsulas produziram um forte efeito inibidor do crescimento das células tumorais prostáticas PC-3 (GI_{50} 2,09 µg/mL). Além disso, as nanocápsulas mostraram um alto índice de seletividade (119,61). Isso sugere que, tratamentos feitos usando as NC poderiam ser muito efetivos e não causariam danos às células não tumorais. Óleos de algumas palmeiras tem mostrado atividade anticancerígena. O óleo de coco, por exemplo, mostrou atividade antiproliferativa de câncer de próstata induzido por testosterona. Seu efeito antitumoral tem sido associado ao conteúdo dos ácidos láurico (C_{12}) e mirístico (C_{14}) (ARRUZAZABALA *et al.*, 2010). Esses ácidos graxos estão presentes em quantidades de 43,33 % (ácido láurico) e 10,80 % (ácido mirístico) no OAA e poderiam ter um papel essencial na atividade antiproliferativa de células de câncer prostático (PC-3). Outro fato que poderia contribuir nessa atividade, é que os ácidos graxos contidos no óleo estão na forma de nanocápsulas recobertas por Kollicoat® MAE 100P. O tamanho nano poderia melhorar a absorção do ativo e o polímero tem mostrado a capacidade de liberar mais lentamente os ativos (NETO *et al.*, 2021; PRADA *et al.*, 2019), favorecendo assim a biodisponibilidade e melhorando o efeito das nanocápsulas.

O câncer renal é um dos dez cânceres mais comuns em adultos. Só nos USA, 81.800 novos casos são diagnosticados a cada ano e 15 mil pessoas morem por sua causa. A maioria das pessoas são diagnosticadas entre 65 e 74 anos. Tendo em conta

o envelhecimento constante da sociedade contemporânea, novas substâncias e tratamentos contra este tipo de câncer, podem fazer diferença na vida de muitas pessoas (AMERICAN SOCIETY OF CANCER, 2022).

Frente as células de câncer renal, as nanocápsulas também mostraram um potente efeito inibidor de crescimento (GI_{50} 3.03 $\mu\text{g/mL}$) e um alto índice de seletividade (82,50). Do mesmo modo, o valor de $GI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ e o alto valor de índice de seletividade ($SI > 10$) sugerem que as NC são um produto nanotecnológico promissor (AWOUAFACK et al., 2013; PEÑA-MORAN et al., 2016) que deve seguir sendo estudado para verificar sua efetiva utilidade em câncer renal.

As nanocápsulas também inibiram significativamente o crescimento das células de câncer de fígado (GI_{50} 98,33 $\mu\text{g/mL}$), mas o índice de seletividade foi baixo ($SI = 2,54$). Alguns autores consideram que as substâncias com $SI > 2$ possuem uma seletividade adequada e devem seguir sendo estudadas (WEERAPREEYAKUL et al., 2012). No entanto, todos os autores consideram que quanto maior o SI , maior a taxa de mortalidade das células tumorais em comparação com as células não tumorais.

Os baixos valores de GI_{50} e altos valores de SI das NC frente as linhagens tumorais de próstata (PC-03) e de rins (786-0) sugerem que este é um produto promissor que deve seguir-se estudando, com intuito de descobrir sua verdadeira utilidade como antitumoral.

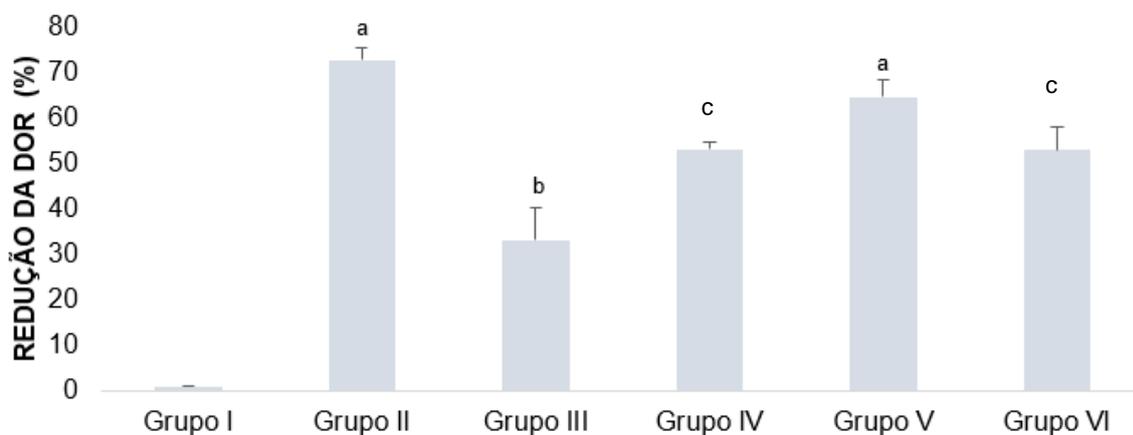
5.4 Atividade antinociceptiva

A nocicepção é o processo fisiológico pelo qual os tecidos do corpo são protegidos contra danos. O ensaio de antinocicepção é usado para avaliar a eficácia de substâncias na redução da sensibilidade à dor (LOPEZ-BELLIDO; GALKO, 2020). Pode envolver a medição de respostas mecânicas a estímulos ou o monitoramento da expressão de marcadores inflamatórios (LOPEZ-BELLIDO; GALKO, 2020). Existem vários métodos para avaliar comportamentos de dor em roedores, incluindo o teste de contorções induzida por ácido acético, que foi usado neste trabalho. O ensaio de contorção induzido por ácido acético é utilizado para detectar efeito de analgesia central e periférica das substâncias testadas (CUNHA et al., 2005).

A administração do ácido acético causa a liberação de mediadores inflamatórios relacionados à nocicepção, principalmente as prostaglandinas, além de

aminas simpaticomiméticas, fator de necrose tumoral e interleucinas (FERREIRA, et al., 1993, 1988; NAKAMURA; FERREIRA, 1987; RIBEIRO et al., 2000). Na **Figura 6** se apresentam os resultados do teste de contorções induzidas por ácido acético, expressas como porcentagem de redução da dor.

Figura 6 – Efeito antinociceptivo das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata* no teste de contorções abdominais em camundongos Swiss.



Grupo I = 10 mg/kg de nanocápsulas branco por via oral. Grupo II (controle positivo) = Diclofenaco de sódio 10 mg/kg. Grupos III, IV, V = 0,1, 1 e 10 mg/kg de nanocápsulas carregadas com óleo de acuri, respectivamente. Grupo VI = 10 mg/kg de óleo de acuri puro. Letras diferentes indicam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A ação analgésica do controle positivo Diclofenaco (10mg/kg) está relacionado, principalmente à inibição da COX-2 (mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE)) e a consequente inibição de prostaglandinas. As prostaglandinas sensibilizam os nociceptores, reduzindo seu limiar de excitabilidade, favorecendo a algia e, conseqüentemente, a nocicepção (GAN, 2010). O Diclofenaco, além da inibição da COX-2, também provoca dessensibilização de receptores periféricos da dor – previamente sensibilizados pelo estímulo – configurando assim um mecanismo múltiplo de antinocicepção (TONUSSI; FERREIRA, 1994). Em um ensaio clínico realizado com humanos, demonstrou-se que o Diclofenaco via oral apresenta efeito central e periférico na diminuição da nocicepção (BURIAN *et al.*, 2003).

As NC na dose de 1,0 mg/kg produziram um efeito analgésico que não foi estatisticamente diferente do efeito do OAA na dose 10 mg/kg. As nanocápsulas na

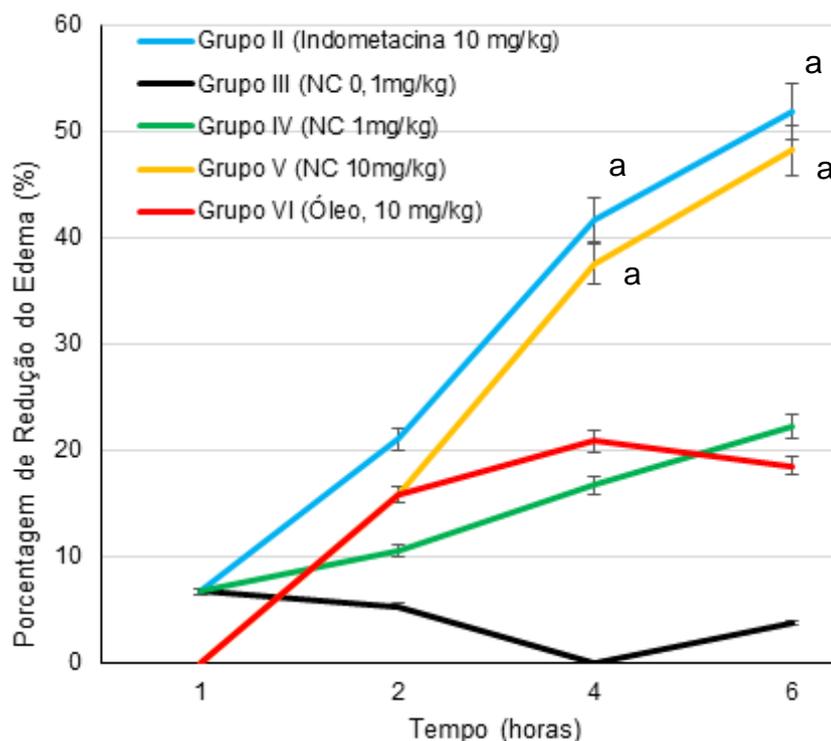
dose 10 mg/kg mostraram um forte efeito antinociceptivo, que foi maior e estatisticamente diferente do efeito produzido pelo óleo na mesma dose. O efeito das nanocápsulas na dose 10 mg/kg não foi estatisticamente diferente do controle positivo.

Em um estudo que avaliou o efeito antinociceptivo do óleo de coco na dose 4000 mg/kg em um modelo animal de contorções abdominais induzidas por ácido acético, houve redução moderada da nocicepção, estatisticamente menor do que o AINE utilizado como controle (INTAHPHUAK; KHONSUNG; PANTHONG, 2010). Estes resultados sugerem que a nanoencapsulação do OAA permitiu a potencialização dos ativos que compõem o óleo, com conseqüente aumento do efeito antinociceptivo, que foi comparável ao do controle positivo Diclofenaco. Sendo assim, as NC podem ter ação central e periférica na redução da percepção do estímulo nociceptivo.

5.5 Atividade anti-inflamatória

O ensaio de edema de pata induzido por carragenina é um modelo clássico para avaliar a resposta inflamatória vascular que permite predizer a atividade anti-inflamatória das substâncias. O processo inflamatório em resposta à carragenina consiste em três fases, que se diferenciam por seus mediadores inflamatórios. A primeira fase possui prevalência de histamina e serotonina, na segunda fase prevalece a bradicinina e a última fase é mediada principalmente por prostaglandina E₂, tromboxano, além da indução de COX-2 (MORRIS, 2003; NAKAMURA; FERREIRA, 1987; RIBEIRO *et al.*, 2000). Os resultados da porcentagem de redução do volume do edema após o estímulo de carragenina, por grupo experimental, ao longo do tempo, estão ilustrados na **Figura 7**.

Figura 7 – Efeito de redução do edema induzido por carragenina das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata*



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo ($p < 0,05$). NC = Nanocápsulas de óleo de acuri.

O ensaio mostrou que a atividade anti-inflamatória das NC 10 mg/kg foi estatisticamente igual ao Controle Positivo (Indometacina 10 mg/kg). Isso sugere que as NC, na dose utilizada poderiam estar atuando sobre mediadores inflamatórios, provavelmente, histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandina E2 (PGE-2) e COX. No entanto, o mecanismo de ação dos produtos naturais é complexo, já que possuem substâncias ativas que agem em sinergia (VERGALLO, 2020). É provável que os ácidos graxos, em conjunto com fitoquímicos presentes no OAA, atuem na inibição da produção de mediadores inflamatórios diversos (FREITAS DE LIMA *et al.*, 2018).

Em um estudo que avaliou a atividade anti-inflamatória do óleo de coco, observou-se moderado efeito deste ativo na redução do edema de pata induzido por carragenina (INTAHPHUAK; KHONSUNG; PANTHONG, 2010). No entanto, na literatura há poucas evidências dos efeitos anti-inflamatórios do óleo de coco, e não há um sólido apoio científico da sua atividade (DA SILVA LIMA; BLOCK, 2019).

Os resultados destes ensaios sugerem que o óleo das frutas do acurizeiro, nanoencapsulado, tem potencial farmacológico como anti-inflamatório. Neste estudo,

se evidenciou que o processo de nanoencapsulação potencializou a atividade anti-inflamatória do óleo de acuri.

5.6 Atividade anti-inflamatória articular

A atividade anti-inflamatória articular do OAA e das NC foi testada em um modelo experimental de inflamação articular induzida por *zymosan*. Os resultados deste ensaio estão expostos na **Tabela 5**. Usaram-se como indicadores da resposta inflamatória a contagem leucocitária e a concentração do óxido nítrico no líquido na cavidade articular.

Tabela 6 – Resultados do estudo de atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação articular induzido por *zymosan*.

Grupo experimental	Número de leucócitos ($\times 10^3/\text{mL}$)	Óxido nítrico (μM)
Grupo I – Controle Normal	3,50 \pm 0,50 ^a	10,50 \pm 2,76 ^a
Grupo II – Controle Negativo	6,50 \pm 1,50 ^b	37, 50 \pm 2,25 ^b
Grupo III – Controle Positivo	3,50 \pm 0,50 ^a	13,25 \pm 3,47 ^{a, c}
Grupo IV – NC 0,1 mg/kg	5,00 \pm 0,50 ^{a, b}	26,10 \pm 3,57 ^d
Grupo V – NC 1 mg/kg	4,50 \pm 1,50 ^a	21,85 \pm 2,21 ^d
Grupo VI – NC 10 mg/kg	4,00 \pm 0,50 ^a	18, 50 \pm 3,55 ^c
Grupo VII – Óleo de acuri 10mg/kg	4,50 \pm 0,50 ^a	23,41 \pm 3,91 ^d

Controle positivo: tratado com Dexametasona, 2 mg/kg de peso. NC: Nanocápsulas poliméricas carregadas com óleo de acuri. Doses: mg de substância/kg de peso do animal. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na mesma coluna.

O *Zymosan* é uma substância formada por polissacarídeos da parede celular de leveduras que induzem uma resposta inflamatória (KEYSTONE *et al.*, 1977). O processo inflamatório induzido por *zymosan* está relacionado à infiltração leucocitária e a formação de espécies reativas de oxigênio, como óxido nítrico. Além disso, o processo é dependente da COX-2 (CALHOUN; CHANG; CARLSON, 1987; JAIN, *et al.*, 2008).

Na cavidade articular, os leucócitos se ligam a complexos imunes e os fagocitam, produzindo PGE-2, leucotrienos e liberação de óxido nítrico. O método avaliou apenas a migração leucocitária, sem diferenciação, mas é provável que a maioria das células quantificadas sejam neutrófilos, tendo em vista que são as

primeiras células a migrarem para o local da inflamação (CALHOUN; CHANG; CARLSON, 1987).

O *zymosan*, quando aplicado na articulação, estimula o processo de inflamação articular aguda. O óleo de acuri e as nanocápsulas carregadas com esse óleo, nas doses 1 mg/kg e 10 mg/kg, inibiram a migração leucocitária, um indicador de resposta inflamatória, comparável ao do controle positivo tratado com Dexametasona, assim contribuindo na redução do processo inflamatório.

Os achados neste ensaio são similares a ensaios anteriores que demonstraram que o OAA e as nanocápsulas preparadas com este óleo, na dose 10 mg/kg, possuem atividade anti-inflamatória nos modelos animais estudados, exibindo efeito antinociceptivo, antiedema e de diminuição da migração leucocitária. É importante ressaltar que, em todos os ensaios, as nanocápsulas mostraram uma atividade farmacológica mais potente do que o óleo, ainda que na mesma concentração, evidenciando que o processo de nanoencapsulação potencializou os efeitos biológicos do ativo.

Estes efeitos podem ser atribuídos ao perfil de ácidos graxos rico em ácido oleico, ácido láurico e presença de ácido linoleico, encontrado neste trabalho. Além disso, outros fitoquímicos presentes no fruto podem estar relacionados a este efeito, como carotenoides, que já foram encontrados em um estudo que investigou as propriedades do óleo dos frutos de acuri (BALDIVIA *et al.*, 2018; DE LIMA; LESCANO; DE OLIVEIRA, 2021).

5.7 Estudos de toxicidade

5.7.1 Toxicidade Oral Aguda

Os estudos de toxicidade oral aguda (TOA) de qualquer substância, necessitam ter em conta as informações da substância a ser testada. Devem ser conhecidas a identidade, a estrutura química, as propriedades físico-químicas, e os resultados de outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*. O uso pretendido da substância é uma informação importante para determinar a relevância do teste para a proteção da saúde humana e do meio ambiente (OECD, 2008a). O estudo da TOA ajuda na seleção de

uma dose inicial apropriada para outros estudos. A normativa OECD 425 permite classificar as substâncias de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado para a classificação de produtos químicos que causam toxicidade aguda (OECD, 2008a).

Durante este estudo, não houve morte. Não se observaram mudanças na respiração, na coloração das mucosas, na pele, nem no sistema motor dos animais dos três grupos experimentais. Isso sugere que nem as nanocápsulas nem o óleo causaram danos que impactaram visivelmente na anatomia, nem no comportamento dos animais. Observou-se que os animais consumiram água e ração normalmente (**Tabela 6**).

Tabela 7 – Consumo de água e alimentos

Grupo	Alimentos (g)			Água (mL)		
	Dia 0-4	Dia 5-9	Dia 10-14	Dia 0-4	Dia 5-9	Dia 10-14
Controle	19,35 ±2,23 ^a	21,45 ±3,19 ^a	19,55 ±2,12 ^a	35,14 ±3,12 ^a	37,25 ±2,88 ^a	37,10 ±4,92 ^a
Nanocápsula	21,41 ±3,49 ^a	25,50 ±3,34 ^a	27,77 ±6,18 ^a	37,41 ±4,72 ^a	41,11 ±4,55 ^a	43,08 ±4,58 ^a
Óleo	20,60 ±3,76 ^a	26,11 ±5,85 ^a	29,07 ±4,38 ^a	38,38 ±3,20 ^a	42,94 ±4,21 ^a	45,37 ±5,07 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

O consumo de água e alimentos são parâmetros avaliados no estudo da segurança terapêutica dos compostos estudados, tendo em vista sua importância para o funcionamento fisiológico do organismo. Além disso, o estado nutricional e de hidratação dos animais é essencial para a avaliação do efeito dos compostos teste (OECD, 2002a). Alterações no padrão de consumo de alimentos e/ou água sugerem algum tipo de toxicidade gerada pela substância teste (OECD, 2002a). A **Tabela 7** apresenta o peso corporal dos animais durante o estudo de toxicidade aguda oral.

Tabela 8 – Comportamento do peso corporal dos animais

Grupo	Peso dos animais (g) ao longo do tempo		
	Dia 0	Dia 7	Dia 14
Controle	182,10 ± 5,22 ^a	188,88 ± 4,88 ^a	195,26 ± 6,37 ^a
Nanocápsula	175,28 ± 6,75 ^a	182,48 ± 5,34 ^a	188,05 ± 5,49 ^a
Óleo	190,35 ± 7,36 ^a	193,25 ± 6,55 ^a	199,11 ± 7,23 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Neste experimento, o peso corporal dos animais não apresentou diferenças estatísticas significativas ao longo do tempo, e houve ganho de peso de forma normal. Resultou significativo o fato de que, o grupo tratado com OAA foi o que menos ganhou

peso corporal (8,96 g, diferença entre a média do peso do dia 01 e do dia 14), seguido do grupo tratado com nanocápsulas (12,77 g) e o grupo controle (13,16 g). Provavelmente, o fato de o grupo tratado com óleo ter ganhado menos peso, está relacionado à influência dos ácidos graxos contidos no metabolismo energético dos animais, assim como investigado por Baldivia e seus colaboradores (2018).

Fígado, rins, coração e pulmões são órgãos vitais, onde as substâncias químicas são metabolizadas e/ou excretadas do organismo humano, por isso, são vulneráveis a substâncias metabolicamente tóxicas (BARRETO; LARSON; KOUBEK, 2021). O processo de metabolização e excreção das substâncias pode afetar a morfofisiologia e a função bioquímica dos órgãos alvos. Esse conhecimento é clinicamente relevante para o estabelecimento da dosagem, e para a avaliação de eficácia e da toxicidade das substâncias (BARRETO; LARSON; KOUBEK, 2021). Após 14 dias de observação, os animais dos três grupos experimentais foram submetidos a eutanásia e o peso relativo dos rins, coração, pulmões e fígado foi calculado. A **Tabela 8** apresenta o comportamento do peso relativo dos órgãos dos animais no ensaio de TOA.

Tabela 9 – Peso relativo dos órgãos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral

Órgão	Controle	Nanocápsula	Óleo puro
Rins	0,69 ±0,06 ^a	0,62 ±0,11 ^a	0,63 ±0,05 ^a
Coração	0,33 ±0,02 ^a	0,35 ±0,05 ^a	0,40 ±0,02 ^a
Pulmões	0,60 ±0,02 ^a	0,60 ±0,06 ^a	0,56 ±0,04 ^a
Fígado	4,29 ±0,21 ^a	4,49 ±0,38 ^a	4,26 ±0,23 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Não foi observada diferença estatística significativa do peso relativo dos órgãos entre os três grupos experimentais. Na análise macroscópica desses órgãos, observou-se que todos tinham aspecto e tamanho normal, sem sinais de lesões nas membranas, nem mudanças da cor, nem do aspecto anatômico. Esses resultados sugerem que nem as nanocápsulas carregadas com o óleo, nem o próprio óleo induziram danos sistêmicos que pudessem afetar a morfologia externa desses órgãos.

A **Tabela 9** apresenta os parâmetros bioquímicos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral. Variações importantes em parâmetros bioquímicos sugerem alterações na atividade da medula óssea e estado geral dos outros órgãos envolvidos com a produção de células sanguíneas e sua regulação. As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) fornecem informações

sobre a função hepática, já Creatinina e Ureia estão relacionadas à função renal. Aumento nos Triglicerídeos e Colesterol sugerem doenças metabólicas como diabetes mellitus, além de colestase e lesões no néfron (OECD, 2002a).

Tabela 10 – Parâmetros bioquímicos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral

Parâmetros bioquímicos em soro	Controle	Nanocápsula	Óleo
ALT (U/L)	34,22 ±0,95 ^a	33,24 ±1,92 ^a	35,59 ±1,61 ^a
AST (U/L)	21,34 ±1,11 ^a	22,4 ±1,03 ^{a, b}	24,75 ±1,55 ^b
Proteínas totais (mg/100mL)	7,01 ±0,21 ^a	6,67 ±0,24 ^a	7,22 ±0,23 ^a
Creatinina (mg/100mL)	5,65 ±0,39 ^a	6,39 ±0,32 ^b	6,08 ±0,15 ^{a, b}
Ureia (mg/100mL)	24,97 ±0,15 ^a	24,2 ±0,86 ^a	22,44 ±0,77 ^b
Triglicerídeos (mg/100mL)	45,32 ±0,87 ^a	34,76 ±1,21 ^b	38,03 ±2,6 ^b
Colesterol total (mg/100mL)	103,39 ±1,83 ^a	92,38 ±1,92 ^b	96,04 ±3,09 ^b

ALT = Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

As análises bioquímicas mostraram que, os níveis de ALT, AST e proteínas totais do grupo tratado com as NC não foram diferentes estatisticamente do grupo controle, assim como os níveis de ureia. O nível de creatinina do grupo tratado com nanocápsulas foi estatisticamente diferente e maior em 0,73 mg do que o grupo controle. O teor de creatinina no sangue é um indicador da função renal, assim como a ureia. Uma função renal alterada poderia causar incremento da creatinina no sangue. No entanto, a quantidade de creatinina e ureia no sangue pode ser afetada pela qualidade e a quantidade de alimento ingerida (o grupo tratado com nanocápsulas e o grupo tratado com o óleo consumiram mais alimento nos últimos 4 dias), a idade dos animais, além de outros fatores (CASTRO *et al.*, 2014). Assim sendo, precisa-se do estudo da toxicidade em doses repetidas para verificar com maior precisão este achado.

Os níveis de triglicerídeos e colesterol total dos grupos tratados com as nanocápsulas e com o OAA foram menores e diferentes estatisticamente do grupo controle. Isso sugere que, tanto as nanocápsulas carregadas com o óleo, como o OAA, poderiam ter utilidade na hiperlipidemia. Outros óleos de palmeiras ricos em ácido láurico, linoleico e oleico, como o óleo de coco (DAYRIT, 2015) e o azeite de oliva (GAGOUR *et al.*, 2022), tem mostrado essa funcionalidade.

A **Tabela 10** apresenta os resultados das análises hematológicas realizadas no sangue dos animais no ensaio de TOA. Houve diferenças estatísticas entre o grupo tratado com OAA e o grupo controle nos parâmetros Hemoglobina e Hemácias, e entre

o grupo tratado com NC e o grupo controle, no parâmetro Leucócitos. Apesar das diferenças observadas entre os grupos, os parâmetros encontram-se dentro dos valores normalmente registrados na literatura para ratos *Wistar* nas condições analisadas (KUMARI *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2012)

Tabela 11 – Parâmetros hematológicos dos animais no ensaio de toxicidade aguda oral.

Parâmetros Hematológicos	Controle	Nanocápsula	Óleo
Hemoglobina (g/dl)	12,85 ±0,31 ^a	13,46 ±0,35 ^{a, b}	13,66 ±0,42 ^b
Hematócrito (%)	37,92 ±0,59 ^a	38,11 ±0,95 ^a	38,27 ±0,72 ^a
Hemácias (10 ⁶ /μL)	7,09 ±0,17 ^a	7,62 ±0,37 ^a	8,06 ±0,16 ^b
Leucócitos (10 ³ /μL)	5,66 ±0,52 ^a	4,82 ±0,27 ^b	5,35 ±0,35 ^{a, b}
Plaquetas (10 ³ /μL)	806,17 ±18,62 ^a	798,92 ±11,43 ^a	806,35 ±20,87 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05)

As hemácias, ou eritrócitos, são células anucleadas, em formato bicôncavo, que contém grande quantidade de hemoglobina, uma proteína transportadora de O₂ e CO₂ (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010). São células sanguíneas produzidas na medula óssea e que tem a função de transportar de oxigênio dos pulmões aos tecidos, mantendo a perfusão tissular adequada, e transportar CO₂ dos tecidos aos pulmões para sua excreção (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010). Uma das principais causas de aumento da contagem de hemácias e, conseqüente, aumento da hemoglobina é a privação de oxigênio, como por altitudes elevadas, tabagismo ou intoxicações (ABBAS; FAUSTO; KUMAR, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011).

As substâncias que produzem toxicidade aguda, diminuem o número de eritrócitos e hemoglobina, sendo esses sinais de toxicidade na medula óssea. No nosso experimento, houve um discreto aumento destes valores, mas com valores normais de hematócrito, que é a percentagem de volume ocupada pelas hemácias no volume total de sangue (AVILEZ *et al.*, 2008). O hematócrito normal, neste caso, sugere que o aumento observado de hemácias e valor de hemoglobina não causou danos no estado metabólico geral do animal, assim, não representa um sinal de toxicidade aguda do OAA.

Os leucócitos são células que tem origem na medula óssea e, a partir deste local, são transportados por meio dos vasos sanguíneos para todo o corpo. Sua função primordial é a defesa do organismo, atuando na identificação, combate e eliminação de agentes externos, como micro-organismos e substâncias químicas, por exemplo (CHABOT-RICHARDS; GEORGE, 2014).

Uma diminuição acentuada na contagem leucocitária pode estar relacionada a danos na medula óssea, com graves consequências, como aumento da susceptibilidade a infecções, etc. (OECD, 2002b). No Grupo NC houve uma diminuição discreta no número de leucócitos, de 0,84 ($\times 10^3/\mu\text{L}$). Alterações de contagens de células do sangue podem ser causadas por efeitos da substância teste no organismo do animal, porém, pequenas variações como as encontradas neste estudo, devem ser vistas com cautela, já que podem ser momentâneas e voltar à normalidade espontaneamente (OECD, 2002b; STOCKHAM; SCOTT, 2011). A diferença entre os grupos na contagem de leucócitos, neste caso, pode ser considerada fisiológica, já que não afetou outros parâmetros, nem mesmo a contagem de hemácias – outro grupo de células produzidas pela medula óssea – que não diferiu do grupo controle (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Além disso, o valor encontra-se dentro da faixa normalmente encontrada para ratos *Wistar* nas condições analisadas (KUMARI *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2012)

Os resultados sugerem que nem o óleo de acuri, nem as nanocápsulas carregadas com o óleo, na dose 2000 mg/kg, administrada em dose única pela via oral, induzem efeitos tóxicos sistêmicos nos ratos Wistar. Esse resultado indica que ambas as substâncias (óleo de acuri e nanocápsulas carregadas com esse óleo) podem ser classificadas como não tóxicas, segundo a OECD (2002b).

No ensaio de Toxicidade Subcrônica, ou toxicidade em doses repetidas, os animais foram tratados por 28 dias com a dose diária de 1000 mg/kg de óleo de acuri e a mesma dose de nanocápsulas poliméricas carregadas com o óleo. Ao longo do tratamento, não houve morte de animais. Não se observaram sinais de toxicidade, como alterações no comportamento respiratório, na coloração das mucosas, na pele e pelos, nem no sistema motor dos animais dos três grupos experimentais. Indicando que nem as nanocápsulas nem o óleo causaram danos que impactaram visivelmente na anatomia e o comportamento dos animais. Observou-se que os animais consumiram água e ração normalmente nos grupos controle ou tratados. A **Tabela 11** apresenta o consumo de água e alimentos durante o tratamento.

Tabela 12 – Consumo de alimentos e água, ao longo do tempo, dos animais no ensaio de toxicidade subcrônica (28 dias)

Grupo	Alimento (g)			
	0-7	7-14	14-21	21-28

Controle	17,10 ± 3,37 ^a	19,58 ± 3,52 ^a	18,35 ± 3,55 ^a	20,41 ± 4,41 ^a
Nanocápsula	19,45 ± 2,15 ^a	20,25 ± 4,79 ^a	25,42 ± 4,65 ^a	26,74 ± 5,33 ^a
Óleo	20,23 ± 4,12 ^a	22,19 ± 3,25 ^a	26,85 ± 5,65 ^a	27,41 ± 6,52 ^a
Água (mL)				
Controle	34,29 ± 5,42 ^a	35,14 ± 3,12 ^a	33,88 ± 5,25 ^a	31,74 ± 5,22 ^a
Nanocápsula	33,52 ± 4,29 ^a	37,41 ± 4,72 ^a	40,27 ± 5,00 ^a	40,25 ± 6,23 ^a
Óleo	35,83 ± 5,44 ^a	38,38 ± 3,20 ^a	43,21 ± 5,48 ^a	42,49 ± 6,25 ^a

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na mesma coluna.

A diminuição do consumo de água e alimentos é um sinal característico de efeitos tóxicos induzidos por substâncias químicas (OECD, 2008b). Isso tem uma influência importante em aspectos da resposta dos animais a intoxicação, incluindo alterações metabólicas, hormonais e mecanismos homeostáticos (OECD, 2008b). Outros fatores que podem ser compreendidos a partir do consumo de água e alimentos é a interferência do composto teste no paladar do animal, deixando a ração fornecida mais ou menos palatável; além de um possível efeito estimulante ou depressor do apetite. Os mesmos efeitos podem estar relacionados à ingestão hídrica (OECD, 2002a).

Nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 de tratamento, o peso corporal dos animais foi registrado (**Tabela 12**). Não houve diferença no peso dos animais entre os grupos e, tanto o grupo controle, quanto os grupos testes tiveram aumento de peso ao longo do tempo. Este resultado indica que o consumo do óleo e das nanocápsulas não afetou o apetite nem o acesso dos animais a alimento e água.

Tabela 13 – Peso dos animais ao longo de 28 dias de tratamento

Peso dos animais (g) ao longo do tempo					
Grupo	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
Controle	175,55 ± 7,25 ^a	182,25 ± 5,25 ^a	190,39 ± 7,10 ^a	195,26 ± 5,19 ^a	203,25 ± 7,28 ^a
Nanocápsula	172,85 ± 7,33 ^a	180,43 ± 6,17 ^a	188,22 ± 7,58 ^a	193,25 ± 6,24 ^a	202,10 ± 8,28 ^a
Óleo	178,41 ± 6,18 ^a	185,92 ± 6,28 ^a	194,50 ± 7,11 ^a	201,85 ± 7,45 ^a	207,78 ± 7,46 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Após a eutanásia dos animais, os órgãos rins, coração, pulmões e fígado foram pesados e seu peso relativo foi calculado (**Tabela 13**). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas no peso relativo dos órgãos dos animais nos três grupos experimentais. Durante a necropsia grosseira, não foram observadas alterações macroscópicas nas membranas nem na anatomia externa dos órgãos que indicarem efeito tóxico.

Tabela 14 – Peso relativo dos órgãos dos animais tratados por 28 dias com uma dose de 1000 mg/kg das nanocápsulas carregadas com óleo de acuri.

Órgão	Controle	Nanocápsula	Óleo puro
Rins	0,65 ±0,10 ^a	0,63 ±0,09 ^a	0,65 ±0,07 ^a
Coração	0,41 ±0,08 ^a	0,38 ±0,11 ^a	0,42 ±0,09 ^a
Pulmões	0,64 ±0,07 ^a	0,61 ±0,18 ^a	0,51 ±0,08 ^a
Fígado	4,52 ±0,35 ^a	4,85 ±0,41 ^a	4,56 ±0,10 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Foram avaliados os parâmetros hematológicos (**Tabela 14**) e bioquímicos (**Tabela 15**) dos animais dos grupos controle, Nanocápsula e óleo. Os parâmetros hematológicos encontram-se dentro dos parâmetros normais para ratos *Wistar* nas condições do teste (KUMARI *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2012), além de não terem diferido entre os grupos analisados.

Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos dos animais tratados por 28 dias com uma dose de 1000 mg/kg das Nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata*

Parâmetros bioquímicos (dia 28)	Controle	Nanocápsula	Óleo
ALT (U/L)	31,45 ±3,25 ^a	31,52 ±2,96 ^a	35,42 ±3,25 ^a
AST (U/L)	26,42 ±2,07 ^a	25,49 ±1,96 ^a	26,44 ±2,85 ^a
Proteínas totais (mg/100mL)	7,05 ±1,05 ^a	7,25 ±0,85 ^a	7,26 ±1,05 ^a
Creatinina (mg/100mL)	6,05 ±0,88 ^a	6,10 ±0,9 ^a	6,21 ±0,85 ^a
Ureia (mg/100mL)	25,99 ±0,57 ^a	24,85 ±1,85 ^a	24,41 ±2,0 ^a
Triglicerídeos (mg/100mL)	44,47 ±3,09 ^a	32,52 ±3,55 ^b	39,44 ±3,85 ^{a, b}
Colesterol total (mg/100mL)	95,23 ±2,25 ^a	88,35 ±2,15 ^b	92,63 ±2,26 ^{a, b}

ALT = Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase. Letras diferentes na mesma linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela 16 – Parâmetros hematológicos dos animais tratados por 28 dias com uma dose de 1000 mg/kg das nanocápsulas carregadas com óleo de amêndoas de *Attalea phalerata*

Parâmetros Hematológicos	Controle	Nanocápsulas	Óleo
Hemoglobina (g/100 mL)	13,55 ±1,25 ^a	13,00 ±0,85 ^a	13,05 ±1,25 ^a
Hematócrito (%)	34,51 ±3,25 ^a	34,52 ±3,07 ^a	35,85 ±3,05 ^a
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	6,25 ±1,05 ^a	6,15 ±1,05 ^a	7,00 ±0,85 ^a
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,05 ±0,86 ^a	5,65 ±0,95 ^a	6,05 ±0,85 ^a
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	815,47 ±28,75 ^a	820,45 ±21,95 ^a	812,23 ±29,45 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

As funções hepática e renal são fundamentais para o funcionamento do organismo, sendo a primeira relacionada ao metabolismo da substância teste e a segunda à excreção dos resíduos provenientes do seu consumo. Danos a estes órgãos causados por substâncias químicas tóxicas, podem ser avaliados a partir dos parâmetros bioquímicos (KPEMISSI *et al.*, 2020). Biomarcadores renais (creatinina e

ureia) e hepáticos (AST e ALT) mostraram que os compostos analisados não causaram sinais de toxicidade nas doses estudadas ao longo dos 28 dias.

Houve diferenças estatísticas entre os grupos teste e grupo controle para os seguintes parâmetros bioquímicos: Triglicerídeos e Colesterol total. Estes parâmetros diminuíram após o tratamento com as nanocápsulas (1000 mg/kg/dia) e com o óleo na mesma dose. Em ambos os ensaios de toxicidade foi observado que os animais tratados, tanto com o óleo, como com as NC, apresentaram diminuição do colesterol total e triglicerídeos, o que sugere uma possível aplicação das nanocápsulas para o tratamento de dislipidemias e para a manutenção do peso corporal. Este efeito, que foi mais evidente no Grupo tratado com NC no teste de toxicidade subcrônica, também foi observado em outro estudo com o óleo das amêndoas de acuri, no qual foi efetivo no tratamento de dislipidemia causada por dieta rica em frutose em um modelo animal, com efeito hipolipêmico e redução da massa gorda (BALDIVIA *et al.*, 2018).

O ensaio de toxicidade subcrônica fornece informações sobre efeitos adversos potencialmente relevantes da utilização da substância teste (JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010). Conforme os resultados apresentados a partir do modelo experimental utilizado, sugere-se que óleo do fruto *Attalea phalerata* (Martius ex. Spreng.) Burret (acuri), e as nanocápsulas carregadas com esse óleo não produzem sinais de toxicidade quando administrados durante 28 dias, via oral, na dose de 1000 mg/kg/dia, em ratos Wistar.

6 CONCLUSÕES

1. O óleo das amêndoas de acuri contem 20,35% de ácidos graxos insaturados, e 79,65% de ácidos graxos saturados. O ácido láurico é o majoritário entre os ácidos saturados (43,33%) e o ácido oleico majoritário entre insaturados com 18,01%
2. Foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas carregadas com óleo das amêndoas de acuri, com um tamanho de partícula de 368,97nm, potencial zeta -69,20 mV, e um índice de polidispersão 0,298. O processo de encapsulação teve uma eficiência de encapsulação de 88,77%.

3. As nanocápsulas apresentaram uma forte e seletiva atividade antiproliferativa de células tumorais prostáticas PC-03 (GI₅₀ 2,09 µg/mL; com um índice de seletividade de 119,61), células de adenocarcinoma renal humano 786-0 (GI₅₀ 3,03 µg/mL; índice de seletividade 82,45. Apresentou atividade moderada frente a células de carcinoma hepático HepG2 (GI₅₀ 98,33, índice de seletividade 2,54).
4. As nanocápsulas mostraram atividade antinociceptiva, antiedematosa e anti-inflamatória articular, na concentração 10 mg/kg, que foi superior ao óleo *in natura*, demonstrando a potenciação dos efeitos devido ao processo de nanoencapsulação.
5. As nanocápsulas poliméricas contendo óleo da amêndoa de acuri, assim como o óleo puro, não apresentaram toxicidade aguda (à dose de 2000 mg/kg) nem toxicidade subcrônica em 28 dias (à dose de 1000 mg/kg).
6. O óleo das amêndoas de acuri, parece exercer uma boa atividade hipolipemiante pois levou a uma diminuição dos níveis de triglicérides e colesterol total sérico nos animais, e a manutenção do peso corporal.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9º ed. [S. l.]: GEN Guanabara Koogan, 2019.

ABBAS, Vinay M.D.; FAUSTO, Abul K.; KUMAR, Nelson. **Robbins & Cotran Patologia: bases patológicas para as doenças**. 2010.

ACACIO, Bianca Rodrigues; ROBLES, Verónica Bautista; PRADA, Ariadna Lafourcade; ASSIS, Joao Marcos; DE SOUZA, Tatiane Pereira; KEITA, Hady; FLORENTINO NETO, Serafim; GAMERO, Edgar Julian Paredes; RODRÍGUEZ AMADO, Jesús Rafael; MIJANGOS, Guillermo Rojas. Kollicoat MAE® 100P as a film former polymer for nanoparticles preparation. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm**, vol. 51, nº 3, p. 1212–1228, 2022. DOI 10.15446/rcciquifa.v51n3.100424.

AMERICAN SOCIETY OF CANCER. **About Prostate Cancer. Overview.**, 2022.

ANDRADE CARVALHO, Wilson; SALES CARVALHO, Rosemary Duarte; RIOS-SANTOS, Fabrício. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol. 54, nº 3, p. 448–464, 2004. DOI 10.1590/S0034-70942004000300017.

ANTON, Nicolas; BENOIT, Jean Pierre; SAULNIER, Patrick. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, vol. 128, nº 3, p. 185–199, 24 jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2008.02.007>.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Cc 7-25. **AOCS Press**, Champaign, 1990a.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Cc 10a-25. **AOCS Press**, Champaign, 1990b.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Cd 1 – 25. **AOCS Press**, Champaign, , p. 1–97, 1995.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Cd 3-25 Saponification value of fats and oils. **AOCS Press**, Champaign, 1993.

AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Cd 3d-63 Acid value of fats and oils. **AOCS Press**, Champaign, 2017.

ARRAIS, Paulo Sérgio Dourado; FERNANDES, Maria Eneida Porto; PIZZOL, Tatiane da Silva Dal; RAMOS, Luiz Roberto; MENGUE, Sotero Serrate; LUIZA, Vera Lucia; TAVARES, Noemia Urruth Leão; FARIAS, Mareni Rocha; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora; BERTOLDI, Andréa Dâmaso. Prevalência da automedicação no Brasil e fatores associados. **Revista de Saúde Pública**, vol. 50, 12 dez. 2016. DOI 10.1590/S1518-8787.2016050006117.

ARRUZAZABALA, María de Lourdes; MOLINA, Vivian; MÁZ, Rosa; CARBAJAL, Daisy; MARRERO, David; GONZÁLEZ, Víctor; RODRÍGUEZ, Eduardo. Effects of coconut oil on testosterone-induced prostatic hyperplasia in Sprague-Dawley rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 59, nº 7, p. 995–999, 18 fev. 2010. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.7.0012>.

ASGHAR, Waheed; JAMALI, Fakhreddin. The effect of COX-2-selective meloxicam on the myocardial, vascular and renal risks: a systematic review. **Inflammopharmacology**, vol. 23, nº 1, p. 1–16, fev. 2015. DOI 10.1007/S10787-014-0225-9.

AVILEZ, Ive Marchioni; HORI, Tiago Silvestre Fernandes; DE ALMEIDA, Luciana Cristina; HACKBARTH, Araceli; NETO, Jayme da Cunha Bastos; BASTOS, Vera Lucia Freire da Cunha; MORAES, Gilberto. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, vol. 148, nº 2, p. 136–142, 1 ago. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2008.04.008>.

AWOUAFACK, Maurice D.; MCGAW, Lyndy J.; GOTTFRIED, Sebastian; MBOUANGOUERE, Roukayatou; TANE, Pierre; SPITELLER, Michael; ELOFF, Jacobus N. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol. 13, 29 out. 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-289>.

AZAB, Abdullatif; NASSAR, Ahmad; AZAB, Abed N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 21, nº 10, 1 out. 2016. DOI 10.3390/MOLECULES21101321.

BALDIVIA, D.da S.; SANJINEZ-ARGANDONÁ, E. J. ANTUNES, K. Á.; MORAES, I. C. F.; DOS SANTOS, E. L.; SOUZA, K. de P. The chemical composition and metabolic effects of attalea phalerata nut oil in hyperlipidemic rats induced by a high-fructose diet. **Molecules**, vol. 23, nº 4, p. 960, 2018. DOI 10.3390/molecules23040960.

BALSLEV, Henrik; MORAES, Monica. Sinopsis de las palmeras de Bolivia. **AAU Reports**, vol. 20, p. 1–107, 1989. . Acessado em: 13 set. 2022.

BARLINA, Rindengan; DEWANDARI, Kun Tanti; MULYAWANTI, Ira; HERAWAN, Tjahjono. Multiple Biological Activities of Unconventional Seed Oils. **Multiple Biological Activities of Unconventional Seed Oils**.: Academic Press, 2022. p. 383–395. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824135-6.00025-8>.

BARRETO, Andreza Cruz; NUNOMURA, Sergio Massayoshi. Potencialidade do óleo de amêndoas de uricuri (*Attalea phalerata* Mart. Ex Spreng) na produção de biodiesel. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia - SP, vol. 31, 2008.

BARRETO, Erin F.; LARSON, Thomas R.; KOUBEK, Emily J. Drug Excretion. **Reference Module in Biomedical Sciences**. Elsevier, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.99999-7>.

BASF. **Technical information. Methacrylic acids/ethyl acrylates copolymer for enteric coating. Kollicoat Mae 100P. Pharma Ingredients and service. BASF SE, Limburgerhof: The chemical company, 2019.**

BATLOUNI, Michel. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, vol. 94, nº 4, p. 556–563, abr. 2010. DOI 10.1590/S0066-782X2010000400019.

BAYDA, Samer; ADEEL, Muhammad; TUCCINARDI, Tiziano; CORDANI, Marco; RIZZOLIO, Flavio. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, vol. 25, nº 1, p. 112, 27 dez. 2020. DOI 10.3390/MOLECULES25010112.

BEZERRA, Mariana Alonso Monteiro; HELLWIG, Natália; PINHEIRO, Geraldo Da Rocha Castelar; LOPES, Claudia Souza. Prevalence of chronic musculoskeletal conditions and associated factors in Brazilian adults - National Health Survey. **BMC Public Health**, vol. 18, p. 1–10, 27 fev. 2018. DOI 10.1186/S12889-018-5192-4/TABLES/3.

BIJLA, L; AISSA, R; AIT, B.HSakar,; IBOURKI, M.; LAKNIFLI, A.; GHARBY, S. Spent Coffee Ground Oil as a Potential Alternative for Vegetable Oil Production: Evidence from Oil Content, Lipid Profiling, and Physicochemical Characterization. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, vol. 12, nº 5, p. 6308–6320, 18 nov. 2021. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.63086320>.

BINDU, Samik; MAZUMDER, Somnath; BANDYOPADHYAY, Uday. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, vol. 180, p. 114147, 1 out. 2020. DOI 10.1016/J.BCP.2020.114147.

BRASIL. **Acompanhamento Mensal do Benefício Auxílio por Incapacidade Temporária Previdenciário Concedido Segundo os Códigos da CID-10 - Janeiro a Dezembro de 2021**. Brasília: 8 jul. 2022.

BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 87, DE 15 DE MARÇO DE 2021**. Brasília: [s. n.], 15 mar. 2021.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília: [s. n.], 2015.

BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: [s. n.], 2012.

BRASIL. **RDC Nº 48. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. [S. l.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 16 mar. 2004.

BRASIL. **Resolução RDC nº 482. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais**. Brasília, Brasil: ANVISA. Ministério da Saúde. 23 set. 1999.

BURIAN, Maria; TEGEDER, Irmgard; SEEGEL, Maic; GEISLINGER, Gerd. Peripheral and central antihyperalgesic effects of diclofenac in a model of human inflammatory pain. **Clinical pharmacology and therapeutics**, vol. 74, nº 2, p. 113–120, 1 ago. 2003. DOI 10.1016/S0009-9236(03)00165-6.

CALHOUN, W.; CHANG, J.; CARLSON, R. P. Effect of selected antiinflammatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF and carrageenan induced paw edema in the mouse. **Agents and Actions**, vol. 21, nº 3–4, p. 306–309, ago. 1987. <https://doi.org/10.1007/BF01966499>. Acessado em: 4 out. 2022.

CANSIZ, Derya; ÜNAL, İsmail; ÜSTÜNDAĞ, Ünsal Veli; ALTURFAN, Ahmet Ata; ALTINOZ, Meriç A.; ELMACI, İlhan; EMEKLI-ALTURFAN, Ebru. Caprylic acid ameliorates rotenone induced inflammation and oxidative stress in the gut-brain axis in Zebrafish. **Molecular biology reports**, vol. 48, nº 6, p. 5259–5273, 1 jun. 2021. DOI 10.1007/S11033-021-06532-5.

CARRILLO, C; CAVIA, Del M; ALONSO-TORRE, S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. **Nutr Hosp**, vol. 27, nº 4, p. 978–990, 2012a. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5783>.

CARRILLO, C.; CAVIA, Ma del M.; ALONSO-TORRE, Sara R. Efecto antitumoral del ácido oleico; mecanismos de acción: revisión científica. **Nutrición Hospitalaria**, vol. 27, nº 6, p. 1860–1865, 2012b. DOI 10.3305/NH.2012.27.6.6010.

CASTRO, Bárbara Bruna Abreu de; COLUGNATI, Fernando Antonio Basile; CENEDEZE, Marcos Antonio; SUASSUNA, Paulo Giovanni de A.; PINHEIRO, Hélydy Sanders. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, vol. 36, nº 4, 2014. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20140079>.

CHABOT-RICHARDS, D. S.; GEORGE, T. I. Leukocytosis. **International journal of laboratory hematology**, vol. 36, nº 3, p. 279–288, 2014. DOI 10.1111/IJLH.12212. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24750674/>.

CHEN, Bingcan; MCCLEMENTS, David Julian; DECKER, Eric Andrew. Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.606379>, vol. 51, nº 10, p. 901–916, dez. 2011. DOI 10.1080/10408398.2011.606379.

CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K. Zeta potential measurement. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 697, p. 63–70, 2011. DOI 10.1007/978-1-60327-198-1_6/COVER.

CLOSE, B.; CROFT, B.; LANE, B.; KNOLL, B. Recommendations for Euthanasia of Experimental Animals: Part I. **Laboratory animals**, vol. 30, nº 4, p. 293–316, 1996. CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 102, nº 5, p. 1755, 2 fev. 2005. DOI 10.1073/PNAS.0409225102.

DA SILVA BALDIVIA, Débora; SANJINEZ-ARGANDONÃ, Eliana Janet; ANTUNES, Kátia Ávila; MORAES, Izabel Cristina Freitas; DOS SANTOS, Edson Lucas; DE PICOLI SOUZA, Kely. The Chemical Composition and Metabolic Effects of *Attalea phalerata* Nut Oil in Hyperlipidemic Rats Induced by a High-Fructose Diet. **Molecules** **2018**, Vol. **23**, Page **960**, vol. 23, nº 4, p. 960, 20 abr. 2018. DOI 10.3390/MOLECULES23040960.

DA SILVA LIMA, Renan; BLOCK, Jane Mara. Coconut oil: what do we really know about it so far? **Food Quality and Safety**, vol. 3, nº 2, p. 61–72, 10 jun. 2019. DOI 10.1093/FQSAFE/FYZ004.

DAYRIT, Fabian M. The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 92, nº 1, p. 1–15, 15 jan. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7>.

DE LIMA, Fernando Freitas; LESCANO, Caroline Honaiser; DE OLIVEIRA, Ivan Pires. Fruits of the Brazilian Cerrado. **Fruits of the Brazilian Cerrado**. [S. l.]: Springer International Publishing, 2021. vol. 1, p. 22–34. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-62949-6>.

DE SOUZA, Florisvaldo Gama; DE ARAÚJO, Fábio Fernandes; DE PAULO FARIAS, David; ZANOTTO, Aline Wasem; NERI-NUMA, Iramaia Angélica; PASTORE, Gláucia Maria. Brazilian fruits of *Arecaceae* family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food Research International**, vol. 138, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109690>.

DIEGELMANN, Robert F; EVANS, Melissa C. Wound Healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, vol. 9, p. 283–289, 1 jan. 2004..

EKIERT, Halina Maria; SZOPA, Agnieszka. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, vol. 25, nº 23, 1 dez. 2020. DOI 10.3390/MOLECULES25235769. Disponível em: /pmc/articles/PMC7730830/.

FEREIDOON, Shahidi; YING, Zhong. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, vol. 39, nº 11, p. 4067–4079, 19 out. 2010. DOI 10.1039/B922183M.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; BRISTOW, A. F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, vol. 334, nº 6184, p. 698–700, 1988. DOI 10.1038/334698A0.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S. Bradykinin release of TNF- α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents and Actions**, vol. 38, nº 2, p. C7–C9, jun. 1993. DOI 10.1007/BF01991120.

FERREIRA, Sérgio Henrique; FERRARI, Luiz Fernando; CUNHA, Thiago Mattar; NASCIMENTO, Paulo Gustavo Barboni Dantas; VERRI JUNIOR, Waldiceu Aparecido; CUNHA, Fernando de Queiróz. Dor Inflamatória. **Dor: Princípios e Prática**. [S. l.]: ArtMed, 2009. p. 1–29.

FLECKNELL, Paul. **Laboratory animal anaesthesia**. 4^o ed. Oxford: Academic press, 2016.

FRANCISCHETTI, Ieda; MORENO, José Bitu; SCHOLZ, Martin; YOSHIDA, Winston Bonetti. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, vol. 25, n^o 4, p. 575–584, out. 2010. DOI 10.1590/S0102-76382010000400023.

FREITAS DE LIMA, Fernando; JÚNIOR, Paulo Sérgio Vieira Souza; TRAESEL, Giseli Karenina; MENEGATI, Sara Emilia Lima Tolouei; OESTERREICH, Silvia Aparecida; VIEIRA, Maria Carmo. Estudo do efeito central do óleo da polpa de *Attalea phalerata* MART. EX SPRENG. em modelos animais de ansiedade e depressão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 16, 28 mar. 2019. DOI 10.5216/REF.V16.49497.

FREITAS DE LIMA, Fernando; LESCANO, Caroline Honaiser; DA SILVA ARRIGO, Jucicléia; CARDOSO, Cláudia Andrea Lima; COUTINHO, Janclei Pereira; BONFÁ MOSLAVES, Iluska Senna; DO NASCIMENTO XIMENES, Thalita Vieira; TOFFOLI KADRI, Monica Cristina; WEBER, Simone Schneider; PERDOMO, Renata Trentin; LEITE KASSUYA, Cândida Aparecida; DO CARMO VIEIRA, Maria; SANJINEZ-ARGANDOÑA, Eliana Janet. Anti-inflammatory, antiproliferative and cytoprotective potential of the *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. pulp oil. **PLOS ONE**, vol. 13, n^o 4, p. e0195678, 1 abr. 2018. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0195678. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0195678>.

FURMAN, David; CAMPISI, Judith; VERDIN, Eric; CARRERA-BASTOS, Pedro; TARG, Sasha; FRANCESCHI, Claudio; FERRUCCI, Luigi; GILROY, Derek W.; FASANO, Alessio; MILLER, Gary W.; MILLER, Andrew H.; MANTOVANI, Alberto; WEYAND, Cornelia M.; BARZILAI, Nir; GORONZY, Jorg J.; RANDO, Thomas A.; EFFROS, Rita B.; LUCIA, Alejandro; KLEINSTREUER, Nicole; SLAVICH, George M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, vol. 25, n^o 12, p. 1822–1832, 5 dez. 2019. DOI 10.1038/s41591-019-0675-0.

GAGOUR, Jamila; OUBANNIN, Samira; AIT BOUZID, Hasna; BIJLA, Laila; EL MOUDDEN, Hamza; SAKAR, El Hassan; KOUBACHI, Jamal; LAKNIFLI, Abdellatif; GHARBY, Said. Physicochemical characterization, kinetic parameters, shelf life and its prediction models of virgin olive oil from two cultivars (“Arbequina” and “Moroccan Picholine”) grown in Morocco. **OCL**, vol. 29, p. 39, 23 dez. 2022. <https://doi.org/10.1051/ocl/2022033>.

GAN, Tong J. Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile. **Current Medical Research and Opinion**, vol. 26, n^o 7, p. 1715–1731, 2010. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>

GARCÍA-RAYADO, Guillermo; NAVARRO, Mercedes; LANAS, Angel. NSAID induced gastrointestinal damage and designing GI-sparing NSAIDs. **Expert review of clinical pharmacology**, vol. 11, n^o 10, p. 1031–1043, 3 out. 2018. DOI 10.1080/17512433.2018.1516143.

GUTERRES, Sílvia S.; ALVES, Marta P.; POHLMANN, Adriana R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, vol. 2, p. 157, 11 jul. 2007. DOI 10.1177/117739280700200002.

HAEFFNER, Rafael; KALINKE, Luciana Puchalski; FELLI, Vanda Elisa Andres; MANTOVANI, Maria de Fátima; CONSONNI, Dario; SARQUIS, Leila Maria Mansano. Absenteeism due to musculoskeletal disorders in Brazilian workers: thousands days missed at work. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 21, p. e180003, 2 ago. 2018. DOI 10.1590/1980-549720180003.

HENDERSON, Andrew; GALEANO-GARCES, Gloria; BERNAL, Rodrigo. **Field Guide to the Palms of the Americas**. Princeton: Princeton University Press, 1995

HIANE, Priscila Aiko; BOGO, Danielle; RAMOS, Maria Isabel Lima; RAMOS FILHO, Manoel Mendes. Carotenóides pró-vitamínicos A e composição em ácidos graxos do fruto e da farinha do bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 23, nº 2, p. 206–209, ago. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200018>.

HODZIC, Enisa. Potential Anti-Inflammatory Treatment of Ischemic Heart Disease. **Medical Archives**, vol. 72, nº 2, p. 98, 1 abr. 2018. DOI 10.5455/MEDARH.2018.72.94-98.

HUANG, Lili; GAO, Lin; CHEN, Chen. Role of Medium-Chain Fatty Acids in Healthy Metabolism: A Clinical Perspective. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, vol. 32, nº 6, p. 351–366, 1 jun. 2021. DOI 10.1016/J.TEM.2021.03.002.

ILLAM, Soorya Parathodi; NARAYANANKUTTY, Arunaksharan; RAGHAVAMENON, Achuthan C. Polyphenols of virgin coconut oil prevent pro-oxidant mediated cell death. **Toxicology mechanisms and methods**, vol. 27, nº 6, p. 442–450, 24 jul. 2017. DOI 10.1080/15376516.2017.1320458.

INCA. **Coordenação de Prevenção e Vigilância. Atlas de Mortalidade por Câncer**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2022.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Óleos e Gorduras. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 589–625.

INTAHPHUAK, S.; KHONSUNG, P.; PANTHONG, A. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. **Pharmaceutical Biology**, vol. 48, nº 2, p. 151–157, 2010. DOI 10.3109/13880200903062614.

ISO 22412. **International Standard. Particle Size Analysis: Dynamic Light Scattering (DLS)**. [S. l.: s. n.], 2008.

JAIN, A K; THAREJA, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, vol. 47, nº 1, p. 524–539, 4 dez. 2019. DOI 10.1080/21691401.2018.1561457.

JAIN, Naveen K.; ISHIKAWA, Tomo o.; SPIGELMAN, Igor; HERSCHMAN, Harvey R. COX-2 expression and function in the hyperalgesic response to paw inflammation in mice. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, vol. 79, nº 6, p. 183–190, 1 dez. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2008.08.001>.

JANICK, J.; PAULL. **The Encyclopedia of Fruit and Nuts - Google Livros**. [S. l.: s. n.], 2006.

JORDAN, Scott A.; CUNNINGHAM, David G.; MARLES, Robin J. Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and applied pharmacology**, vol. 243, nº 2, p. 198–216, 1 mar. 2010. DOI 10.1016/J.TAAP.2009.12.005.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis and rheumatism**, vol. 20, nº 7, p. 1396–1401, 1977. DOI 10.1002/ART.1780200714.

KINUPP, Valdely Ferreira; DE BARROS, Ingrid Bergman Inchausti. Protein and mineral contents of native species, potential vegetables, and fruits. **Food Science and Technology**, vol. 28, nº 4, p. 846–857, 2008. DOI 10.1590/S0101-20612008000400013.

KOHN, D. F.; WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; BENSON, G. J. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. San Diego, CA, USA.: Academic Press, 1997.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. **Acetic acid for analgesic screening**. [S. l.]: Federation Proceedings, 1959. vol. 18.

KPEMISSI, Maboizou; METOWOGO, Kossi; MELILA, Mamatchi; VEERAPUR, Veeresh P.; NEGRU, Mihai; TAULESCU, Marian; POTĂRNICHE, Adrian Valentin; SUHAS, Doddamavattur Shivalingaiah; PUNEETH, Tumbadi Adinarayanashetty; VIJAYAKUMAR, Sachidananda; EKLUGADEGBEKU, Kwashie; AKLIKOKOU, Kodjo. Acute and subchronic oral toxicity assessments of Combretum micranthum (Combretaceae) in Wistar rats. **Toxicology Reports**, vol. 7, p. 168, 1 jan. 2020. DOI 10.1016/J.TOXREP.2020.01.007.

KUMAR, VINAY; ABBAS, ABUL K.; FAUSTO, NELSON; ASTER, JON C. Inflamação Aguda e Crônica. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8º ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2010.

KUMARI, S. Anitha; MADHUSUDHANACHARY, P.; PATLOLLA, Anita K.; TCHOUNWOU, Paul B. Hepatotoxicity and Ultra Structural Changes in Wistar Rats treated with Al₂O₃ Nanomaterials. **Trends in cell & molecular biology**, vol. 11, p. 77, 2016. Disponível em: /pmc/articles/PMC5505674/.

LAHORE, M. F.; AGUILAR, Oscar; VENNAPUSA, Rami Reddy; MUHAMMAD, Aassim. Expanded Bed Chromatography, Surface Energetics of Biomass Deposition. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**. Liverpol, UK: Wiley, 2010. vol. 4, p. 2382.

LAMMARI, Narimane; LOUAER, Ouahida; MENIAI, Abdeslam Hassen; ELAISSARI, Abdelhamid. Encapsulation of Essential Oils via Nanoprecipitation Process: Overview, Progress, Challenges and Prospects. **Pharmaceutics**, vol. 12, n° 5, p. 431, 1 maio 2020. DOI 10.3390/PHARMACEUTICS12050431.

LEE, Roberta; BALICK, Michael J. Palms, people, and health. **Ethnomedicine**, vol. 4, n° 1, p. 59, 2008.

LEE, Sang In; KANG, Kyung Soo. Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs. **Scientific Reports**, vol. 7, n° 1, p. 1–12, 28 nov. 2017. DOI 10.1038/s41598-017-16561-5.

LESCANO, Caroline Honaiser; DE OLIVEIRA, Ivan Pires; FREITAS DE LIMA, Fernando; BALDIVIA, Débora da Silva; JUSTI, Priscilla Narciso; CARDOSO, Claudia Andrea Lima; RAPOSO JÚNIOR, Jorge Luiz; SANJINEZ-ARGANDOÑA, Eliana Janet. Nutritional and chemical characterizations of fruits obtained from *Syagrus romanzoffiana*, *Attalea dubia*, *Attalea phalerata* and *auritica flexuosa*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, vol. 12, n° 2, p. 1284–1294, 1 jun. 2018. DOI 10.1007/S11694-018-9742-3/TABLES/6.

LOPEZ-BELLIDO, Roger; GALKO, Michael J. An Improved Assay and Tools for Measuring Mechanical Nociception in *Drosophila* Larvae. **Journal of Visualized Experiments**, n° 164, 29 out. 2020. <https://doi.org/10.3791/61911>.

LORENZI, Harri; NOBLICK, Larry; KAHN, Francis; FERREIRA, Evandro José Linhares. *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. 2010.

LUCAS, G. N. C.; LEITÃO, A. C. C.; ALENCAR, R. L.; XAVIER, R. M. F.; DAHER, E. F.; SILVA JUNIOR, G. B. Aspectos fisiopatológicos da nefropatia por anti-inflamatórios não esteroidais. **Brazilian Journal of Nephrology**, vol. 41, n° 1, p. 124–130, 21 set. 2018. DOI 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0107.

MALTA, Deborah Carvalho; STOPA, Sheila Rizzato; SZWARCOWALD, Celia Landmann; GOMES, Nayara Lopes; SILVA JÚNIOR, Jarbas Barbosa; REIS, Ademar Arthur Chioro dos. A vigilância e o monitoramento das principais doenças crônicas não transmissíveis no Brasil - Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 18, n° 2, p. 03–16, 1 dez. 2015. DOI 10.1590/1980-5497201500060002.

MANJU, S.; SREENIVASAN, K. Functionalised nanoparticles for targeted drug delivery. **Biointegration of Medical Implant Materials: Science and Design**, p. 267–297, 1 jan. 2010. <https://doi.org/10.1533/9781845699802.2.267>.

MAPA. **Instrução Normativa 49/2006**. Brasil: [s. n.], 26 dez. 2006.

MARCELINO, G.; HIANE, P. A.; FREITAS, K. C.; SANTANA, L. F.; POTT, A.; DONADON, J. R.; GUIMARÃES, R. C. A. Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. **Nutrients**, vol. 11, n° 8, p. 1826, 1 ago. 2019. <https://doi.org/10.3390/NU11081826>.

MASSARO, M.; CARLUCCIO, M. A.; DE CATERINA, R. Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. **Cardiologia (Rome, Italy)**, vol. 44, nº 6, p. 507–513, 1 jun. 1999.

MATSUE, Miki; MORI, Yumiko; NAGASE, Satoshi; SUGIYAMA, Yuta; HIRANO, Rika; OGAI, Kazuhiro; OGURA, Kohei; KURIHARA, Shin; OKAMOTO, Shigefumi. Measuring the Antimicrobial Activity of Lauric Acid against Various Bacteria in Human Gut Microbiota Using a New Method. **Cell Transplantation**, vol. 28, nº 12, p. 1541, dez. 2019. DOI 10.1177/0963689719881366.

MCNEIL, S.E. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. 2^o ed. New York, NY: Springer New York, 2018(Methods in Molecular Biology). DOI 10.1007/978-1-4939-7352-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7352-1>. Acessado em: 3 out. 2022.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature** **2008** **454:7203**, vol. 454, nº 7203, p. 428–435, 1 jul. 2008. DOI 10.1038/nature07201.

MELO, M G D; DÓRIA, G A A; SERAFINI, ; M R; ARAÚJO, ; A A S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, vol. 8, p. 049903, 2012.

MITCHELL, Jane A; WARNER, Timothy D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nature Reviews Drug discovery**, vol. 5, nº 1, p. 75–86, fev. 2006. DOI 10.1038/NRD1929.

MOHANRAJ, V J; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 5, nº 1, p. 561–573, 31 jul. 2007a. DOI 10.4314/tjpr.v5i1.14634.

MOHANRAJ, V J; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 5, nº 1, p. 561–573, 31 jul. 2007b. DOI 10.4314/tjpr.v5i1.14634.

MONKS, Anne; SCUDIERO, Dominic; SKEHAN, Philip; SHOEMAKER, Robert; PAULL, Kenneth; VISTICA, David; HOSE, Curtis; LANGLEY, John; CRONISE, Paul; VAIGRO-WOLFF, Anne; GRAY-GOODRICH, Marcia; CAMPBELL, Hugh; MAYO, Joseph; BOYD, Michael. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 83, nº 11, p. 757–766, 5 jun. 1991. DOI 10.1093/JNCI/83.11.757.

MORAES, Mónica R.; BORCHSENIUS, Finn; BLICHER-MATHIESEN, Ulla. Notes on the Biology and Uses of the Motacú Palm (*Attalea phalerata*, Arecaceae) from Bolivia. **Economic Botany**, vol. 50, nº 4, p. 423–428, 1996. DOI 10.1007/BF02866525.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 385, nº 1–2, p. 113–142, 29 jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2009.10.018>.

MORRIS, Christopher J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 225, p. 115–121, 2003. DOI 10.1385/1-59259-374-7:115.

MOTA PINTO, Anabela; SANTOS ROSA, Manuel. Resposta Inflamatória. **Fisiopatologia Fundamentos e Aplicações**. 2º ed. [S. l.]: Lidel, 2013. p. 185–218. . Acessado em: 4 out. 2022.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, vol. 135, nº 2, p. 145–153, 17 mar. 1987. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(87\)90606-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90606-6).

NEGRELLE, Raquel Rejane Bonato. Attalea phalerata MART. EX SPRENG.: Aspectos Botânicos, Etnobotânicos, Ecológicos e Agronômicos. **Ciência Florestal**, vol. 25, nº 4, p. 1061–1066, 1 out. 2015. DOI 10.5902/1980509820669.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lipídios. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5º ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011. p. 343–363.

NETO, Serafim Florentino; PRADA, Ariadna Lafourcade; ACHOD, Leonardo Domingo Rosales; TORQUATO, Heron Fernandes Vieira; LIMA, Cauê Santos; PAREDES-GAMERO, Edgar Julian; SILVA DE MORAES, Maria Oneide; LIMA, Emerson Silva; SOSA, Edgar Hernandez; DE SOUZA, Tatiane Pereira; AMADO, Jesus Rafael Rodriguez. α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 139, p. 111656, jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111656>.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, vol. 70, nº 3, p. 461–477, mar. 2007. DOI 10.1021/NP068054V.

NUNES, Clara dos Reis; ARANTES, Mariana Barreto; DE FARIA PEREIRA, Silvia Menezes; DA CRUZ, Larissa Leandro; DE SOUZA PASSOS, Michel; DE MORAES, Luana Pereira; VIEIRA, Ivo José Curcino; DE OLIVEIRA, Daniela Barros. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. **Molecules**, vol. 25, nº 16, 1 ago. 2020. DOI 10.3390/MOLECULES25163726.

OECD. **Guidance notes for analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies**. Paris: [s. n.], 2002a.

OECD. **OECD 425. Guidelines for the testing of chemicals Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure**. [S. l.: s. n.], 2008a.

OECD. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. **Oecd Guideline for Testing of Chemicals**, p. 1–13, 2008b.

OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. **Oecd Guideline for Testing of Chemicals**, nº December, p. 1–14, 2002b. DOI 10.1787/9789264071001-EN.

OLIVEIRA, R.S. B.; FIGUEIREDO, I. S.T.; FREITAS, L. B.N.; PINHEIRO, R. S.P.; BRITO, G. A. C.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. v.; RALPH, M. T.; LIMA-FILHO, J. v. Inflammation induced by phytochemical proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, vol. 61, n° 7, p. 689–698, 10 jul. 2012. DOI 10.1007/s00011-012-0460-8.

ORAY, Merih; ABU SAMRA, Khawla; EBRAHIMIADIB, Nazanin; MEESE, Halea; FOSTER, C. Stephen. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert opinion on drug safety**, vol. 15, n° 4, p. 457–465, 2 abr. 2016. DOI 10.1517/14740338.2016.1140743.

PATEL, Pal; MEGHANI, Nikita; KANSARA, Krupa; KUMAR, Ashutosh. Nanotherapeutics for the Treatment of Cancer and Arthritis. **Current Drug Metabolism**, vol. 20, n° 6, p. 430–445, 27 nov. 2018. <https://doi.org/10.2174/1389200220666181127102720>

PEÑA-MORÁN, Omar; VILLARREAL, María; ÁLVAREZ-BERBER, Laura; MENESES-ACOSTA, Angélica; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Verónica. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. **Molecules**, vol. 21, n° 8, p. 1013, 4 ago. 2016. <https://doi.org/10.3390/molecules21081013>.

PERRETTI, Mauro; LEROY, Xavier; BLAND, Elliot J.; MONTERO-MELENDZ, Trinidad. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends in pharmacological sciences**, vol. 36, n° 11, p. 737–755, 1 nov. 2015. DOI 10.1016/J.TIPS.2015.07.007.

POLJŠAK, Nina; KREFT, Samo; KOČEVAR GLAVAČ, Nina. Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology. **Phytotherapy research: PTR**, vol. 34, n° 2, p. 254–269, 1 fev. 2020. DOI 10.1002/PTR.6524.

POTT, A.; POTT, V. J. Plantas do Pantanal. , p. 320, 1994. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/783791>. Acessado em: 11 set. 2022.

PRADA, Ariadna L.; BITENCOURT, Antônio P.R.; AMADO, Jesús R.R.; CRUZ, Rodrigo A.S.; CARVALHO, José C.T.; FERNANDES, Caio P. Development and Characterization of *Cassia grandis* and *Bixa orellana* Nanoformulations. **Current topics in medicinal chemistry**, vol. 16, n° 18, p. 2057–2065, 15 fev. 2016. DOI 10.2174/1568026616666160215161103.

PRADA, Ariadna Lafourcade; KEITA, Hady; DE SOUZA, Tatiane Pereira; LIMA, Emerson Silva; ACHO, Leonard Domingo Rosales; DA SILVA, Márcia de Jesus Amazonas; CARVALHO, José Carlos Tavares; AMADO, Jesus Rafael Rodriguez. *Cassia grandis* Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitor effect. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 27, n° 2, p. 191–199, 1 fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.10.003>.

QUINTANAR-GUERRERO, David; ALLÉMANN, Eric; FESSI, Hatem; DOELKER, Eric. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, vol. 24, nº 12, p. 1113–1128, 1998. DOI 10.3109/03639049809108571.

RIBEIRO, Ronaldo A.; VALE, Mariana L.; FERREIRA, Sergio H.; CUNHA, Fernando Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology**, vol. 391, nº 1–2, p. 97–103, 10 mar. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00918-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00918-8).

SALES-CAMPOS, Helioswilton; REIS DE SOUZA, Patricia; CREMA PEGHINI, Bethanea; SANTANA DA SILVA, Joao; RIBEIRO CARDOSO, Cristina. An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 13, nº 2, p. 201–210, 28 jan. 2013. <https://doi.org/10.2174/1389557511313020003>.

SALOPEK, Branko; KRASI, Dragan; FILIPOVI, Suzana. Measurement and application of zeta potencial. **Rudarsko-geolosko-naftni zbornik**, vol. 4, nº 1, p. 147–151, 1992.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaski; DE LUCCA FREITAS, Liane; POHLMANN, Adriana Raffin. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, vol. 26, nº 5, p. 726–737, 2003. DOI 10.1590/S0100-40422003000500017.

SEGURA-CAMPOS, Maira; GONZÁLEZ-BARRIOS, Gisela; ACERETO-ESCOFFIÉ, Pablo; ROSADO-RUBIO, Gabriel; CHEL-GUERRERO, Luis; BETANCUR-ANCONA, David. Perfil de ácidos grasos de mero (*Epinephelus morio*) crudo y procesado en aceite capturado en la península de Yucatán, México. **Nutrición Hospitalaria**, vol. 31, nº 2, p. 928–935, 30 nov. 2015. DOI 10.3305/NH.2015.31.2.7735.

SHI, Jinjun; KANTOFF, Philip W.; WOOSTER, Richard; FAROKHZAD, Omid C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature reviews. Cancer**, vol. 17, nº 1, p. 20–37, 1 jan. 2017. DOI 10.1038/NRC.2016.108.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, vol. 82, nº 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990. <https://doi.org/10.1093/JNCI/82.13.1107>.

STECANELLA, Luciano Aparecido. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas Contendo Grandisina**. 2011. 2–72 f. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

STOCKHAM, SL; SCOTT, MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, 2nd edition. **The Canadian Veterinary Journal**, Oxford, vol. 52, nº 2 ed. 2nd, p. 161, 2011.

TEIXEIRA, Gerson Lopes; IBAÑEZ, Elena; BLOCK, Jane Mara. Emerging Lipids from Areaceae Palm Fruits in Brazil. **Molecules**, vol. 27, nº 13, 1 jul. 2022. DOI 10.3390/MOLECULES27134188.

TONUSSI, Carlos Rogério; FERREIRA, Sérgio H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **European Journal of Pharmacology**, vol. 251, nº 2–3, p. 173–179, 14 jan. 1994.

VALLI, Marília; RUSSO, Helena M.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 90, nº 1, p. 763–778, 16 abr. 2018. DOI 10.1590/0001-3765201820170653.

VERGALLO, Cristian. Nutraceutical Vegetable Oil Nanoformulations for Prevention and Management of Diseases. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, vol. 10, nº 6, p. 1–30, 1 jun. 2020. DOI 10.3390/NANO10061232.

VERMA, Poonam; GHOSH, Amit; RAY, Manisha; SARKAR, Saurav. Lauric Acid Modulates Cancer-Associated microRNA Expression and Inhibits the Growth of the Cancer Cell. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, vol. 20, nº 7, p. 834–844, 10 mar. 2020. DOI 10.2174/1871520620666200310091719.

VOS, Theo; et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, vol. 396, nº 10258, p. 1204–1222, 17 out. 2020. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30925-9.

WALLACE, Taylor C. Health Effects of Coconut Oil-A Narrative Review of Current Evidence. **Journal of the American College of Nutrition**, vol. 38, nº 2, p. 97–107, 17 fev. 2019. DOI 10.1080/07315724.2018.1497562.

WANG, Xianglu; TANG, Qiang; HOU, Huiqin; ZHANG, Wanru; LI, Mengfan; CHEN, Danfeng; GU, Yu; WANG, Bangmao; HOU, Jingli; LIU, Yangping; CAO, Hailong. Gut Microbiota in NSAID Enteropathy: New Insights From Inside. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, vol. 11, p. 11:679396, 6 jul. 2021. DOI 10.3389/FCIMB.2021.679396.

WEERAPREEYAKUL, Natthida; NONPUNYA, Apiyada; BARUSRUX, Sahapat; THITIMETHAROCH, Thaweesak; SRIPANIDKULCHAI, Bungorn. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. **Chinese Medicine**, vol. 7, nº 1, p. 15, 2012. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-15>.

WHITE, BRETT. Dietary Fatty Acids. **American Family Physician**, vol. 80, nº 4, p. 345–350, 15 ago. 2009.

WHO. **Global Action Plan For the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. Geneva: [s. n.], 2013a

WHO. **Global Report on Traditional and Complementary Medicine**. Geneva: [s. n.], 2019. Disponível em: <http://apps.who.int/bookorders>.

WHO. **Regulatory Situation of Herbal Medicines A worldwide Review The evaluation of these products and ensuring their safety and efficacy through registration and regulation present important challenges.** [S. l.: s. n.], 1998.

WHO. **Traditional Medicine Strategy 2014-2023.** Geneva: [s. n.], 2013b. Disponível em: www.who.int. Acessado em: 8 set. 2022.

WHO. **WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019.** Geneva: [s. n.], 1 dez. 2020

WINTER, Charles A.; RISLEY, Edwin A.; NUSS, George W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.**, vol. 111, nº 3, p. 544–547, 1962. DOI 10.3181/00379727-111-27849.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants.** Geneva: [s. n.], 2023.

YEUNG, Yiu To; AZIZ, Faisal; GUERRERO-CASTILLA, Angelica; ARGUELLES, Sandro. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. **Current Pharmaceutical Design**, vol. 24, nº 14, p. 1449–1484, 28 mar. 2018. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180327165604>.

ZAMBERLAN, Alexandre de Oliveira. **Siistema Multiagente para Avaliação do efeito de aglomeração em nanopartículas poliméricas.** 2018. 1–164 f. Tese de Doutorado – Universidade Franciscana, Santa Maria, 2018.

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO

Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 51(3), 1212-1228, 2022

www.farmacia.unal.edu.co

Review article / <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n3.100424>

Kollicoat MAE® 100P as a film former polymer for nanoparticles preparation

Bianca Rodrigues Acacio¹, Verónica Bautista Robles², Ariadna Lafourcade Prada³, Joao Marcos Assis⁴, Tatiane Pereira de Souza⁵, Hady Keita⁶, Serafim Florentino Neto⁷, Edgar Julian Paredes Gamero⁸, Jesús Rafael Rodríguez Amado^{9*}

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Matogrosso do Sul, Ave Costa e Silva, s/n, Bairro Universitario, 79070-900, Campo Grande-MS, Brazil. E-mail: bianca.racacio@gmail.com

² Postgraduate Program in Biotechnology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Matogrosso do Sul, Ave Costa e Silva, s/n, Bairro Universitario, 79070-900, Campo Grande-MS, Brazil. E-mail: robles_verosav@hotmail.com

³ Laboratory of Innovation in Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Federal University of Amazonas, Ave General Rodrigo Octavio Jordão Ramos 1200, Coroado I, CEP 69067-005, Manaus-AM, Brazil. E-mail: ariadnalafu1977@gmail.com

⁴ Technical Leader -Pharma Solutions South America. BASF S.A. Rochavera - Torre Crystal, Avenida Nacões Unidas, 14171, CEP 04794-000, São Paulo, Brazil. E-mail: joao-marcos.assis@basf.com

⁵ Department of Medicines and Food, Federal University of Amazonas, Ave General Rodrigo Octavio Jordão Ramos 1200, Coroado I, CEP 69067-005, Manaus-AM, Brazil. E-mail: tpsouza@ufam.edu.br

⁶ Division of postgraduate studies, University of Sierra Sur, Guillermo Rojas Mijangos s/n° Ezq Av Universidad, Ciudad Universitaria, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, CP. 70805, Mexico. E-mail: hadykeith@yahoo.fr

⁷ Postgraduate Program in Pharmaceutical Innovation of the IES, Federal University of Amazonas, Ave General Rodrigo Octavio Jordão Ramos 1200, Coroado I, CEP 69067-005, Manaus-AM, Brazil. E-mail: netosf3@gmail.com

⁸ Laboratory of Molecular Cell Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Universidade Federal do Matogrosso do Sul, Ave Costa e Silva, s/n° Bairro Universitario, CEP 79070-900, Campo Grande-MS, Brazil. E-mail: edgar.gamero@ufms.br

⁹ Laboratory of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Universidade Federal do Matogrosso do Sul, Ave Costa e Silva, s/n° Bairro Universitario, CEP 79070-900, Campo Grande-MS, Brazil. *Corresponding author E-mail: jesus.rafael@ufms.br

Received: January 17, 2022

Corrected: March 8, 2022

Accepted: March 16, 2022

SUMMARY

Introduction: Until now, few research works have reported the usefulness of Kollicoat MAE® 100P as a film-former polymer for coating nanocapsules and as a matrix former for nanospheres. **Aim:** To update the current knowledge about the use of Kollicoat MAE® 100P as a film-former polymeric to prepare gastro-resistant nanoparticles. Physicochemical characteristics and functionality of nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P were reported. **Methodology:** An exhaustive review was performed (from 1980 to 2021) in various scientific databases like Medline, Scopus, EBSCO and Cambridge. **Results:** Kollicoat MAE® 100P is a versatile polymer that can be used to prepare gastro-resistant nanoparticles with actives of natural and synthetic origin. This polymer allows producing homogeneous nanoparticles with sizes smaller than 130 nm, and high z-potential, which confers a great stability to nanoparticle systems. On the other side, nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P combined with plasticizer exhibit a hard and flexible shell, with excellent thermal stability up to 60 °C that dissolve at pH above 5.5. **Conclusion:** Kollicoat MAE® 100P is a viable, low-cost, and multifunctional alternative for nanoparticle preparation, however, more studies are needed to develop enhanced nanoparticles with better performances.

Key-words: Kollicoat, nanoparticles, acrylates, gastroresistant.

RESUMO

Kollicoat MAE® 100P como polímero formador de filme para a preparação de nanopartículas

Introdução: até hoje, poucas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de avaliar a utilidade do Kollicoat MAE® 100P como polímero formador de filme para recobrimento de nanocápsulas e como formador de matriz para preparação de nanoesferas. **Objetivo:** atualizar o estado da arte sobre a utilização de Kollicoat MAE® 100P para a preparação de nanopartículas gastrorresistentes, suas características físico-químicas e a funcionalidade das nanopartículas cobertas com Kollicoat MAE® 100P. **Metodologia:** foi realizada uma revisão exaustiva (de 1980 a 2021) em várias bases de dados como Medline, Scopus, EBSCO e Cambridge. **Resultados:** Kollicoat MAE® 100P é um polímero versátil, que pode ser utilizado para

a preparação de nanopartículas gastrorresistentes carregadas com ativos naturais e sintéticos, com tamanho menor que 130 nm, baixa polidispersão e alto potencial z, o que lhe confere grande estabilidade. O Kollicoat MAE® 100P combinadas com plastificantes adequados, produz coberturas duras e flexíveis, com excelente estabilidade térmica até 60 °C, que dissolvem em pH acima de 5,5. **Conclusões:** Kollicoat MAE® 100P representa uma alternativa viável, de baixo custo e multifuncional para a preparação de nanocápsulas e nanoesferas gastroresistentes. No entanto, outros estudos são necessários para desenvolver nanoformulações baseadas neste polímero com melhor funcionalidade.

Palavras chave: Kollicoat, nanopartículas, acrilatos, gastrorresistente.

RESUMEN

Kollicoat MAE® 100P como polímero formador de película para la preparación de nanopartículas

Introducción: hasta ahora, pocos trabajos de investigaciones han relatado la utilidad de Kollicoat MAE® 100P como polímero formador de película para el recubrimiento de nanocápsulas y como formador de matriz para preparar nanoesferas. **Objetivo:** actualizar el estado del conocimiento sobre las características fisicoquímicas de Kollicoat MAE® 100P, su uso como material formador de películas de cubierta para preparación de nanopartículas gastrorresistentes, y la funcionalidad de las nanopartículas preparadas con este polímero. **Metodología:** se realizó una revisión exhaustiva (de 1980 a 2021) en varias bases de datos como Medline, Scopus, EBSCO y Cambridge. **Resultados:** Kollicoat MAE® 100P es un polímero versátil que puede utilizarse para la preparación de nanopartículas gastrorresistentes usando activos naturales y sintéticos. Este polímero produce nanopartículas menores que 130 nm, bajo índice de polidispersión y potencial z relativamente altos, lo que confiere gran estabilidad a formulaciones de nanopartículas. El Kollicoat MAE® 100P, combinado con un plastificante adecuado, produce una cubierta dura y flexible, con excelente estabilidad térmica a temperaturas hasta 60 °C que se disuelve a pH mayores que 5,5. **Conclusión:** Kollicoat MAE® 100P es un polímero multifuncional, de bajo costo útil para preparar nanopartículas gastroresistentes. Sin embargo, podrían realizarse otros estudios para desarrollar nanopartículas con mejor funcionalidad.

Palabras clave: Biotecnología, nanomedicina, nanomateriales, nanocompuestos.

INTRODUCTION

Nanotechnology, also called the “science of the very small” allows creating nano-sized products and devices (10^{-9} m) with high functionality and specificity. Nanoformulated substances usually have chemical, physicochemical and biological properties different from those in their natural state [1]. In the last years, nanotechnological products have been developed for the treatment of cancer, inflammatory and cardiovascular diseases, diabetes, and obesity, among other conditions [2]. However, the selection of the polymeric material for nanoparticle preparation is a critical phase of this process.

Nanoparticle formulation arises as an effective way to improve solubility and bioavailability of drugs belonging to groups II and IV of the biopharmaceutical classification system (BSC) [3]. The correct selection of the type and quantity of the coating polymer determines important properties such as the site, the release profile, and the drug's physicochemical stability. Coating polymers must be non-toxic, hypoallergenic, and well tolerated by the intended route of administration (biocompatible) [1]. However, the variety of biocompatible film former polymers for nanoparticle preparation is still limited. Among the most used materials for this purpose are synthetic polymers such as those derived from methacrylic acid [4], poly- ϵ -caprolactone, and polylactic acid [5, 6]. Polymers of natural origin such as chitosan, cellulose esters, alginates, and some others are also used [1]. However, synthetic polymers are the most appropriated for nanoparticle preparation. Polymers of natural origin usually produce unstable nanoparticles and make the preparation methodologies less reproducible [5].

Nanocapsules are drugs' carrier systems highly effective. Depending on the type of polymer and the characteristics of the coating layer that it forms, nanocapsules can be vectored towards a specific site (for example the intestine) and the drugs' release can be controlled [5]. Nanocapsules can transport drugs of both chemical-synthetic and natural origins such as plant extracts [7] and isolated and/or purified compounds. However, only some polymers have been shown a wide functionality that allows covering chemical-synthetic and natural-origin drugs, maintaining suitable stability and high functionality.

A versatile polymer with broad functionality that has been little used for nanoparticle preparation is Kollicoat MAE® 100P. This polymer has been used, successfully, to prepare nanoparticles loaded with plant extracts [8], with drugs of chemical-synthetic origin [9], and nanocapsules loaded with a drug isolated from a plant oilresin. Thus, this review aims to update the state of knowledge about the physicochemical characteristics of the Kollicoat MAE® 100P, and its use as a film former polymeric material for preparing gastro-resistant nanoparticles. Physicochemical characteristics and the function-

ality of nanoparticles prepared with Kollicoat MAE® 100P were also reviewed. Thus, an exhaustive review (from 1980 to 2021) in various scientific databases like Medline, Scopus, EBSCO, and Cambridge, was performed.

Nanocapsules

Nanocapsules are nano-sized vesicular particles (figure 1) with a polymeric layer surrounding a nucleus containing the drug [5]. When the nucleus is an oily liquid, they are called nanocapsules, but when the nucleus is a solid lipid, they are called solid lipid nanoparticles [10]. Nanocapsules with an aqueous liquid core are called polymersomes and are prepared using amphiphilic block copolymers [11]. The main characteristic of nanocapsules is the perfect differentiation between the coating shell and the core material, contrary to nanospheres, where the polymeric material and the drug encapsulated form a matrix or lattice where it is impossible to differentiate the shell from the core [5].

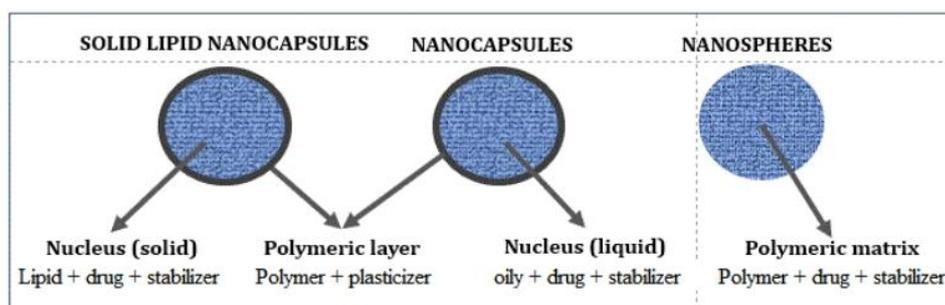


Figure 1. Physical structure of solid lipid nanocapsules, nanocapsules and nanospheres.

The proper selection of the preparation method, the core components, and the coating polymer (and plasticizers) allows preparing the desired nanoparticle [5, 9]. The nucleus of the nanoparticle can contain vegetal extracts, drugs from the chemical-synthetic origin and/or isolated compounds. In all cases, the appropriate selection of the nucleus component and the covering material (polymer and plasticizers) makes it possible to vectorize the drug to a specific site of action and controlling the amount and rate of drug release. The preparation of polymeric nanoparticles from liquid plant extracts (fluid and soft) generally produces nanospheres.

A suitable polymer for nanoparticle preparation must protect the drug from external factors like temperature, light, and O₂. This means that the polymeric layer needs to improve the nanoparticle's stability [7]. Physicochemical properties of polymers (e.g., acid-base behavior, solubility, and lipophilicity) determine nanocapsules stability and the drugs' release characteristics. A precise knowledge of the physico-chemical proper-

ties of the film former polymer allows knowing, in advance, the possible site of release and the possibility of controlling the drug release processes.

Copolymers of methacrylic acid-methacrylate esters are among the most used synthetic materials for the preparation of nanoparticles loaded with drugs of reduced solubility [12]. Within this group of polymers is the class of Kollicoat MAE[®] copolymers [13], which currently have their greatest application in the preparation of enteric-coated tablets. However, Kollicoat MAE[®] -grade polymers, despite their excellent properties for nanoparticle preparation, have been little used for this purpose.

Kollicoat classes

There are five classes of Kollicoat on the market: Kollicoat IR, Kollicoat Protect, Kollicoat MAE[®], Kollicoat SR, and Kollicoat Smartseal [14]. The chemical composition and utility of these materials are shown in (table 1). Kollicoat IR class are copolymers of vinyl alcohol grafted with ethylene glycol [13]. Kollicoat Protect is a mixture of Kollicoat IR (~60%) and polyvinyl alcohol (40%) and has been claimed for moisture and oxygen protection [13]. Kollicoat SR 30D class was designed for sustained-release formulations being an aqueous dispersion of polyvinyl acetate and polyvinyl pyrrolidone (K30) [15]. By their side, Kollicoat Smartseal 100 P, is a mixture of diethylamino ethyl methacrylate and methyl methacrylate (3:7). Kollicoat Smartseal 30D is a 30% aqueous dispersion of Kollicoat Smartseal 100P. This polymer is insoluble at neutral pH but soluble at pH<5 being suitable for taste masking and moisture protection [13]. Kollicoat MAE[®] class includes three polymers with similar composition: Kollicoat MAE[®] 100 55, Kollicoat MAE[®] 30DP (30% aqueous dispersion of Kollicoat MAE[®] 100 55), and Kollicoat MAE[®] 100P (pre-neutralized Kollicoat MAE[®] 100-55). All these polymers are used in the Pharmaceutical Industry to prepare enteric-coated pellets for hard capsules and tablets [16]. Kollicoat MAE[®] 100P has shown great utility for preparing gastro-resistant nanoparticles, nonetheless, this functionality has not been claimed in the literature.

Physicochemical characteristics

Kollicoat MAE[®] 100P (figure 2) is an anionic polymer, with a weak acid behavior having a molecular weight of about 250 000 AMU. This polymer dissolves in solutions of pH> 5.5 [21]. Kollicoat MAE[®] 100P contains polysorbate 80 as a plasticizer to diminish the friability of the film formed for tablet preparation [14]. However, additional plasticizers must be used to obtain a flexible and more stable coating layer for nanoparticle preparation. This material also contains sodium dodecyl sulfate as an emulsifier. Kollicoat MAE[®] 100P is partially neutralized (about 6 mol-% of the carboxyl groups) to facilitate its redispersion in water. This characteristic is especially useful for prepar-

Bianca Rodrigues Acacio, Verónica Bautista Robles, Ariadna Lafourcade Prada, Joao Marcos Assis *et al.*

Table 1. Class of Kollicoat®, composition and their use in pharmaceuticals.

Kollicoat Class	Type	Composition	Use	Reference
Kollicoat IR	IR	Polyethylene glycol-Polyvinyl alcohol ratio of 1:3	-Coating tablets and capsules -Binder in tablets, granules, and pellets -Effervescent tablets -Sustained-release tablets	[15]
	Protect	Kollicoat IR, 59.70 % Polyvinyl alcohol, 40% Silicon dioxide, 0,3 %	-Protective coating of tablets and capsules -Tastes masking	[15]
Kollicoat MAE®	30D	Methacrylic acid-ethyl acrylate co-polymer (1:1), 27.0 % Polysorbate 80, 2.3 % Sodium lauryl sulphate, 0.7 % Water, 70.0 %	-Preparation of enteric tablets, capsules, granules, and crystals -Mask unpleasant tastes -Protect from the effects of high humidity	[15] [17]
	100 55	Methacrylic acid-ethyl acrylate copolymer (1:1), 97.0 % Polysorbate 80, 2.3 % Sodium lauryl sulphate 0.7 %	-Preparation of enteric tablets, capsules, granules, and crystals -Mask unpleasant tastes	[15] [17]
	100P	Methacrylic acid-ethyl acrylate copolymer (1:1), partially neutralized with 6 mol % NaOH, 97.0 % Polysorbate 80, 2.3 % Sodium lauryl sulphate, 0.7 %	-Protect from the effects of high humidity -Nanocapsules film former -Nanoparticles controlled release	[18, 19]
Kollicoat SR	30DP	Polyvinyl acetate, 27.0 % Povidone K30 (Kollidon 30), 2.7 % Sodium lauryl sulphate, 0.3 % Water, 70.0 %	-Sustained release matrix tablets, pellet, and granules, and gelatin hard capsules	[15] [20]
Kollicoat SmartS-eal	30DP	Methyl methacrylate and di(ethyl)aminoethyl methacrylate (7:3) copolymer. 30% aqueous polymer dispersion	-Aqueous film coating	[15] [20]
	100P	Methyl methacrylate and di(ethyl)aminoethyl methacrylate (7:3) copolymer (spray dried powder)	-Aqueous, and organic film coating	[15]

ing nanodispersion of vegetal extracts. Kollicoat MAE® 100P complies with the current monograph of methacrylic acid-ethyl acrylate copolymer (1:1) [22] and is listed as “Partially neutralized methacrylic acid: ethyl acrylate copolymer” in the USP-NF [21].

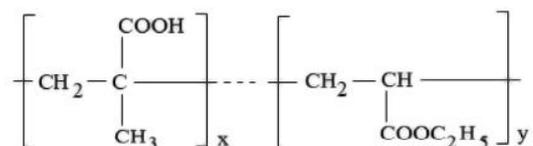


Figure 2. Basic structure of Kollicoat MAE® 100P copolymers formed by methacrylic acid: ethyl acrylate (x=y).

Kollicoat MAE® 100P forms aqueous dispersions due to is pre-neutralized with sodium hydroxide, without requiring a further addition of a basic solution [13, 16]. This polymer is soluble in ethanol and acetone (at 35-45 °C) in which forms a slightly viscous solution [16]. This property is used to prepare the organic phase for nanocapsules preparations. For nanocapsules, the organic phase (25-35%) is formed by Kollicoat MAE® 100P, the drug, the organic solvent, and a low HLB surfactant. When the organic phase is added to the aqueous phase (65-75%), which is composed of water plus a nonionic surfactant or another plasticizer, the Kollicoat MAE® 100P insolubilize enclosing the components of the organic phase for forming the nucleus. The change in polarity when the phases are mixes, followed by diffusion of the organic solvent (by stirring or by evaporation under vacuum) get hardened the polymeric shell around the nucleus containing the drug, to form the nanoparticle [23]. This procedure allows preparing nanocapsules loaded with water-insoluble drugs, such as loratadine [9] and α -amyrin [24].

Kollicoat MAE® 100P, when dispersed in water (at 20%) form stable particles with a mean diameter of approximately 300 nm [13]. However, the aqueous dispersion (2%) submitted at a high shear of 7000 rpm, for five minutes in an ultraturrax apparatus (IKA T25, UK) produce nanoparticles of \approx 50 nm (figure 3) with a normal size distribution (Polydispersity index 0.198) [13, 16]. The excellent dispersibility of this partially neutralized polymer in aqueous solutions is an excellent characteristic for nanoparticle preparation that is still little explored.

Kollicoat MAE® 100P forms a brittle film that breaks at an elongation under one percent [13]. For this reason, plasticizers are essential for producing a coating layer with suitable elasticity to achieve good stability. Hydrophilic plasticizers like propylene glycol, triethyl citrate (TEC), as well as non-ionic surfactants (e.g., Brij, polysorbates, and ethoxylated fatty acid esters), favor the elasticity of the coating layer and improve the

stability of the nanocapsules shell. Hydrophilic plasticizers give flexibility and resistance to the coating layer and enhance the dispersion in the aqueous medium, favoring the interaction with the polymeric chain of the Kollicoat MAE® 100P [13].

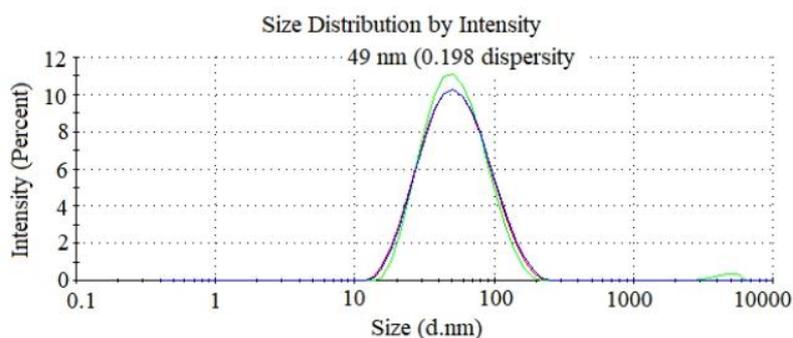


Figure 3. Particle size of 2 % Kollicoat MAE® 100P aqueous nanodispersion (authors' unpublished work).

Nanoformulations with Kollicoat MAE® 100P

The nanodispersion of *Cassia grandis* L. f [19] was developed using the polymer deposition-solvent diffusion method [18]. This methodology allowed obtaining a mean particle size of 75 nm, with a closed polydispersity index of 0.176, and a zeta potential of -11.20 mV. With the same methodology, it was prepared nanoparticles of loratadine, a chemical-synthetic drug [19], which exhibited a mean particle size of 43 nm, with a polydispersity index of 0.250 and -19.30 mV of zeta potential. In the same way, it was prepared nanocapsules loaded with α -amyirin (a hydrophobic drug obtained by isolation and purification from a vegetal oilresin [24]). Nanocapsules loaded with α -amyirin showed particle size of 130 nm, polydispersity index 0.100, and -38.65 mV of zeta potential. The abovementioned nanoformulations showed small particle sizes (between 43 and 130) with normal size distribution and high modular values of zeta potential. These results suggest that Kollicoat MAE® 100P is a versatile polymer, which allows preparing nanoformulation loaded with drugs from diverse origins, resulting nanosystems with homogeneous sizes, which is essential for achieving good stability.

Properties of Kollicoat MAE® 100P loaded nanoparticles

The development of nanoparticles loaded with plant extracts is considered a technological challenge. Plant extracts are complex mixtures of metabolites that present different characteristic of solubility, permeability, and stability [1]. The development of nanoparticles containing plant extracts improves the pharmacological effect of the extracts

enhancing the stability and allows optimize their use since lower doses are needed to achieve the desired effect. The use of biocompatible polymers to produce a coating layer to protect metabolites present in the extracts by the formation of nanocapsules or a polymeric matrix (nanospheres), is an innovative and highly effective technology to improve bioavailability and stability of medicinal plant extracts, which, however, is still sub explored.

Prada and co-workers [8, 25] prepared nanoparticles of *Cassia grandis* (a medicinal plant traditionally used for the treatment of Diabetes mellitus, an anemias) coated with Kollicoat MAE® 100P. In that study, three nanoparticle formulations were developed using three different film former polymers (Eudragit® L, PEG 4000, and Kollicoat MAE® 100P). The nanoformulations particle size, polydispersity index, and zeta potential were compared, as well as the stability. Nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P showed the smaller particle size, a lower polydispersity index, and the higher modular value of Zeta potential. The encapsulation efficiency of the process was greater than 85 % [25] and the loading capacity was 73 %. Kollicoat MAE® 100P coated nanoparticles showed the best performances showing the ability of this polymer to produce nanoparticles loaded with vegetal extracts.

Several studies demonstrated the stability, in the stomach environment, of nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P [9, 24, 26]. Drugs with erratic absorption in the stomach, or that undergo transformations that reduce their bioavailability need to be formulated, so that their release and absorption occur in the intestine. Loratadine is a drug that belongs to group II of the BSC classification system [26]. This drug is protonated in the acidic environment of the stomach, decreasing its absorption [9]. For this reason, a nanoparticle formulation for intestinal release of loratadine was prepared using Kollicoat MAE® 100P as a coating polymer [9]. Very stable nanoparticles, ≈ 75 nm in size and with a normal distribution were obtained. An encapsulation efficiency greater than 84% was obtained. This study confirmed the suitability of Kollicoat MAE® 100P as a gastro-resistant shell-forming polymer in the preparation of nanoparticles, a characteristic that had not been reported in the literature.

Effect of temperature on nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P

In 2006, a study reported the deformation capacity of polymeric films prepared with Kollicoat MAE® 30DP, in the presence and absence of Polysorbate 80, used as a plasticizer [4]. Polysorbate 80 improved the film elasticity, allowing it to withstand deformation forces 5 times greater than those films that did not contain this plasticizer. As a result, the combination of Kollicoat MAE® 30D-Polysorbate 80 produced flexible films with high thermal stability. A study conducted by our working group evaluated the effect of the temperature (from 20 to 70 °C) on the size and size distribution (poly-

dispersity index) of Kollicoat MAE® 100P nanoparticles loaded with a plant extract [25] and with a synthetic drug [18]. In both cases, Polysorbate 80 was used as the plasticizer. Temperatures between 20 and 60 °C did not modify, significantly, the particle size of both nanoformulations. Temperatures greater than 60 °C produced a 300% increase in size on the nanoparticles loaded with the plant extract (from 200 to 650 nm), while in nanoparticles loaded with the synthetic drug the size remained practically constant (32-35 nm). However, between 20-60 °C, the polydispersity index of both formulations remained low (0.020-0.140 in the plant extract-loaded nanodispersion and between 0.260 and 0.280 in the nanoparticles of the synthetic drug). These studies showed that, despite the particle size deformation produced by the temperature, there was slight variation in the particle size distribution. This fact indicates the high thermal stability of nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P (between 20 and 60 °C), regarding the nature of the enclosed drug.

It is important to highlight that nanoparticle preparation methods can be of low or high energy input [19]. Some preparation processes and some unitary operations (*e.g.*, ultrasonic stirring) significantly increase the temperature of the liquid medium containing nanoparticles preparation. Under these conditions, it is convenient to use a biocompatible polymer, such as Kollicoat MAE® 100P, which produces thermo-resistant coated films and improves the stability of nanoformulations, regardless of the origin of the nanoformulated drug. However, the strength, elasticity, and stability of the coating layers formed by Kollicoat MAE® 100P depend on the plasticizer.

In an unpublished work of our working group it was evaluated the effect of the carbon chain length of the fatty acid present in the sorbitan ester (non-ionic surfactant) on the particle size and size distribution of nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P. Four white nanodispersions (without active ingredient) were prepared by the polymer deposition-solvent diffusion method [22] using 750 mg of Kollicoat MAE® 100P in 5 mL of ethanol: acetone mixture 1:1 (organic phase) and 500 mg of each polysorbate in 100 mL of distilled water. In all cases, it was used the same experimental procedure. As the length of the carbon chain of the esterified acid increases, the particle size and polydispersity index decreased (figure 4). This experiment suggested the feasibility of using other sorbitan esters as plasticizers jointly with the Kollicoat MAE® 100P in nanoparticle preparation. Thus, it would be necessary to evaluate the effect of combinations of Kollicoat MAE® 100P with plasticizers of different nature (example: polyethylene glycol, and TEC) and/or the effect of other polymers like polyvinyl alcohol on the physic-chemical characteristics, release profiles, and stability of nanoparticles loaded with active ingredients of diverse nature.

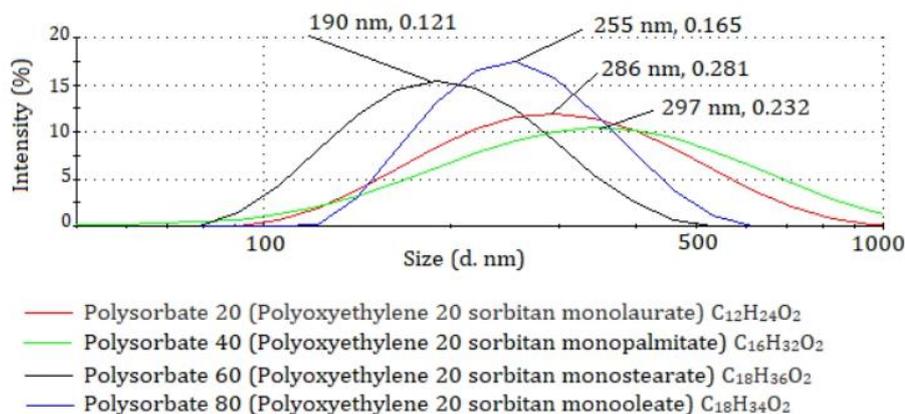


Figure 4. Effect of the carbon chain length of the sorbitan ester fatty acid on the particle size and polydispersity index of nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P (authors' unpublished work).

Release profile of Kollicoat MAE® 100P -loaded nanoparticles

Nanoparticle formulations produced with Kollicoat MAE® 100P as a coating polymer did not show prolonged release profiles at pH between 6.5-7.4 [9, 26]. The *Cassia grandis* nanoparticles, in simulated intestinal fluid (pH 6.5) with and without pancreatin (pH 6.5 and 7.4, respectively) released 100% of the active ingredient in 70 min [8], while loratadine nanoparticles (in the same fluids) released 100% of the drug in 40 min. These studies confirmed the ability of the nanoparticles produced with Kollicoat MAE® 100P to maintain, for at least 40 min, the drug release at pHs compatibles with the intestinal fluid in fasted and fed condition.

These results suggest the need to conduct other studies combining Kollicoat MAE® 100P with different plasticizers and stabilizers, for controlling, with precision and reproducibility the release of the drug nanoformulated. Nonetheless, broad ranges of drug release were observed with the use of methacrylic acid copolymers combined with some organic compounds, such as ethylcellulose [27].

On the other side, Kollicoat MAE® 100P was used to form a gastro-resistant film in hard gelatin capsules filled with rHuKGF protein. The study determined the absolute bioavailability of this protein in gastro-resistant capsules, comparing it with intravenous administration. After the oral administration, the rHuKGF protein formulated in gastro-resistant capsules showed an absolute bioavailability of 74%. The study demonstrated that the protein was adequately released after the dissolution of Koli-

coat MAE® 100P, successfully crossing the intestinal membranes to reach the systemic circulation [28].

Pharmacological properties of nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P

One of the most advantages of nanoparticles is that they can modify the activity of drugs. *Cassia grandis* nanoparticles coated with Kollicoat MAE® 100P showed (*in vitro*) an antioxidant effect more potent than the extract and the gallic acid (used as a control) [8]. On the other side, nanoparticles loaded with *Cassia grandis* extract produced a strong inhibition of the pancreatic lipase, however, the extract did not inhibit pancreatic lipase. Similarly, *Cassia grandis* nanodispersion showed (*in vivo*) a hypoglycemic potency 20-fold higher than the crude extract. The authors suggest that the particle size in nanometric scale and the slow release of the drug from nanoparticles potentiate the pharmacological effect. These results confirm the need for research to improve the release properties of nanoparticle coated with Kollicoat MAE® 100P, in order to obtain a better pharmacological performance, optimizing and rationalizing the use of drugs of any nature that could be nanoformulated.

A gastro-resistant nanocapsules formulation of glibenclamide coated with methacrylic acid-ethyl acrylate copolymer showed a hypoglycemic effect (*in vivo*) five times greater than the commercial form of this drug [29]. This, is one of the most significant characteristics of nanoparticle-based on this kind of polymers, potentiating the pharmacological effect of the drugs.

Another highlighted characteristic of the Kollicoat MAE® 100P is the innocuousness. Synthetic polymers and copolymers based on methacrylic acid tested as drug carriers of different drugs do not exert either toxic effects or changes in the metabolic activity of immune system cells [30]. The innocuity was also observed in immunogenicity studies performed on coated tablets with methacrylic acid. The study showed that the films formed by this polymer do not produce any abnormal response of the immune system [31].

CONCLUSION

Investigations have shown that Kollicoat MAE® 100P is a versatile polymer that can be used for the preparation of gastroresistant nanoparticles with drugs of diverse origins. With this polymer can be prepared nanoparticles with size smaller than 130 nm and low polydispersity indexes, and relatively high z-potentials, which confers a great stability to nanoparticle system. Nanoparticles produced with Kollicoat MAE® 100P combined with a suitable plasticizer exhibit a hard and flexible shell and contribute to sustained

drug release systems. Besides, drugs nanoformulated with Kollicoat MAE® 100P as coating polymer are insoluble at pH < 5.5 and presented a good thermal stability at temperatures of up to 60 °C. This review confirmed that Kollicoat MAE® 100P, despite being a well-known polymer in the Pharmaceutical Industry, has still been little investigated for nanoparticles preparations. Kollicoat MAE® 100P represents a viable, low-cost, and multifunctional alternative for the preparation of nanoparticle systems, which requires more studies in its use, to build nanoformulated products with better performances.

ACKNOWLEDGEMENTS

To BASF-SA São Paulo, Brazil for the kindness and gentle support.

DISCLOSURE STATEMENT

Authors declare that there is no competing interest.

REFERENCES

1. G.K. Zorzi, E.L.S. Carvalho, G.L. Von Poser, H.F. Teixeira, On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **25**, 426-436 (2015). Doi:10.1016/j.bjp.2015.07.015
2. I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles: Properties, applications, and toxicities. *Arab. J. Chem.*, **12**, 908-931 (2019). Doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
3. S.S. Shelake, S.V. Patil, S.S. Patil, Formulation and evaluation of fenofibrate-loaded nanoparticles by precipitation method, *Indian. J. Pharm. Sci.*, **80**, 420-427 (2018). Doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000374
4. J. Bajdik, K. Pintye-Hodi, Study of deformation process of stored polymethacrylate free film, *Pharmazie*, **61**, 887-888 (2006).
5. C.E. Mora, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **385**, 113-142 (2010). Doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
6. G.D. Quintanar, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from

- preformed polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 1113-1128 (1998). Doi:10.3109/03639049809108571
7. S.R. Schaffazick, S.S. Guterres, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos, *Quim. Nova*, **26**, 726-737 (2013). Doi:10.1590/S0100-40422003000500017
 8. A.L. Prada, A.P.R. Bitencourt, A.J.R. Rodriguez, R.A.S. Cruz, J.C.T. Carvalho, Fernandes, Development and characterization of *Cassia grandis* and *Bixa orellana* nanoformulations, *Curr. Top. Med. Chem.*, **16**, 2057-2065 (2016). Doi:10.2174/1568026616666160215161103
 9. A.J.R. Rodriguez, A.L. Prada, J.L. Duarte, H. Keita, H.R. da Silva, A.M. Ferreira, *et al.*, Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles, *Saudi Pharm. J.*, **25**, 1158-1168 (2017). Doi:10.1016/j.jsps.2017.07.008
 10. W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv.*, **47**, 165-196 (2001). Doi:10.1016/S0169-409X(01)00105-3
 11. I. Meerovich, A.K. Dash, Polymersomes for drug delivery and other biomedical applications, in: A.-M. Holban, A. Mihai-Grumezescu (editors), *Materials for Biomedical Engineering: Organic Micro and Nanostructures*, Elsevier, 2019, pp. 269-309. Doi:10.1016/B978-0-12-818433-2.00008-X
 12. S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: Preparation, characterization and stability evaluation, *Pharmazie*, **62**, 354-360 (2007).
 13. V. Bühle, Kollicoat grades. "Functional polymers for the pharmaceutical industry". BASF, Pharma Solutions, Aktiengesellschaft, 2007, v. 67056.
 14. Pharma Ingredients & Services Kollicoat® MAE grades®-Registered trademark of BASF group Methacrylic acid/ethyl acrylate copolymers for enteric coatings, 2010. URL: <https://worldaccount.basf.co>
 15. BASF, Technical information, Methacrylic acids/ethyl acrylates copolymer for enteric coating. Kollicoat MAE® 100P. Pharma Ingredients and service. BASF SE, BASF, Limburgerhof: The chemical company, 2019.

16. C. Corell, F. Bang, T. Cech, M. Haberecht, K. Mäder, Investigating the effect of partial neutralisation of the polymer on the dissolution characteristics of poly (methacrylic acid-co-ethyl acrylate) based coats, Abstract in: 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology; March 19-22, 2018, Granada, Spain.
17. A.L. Felton, *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*, CRC Press, Boca Raton (FL), 2007.
18. P.A. Lafourcade, L.D.R. Achod, H. Keita, J.C.T. Carvalho, T.P. de Souza, A.J.R. Rodríguez, Development, pharmacological and toxicological evaluation of a new tablet formulation based on *Cassia grandis* fruit extract, *Sustain. Chem. Pharm.*, **16**, 100244 (2020). Doi:10.1016/j.scp.2020.100244
19. A.L. Prada, H. Keita, T.P. de Souza, E.S. Lima, L.D.R. Acho, M.J.A. da Silva, *et al.*, *Cassia grandis* Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitor effect, *Saudi Pharm. J.*, **27**, 191-199 (2019). Doi:10.1016/j.jsps.2018.10.003
20. M. Hossain, R. Jalil, S. Reza, M. Quadir, C. Hossain, Evaluation of Kollicoat SR 30D and Kollicoat EMM 30D as matrix former for controlled release drug delivery, *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, **4**, 1 (2005). Doi:10.3329/dujps.v4i1.202
21. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36), United States Pharmacopeial Convention; 2016, URL: https://online.uspnf.com/uspnf/document/GUID-AC788D41-90A2-4F36-A6E7-769954A9ED09_1_en-US. Accessed: January 18, 2019.
22. European Pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe, 2018.
23. H. Fessi, F. Puisieux, J.P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement, *Int. J. Pharm.*, **55**, R1-R4, (1989). Doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0
24. F.S. Neto, S.T. Pereira, A.J.R. Rodriguez, P.A. Lafourcade, Sistemas poliméricos nanodispersos obtidos por encapsulação de a β -Amirina: Processo tecnológico e utilidade farmacológica, Patent BR 10 2020 008802 5, INPI, Brazil.
25. A.L. Prada, A.J.R. Rodríguez, H. Keita, E.P. Zapata, H. Carvalho, E.S. Lima, *et al.*, *Cassia grandis* fruit extract reduces the blood glucose level in alloxan-induced diabetic rats, *Biomed. Pharmacother.*, **103**, 421-428 (2018). Doi:10.1016/j.biopha.2018.04.059

26. A.L. Barbosa, N.M. Silva-Barcellos, B.K. Rezende, E.L. de Silveira, J. de Souza, Biopharmaceutics classification system: importance and inclusion in biowaiver guidance, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **51**, 143-155 (2015). Doi:10.1590/S1984-82502015000100015
27. H. Kranz, S. Gutsche, Evaluation of the drug release patterns and long-term stability of aqueous and organic coated pellets by using blends of enteric and gastrointestinal insoluble polymers, *Int. J. Pharm.*, **380**, 112-119 (2009). Doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.013
28. M.A.A. Maki, M. Elumalai, H.N. Ahamed, P.V. Kumar, Design a lymphatic specific delivery system of rHuKGF in rat and assessment of intestinal lymphatic uptake, *Biomed. Eng. Int.*, **2**, 0066-0074 (2020). Doi:10.33263/BioMed22.066074
29. O. R. Guadarrama-Escobar, I. Sánchez-Vázquez, P. Serrano-Castañeda, G. A. Chamorro-Cevallos, I.M. Rodríguez-Cruz, A.Y. Sánchez-Padrón, J.J. Escobar-Chávez, Development, characterization, optimization, and *in vivo* evaluation of methacrylic acid–ethyl acrylate copolymer nanoparticles loaded with glibenclamide in diabetic rats for oral administration, *Pharmaceutics*, **13**, 2023 (2021). Doi:10.3390/pharmaceutics13122023
30. O.V. Zhukova, E.V. Arkhipova, T.F. Kovaleva, S.A. Ryabov, I.P. Ivanova, A.A. Golovacheva, D.A. Zykova, S.D. Zaitsev, Immunopharmacological properties of methacrylic acid polymers as potential polymeric carrier constituents of anticancer drugs, *Molecules*, **26**, 4855 (2021). Doi:10.3390/molecules26164855.
31. S. Fernández, J. Castaño, Y. Pino, E. Uribarri, L. A. Riverón, B. Cedré, A. Talavera, Evaluation of enteric-coated tablets as a whole cell inactivated vaccine candidate against *Vibrio cholera*, *Travel Med. Infect. Dis.*, **11**, 103-109 (2013). Doi:10.1016/j.tmaid.2012.10.006

HOW TO CITE THIS ARTICLE

B. Rodrigues-Acacio, V. Bautista-Robles, A. Lafourcade-Prada, J.M. Assis, T. Pereira de Souza, H. Keita, S.F. Neto, E.J. Paredes-Gamero, J.R. Rodríguez-Amado, Kollicoat MAE® 100P as a film former polymer for nanoparticles preparation, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **51**(3), 1112-1228 (2022). <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n3.100424>

ANEXO 2 – PATENTE SUBMETIDA

09/08/2022 870220071205
22:42

29409161953641465

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

Número do Processo: BR 10 2022 015777 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 70241308224

Nacionalidade: Cubana

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: RUA SACRAMENTO,320, BLOCO 705 SÃO FRANCISCO

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79118-021

Pais: Brasil

Telefone: 67992202304

Fax:

Email: jiribilla2009@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/08/2022 às 22:42, Petição 870220071205

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Composições contendo óleo dos frutos de acurí (scheelea phalerata (mart. ex spreng.) burret: utilidade farmacológica, cosmecêutica e nutracêutica

Resumo: Composições contendo óleo dos frutos de acurí (scheelea phalerata (mart. ex spreng.) burret: utilidade farmacológica, cosmecêutica e nutracêutica, a presente invenção trata-se do desenvolvimento de formulações contendo óleo extraído dos frutos da palmeira Scheelea phalerata (Mart. ex Spreng.) Burret (acurí), e sua utilidade farmacêutica, cosmecêutica e nutracêutica. Nesta invenção reivindica-se a utilização, e a preparação de composições farmacêuticas, nutracêuticas e cosméticas contendo óleo extraído dos frutos da palmeira Scheelea phalerata (Mart. ex Spreng.) Burret (acurí). Reivindica-se também o desenvolvimento de sistemas de nanopartículas de qualquer natureza contendo óleo extraído dos frutos da palmeira Scheelea phalerata (Mart. ex Spreng.) Burret (acurí). É também reivindicado a preparação de composições e formulações farmacêuticas, nutracêuticas e cosméticas contendo nanopartículas óleo extraído dos frutos da palmeira Scheelea phalerata (Mart. ex Spreng.) Burret (acurí). Por último, é reivindicada utilização do óleo extraído dos frutos da palmeira Scheelea phalerata (Mart. ex Spreng.) Burret (acurí) e das nanopartículas de qualquer natureza que vierem a ser preparadas usando como ativo esse óleo, em composições e formulações farmacêuticas, nutracêuticas e cosméticas para sua utilização como antioxidante, analgésico, anti-inflamatório, hipoglicêmico e antihiperlipêmico, emagrecedor, hipolipemiante, anti-hiperglicemiante, e antineoplásico, tanto para uso humano como veterinário.

1/1

Figura a publicar: sim

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/08/2022 às 22:42, Petição 870220071205

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5**Nome:** JESUS RAFAEL RODRIGUEZ AMADO**CPF:** 70241308224**Nacionalidade:** Cubana**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Dr. Werneck, 104, Residencial Piazza Boulevard, 1104**Cidade:** CAMPO GRANDE**Estado:** MS**CEP:** 79118-021**Pais:** BRASIL**Telefone:** (67) 992 202304**Fax:****Email:** jiribilla2009@gmail.com**Inventor 2 de 5****Nome:** ARIADNA LAFOURCADE PRADA**CPF:** 70392343274**Nacionalidade:** Cubana**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Dr. Werneck, 104, Residencial Piazza Boulevard, 1104**Cidade:** CAMPO GRANDE**Estado:** MS**CEP:** 79060-300**Pais:** BRASIL**Telefone:** (67) 992 406906**Fax:****Email:** jiribilla2009@gmail.com**Inventor 3 de 5****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/08/2022 às 22:42, Petição 870220071205

Nome: BIANCA RODRIGUES ACÁCIO

CPF: 10353530670

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Servidor das demais carreiras da administração pública direta, autárquica e fundacional

Endereço: Av. Rashid Neder, 16. Torre 3 apto 1302

Cidade: CAMPO GRANDE

Estado: MS

CEP: 79010-170

País: BRASIL

Telefone: (67) 998 591318

Fax:

Email: bianca.r.acacio@gmail.com

Inventor 4 de 5

Nome: MARCO ANTÔNIO UTRERA MARTINES

CPF: 07134511812

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua do Franco, 993, Amantini Residence, Quadra 05, Lote 16

Cidade: CAMPO GRANDE

Estado: MS

CEP: 79051-400

País: BRASIL

Telefone: (67) 991 016049

Fax:

Email: marco.martines@ufms.br

Inventor 5 de 5

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/08/2022 às 22:42, Petição 870220071205

Nome: RENATA TRENTIN PERDOMO

CPF: 84895918149

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av Costa e Silva s/n. Bairro Pioneiros/ UFMS

Cidade: CAMPO GRANDE

Estado: MS

CEP: 79070-900

Pais: BRASIL

Telefone: (67) 334 57400

Fax:

Email: renata.trentin@ufms.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Resumo	Resumo.pdf
GRU	GRU - Patente.pdf
Desenho	Figuras.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/08/2022 às 22:42, Petição 870220071205