

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO ÓLEO DE PEQUI (*CARYOCAR BRASILIENSE*CAMBESS) COMO AGENTE ESTRUTURANTE

Jader Pires¹
Aline Gomes Batista da Conceição²
Suéllen Alves Costa³
Karoline Paiva da Silva⁴
Stela Regina Ferrarini⁵
Cláudia Marlise Balbinotti Andrade⁶

Resumo:

No desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC), a escolha do óleo que formará o núcleo é crucial, pois suas propriedades físico-químicas influenciam em características importantes das nanopartículas, como a velocidade de liberação do fármaco, modificando o comportamento destas em ambientes biológicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nesse cenário, a escolha de óleos vegetais com essa finalidade pode agregar atividade biológica ao nanossistema. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de nanocápsulas desenvolvidas com o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*Cambess) (LNC_{PEQ}) ou com triglicerídeos de cadeia média (LNC_{TCM}) como agentes estruturantes. Para isso células da linhagem V79 foram expostas a diferentes concentrações de LNC e a viabilidade celular foi avaliada através da atividade enzimática mitocondrial e quantificação da densidade celular. A curva de concentração-resposta foi utilizada para determinar a concentração que reduz a viabilidade celular em 50 % (IC₅₀). Os dados obtidos demonstraram que a LNC contendo TCM induziu a redução de 50 % na viabilidade das células V79 na concentração de 5,6 %, enquanto a LNC contendo óleo de pequi apresentou o mesmo efeito na concentração de 10,3 %. O que nos permite inferir que ambos os nanossistemas alteraram a viabilidade celular, mas levaram à resposta celular diferenciada, uma vez que a IC₅₀ da LNC_{PEQ} é maior que a IC₅₀ das LNC_{TCM}. Resultado que pode estar associado à maior viscosidade do óleo de pequi, o que interfere no diâmetro das nanopartículas e sua concentração no meio (nanocápsulas.mL⁻¹), ocasionando menor citotoxicidade e também à atividade biológica do próprio óleo. Com base nesses dados, sugerimos que a LNC_{PEQ} é um nanossistema promissor para a incorporação de fármacos.

Palavras-chave:

Nanotecnologia. Viabilidade celular. Óleo de pequi.

¹Mestrado em Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: bjjader@gmail.com.

²Licenciatura em Química. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: alinegomes200194@gmail.com.

³Bacharelado em Farmácia. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: suell11@hotmail.com.

⁴Bacharelado em Farmácia. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: karolinepaiva787@hotmail.com.

⁵Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: srferrarini@gmail.com.

⁶Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso. E-mail: claudia.mb.andrade@gmail.com.

EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF POLYMERIC LIPID-CORE NANOCAPSULES CONTAINING PEQUI OIL (*CARYOCARBRASILIENSE*CAMBESS) AS A STRUCTURING AGENT

Abstract:

In the development of polymeric lipid-core nanocapsules (LNC) the choice of the oil that will form the nucleus is crucial, because its physicochemical properties influence important characteristics of the nanoparticles, such as the speed of drug release, modifying their behavior in biological environments, both *in vitro* and *in vivo*. In this scenario, the choice of vegetable oils for this purpose can add biological activity to the nanosystem. Thus, the aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of nanocapsules developed with pequi oil (*Caryocarbrasiliense*Cambess) (LNC_{PEQ}) or medium chain triglycerides (LNC_{TCM}) as structuring agents. For this, cells from the V79 strain were exposed to different concentrations of LNC and cell viability was assessed through mitochondrial enzymatic activity and quantification of cell density. The concentration-response curve was used to determine the concentration that reduces cell viability by 50% (IC₅₀). The data demonstrate that LNC containing MCT induced a 50% reduction in viability of V79 cells at a concentration of 5.6%, while the LNC containing pequi oil (*Caryocarbrasiliense*Cambess) showed the same effect at a concentration of 10.3 %. This allows us to infer that both nanosystems altered cell viability, but led to a differentiated cell response, since the IC₅₀ of the LNC_{PEQ} is greater than the IC₅₀ of the LNC_{TCM}. This result may be associated with the biological activity of the oil itself and the higher viscosity of pequi oil, which interferes with the diameter of the nanoparticles and their concentration in the medium (nanocapsules.mL⁻¹), resulting in less cytotoxicity. Based on these data, we suggest that LNC_{PEQ} is a promising nanosystem for the incorporation of drugs.

Keywords:

Nanotechnology. Cell viability. Pequi oil.

EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO DE LÍPIDOS POLIMÉRICOS QUE CONTIENEN ACEITE DE PEQUI (*CARYOCAR BRASILIENSE*CAMBESS) COMO AGENTE ESTRUCTURANTE

Resumen:

En el desarrollo de las nanocápsulas poliméricas con núcleo lipídico (LNC), la elección del aceite que formará el núcleo es crucial, ya que sus propiedades fisicoquímicas influyen en las características importantes de las nanopartículas, como la velocidad de liberación del fármaco, modificando su comportamiento en ambientes biológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. En este escenario, la elección de aceites vegetales para este propósito puede agregar actividad biológica al nanosistema. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad de las nanocápsulas desarrolladas con aceite de pequi (*Caryocar brasiliense*Cambess) (LNC_{PEQ}) o con triglicéridos de cadena media (LNC_{TCM}) como agentes estructurantes. Para esto, las células de la cepa V79 fueron expuestas a diferentes concentraciones de LNC y la viabilidad celular se evaluó mediante la actividad enzimática mitocondrial y cuantificación de la densidad celular. La curva de concentración-respuesta se utilizó para determinar la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50% (IC₅₀). Los datos obtenidos

demonstraron que la LNC que contiene TCM indujo una reducción del 50% en la viabilidad de las células V79 a una concentración de 5.6%, mientras que la LNC que contiene aceite de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) mostró el mismo efecto a una concentración de 10.3 %, lo que nos permite inferir que ambos nanosistemas alteraron la viabilidad celular, pero condujeron a una respuesta celular diferenciada, ya que la IC_{50} de LNC_{PEQ} es mayor que la IC_{50} de LNC_{TCM}. Resultado que puede estar asociado con la actividad biológica del propio aceite y la mayor viscosidad del aceite de pequi, que interfiere con el diámetro de las nanopartículas y su concentración en el medio (nanocápsulas.mL-1), causando menos citotoxicidad. Con base en estos datos, sugerimos que LNC_{PEQ} es un nanosistema promisorio para la incorporación de drogas.

Palabras clave:

Nanotecnología. Viabilidad celular. Aceite de pequi.

Introdução

A nanotecnologia é um campo de estudo multidisciplinar que tem como objetivo manipular a matéria em níveis moleculares e desenvolver dispositivos na escala nanométrica. A nanomedicina busca desenvolver nanopartículas, com aplicações médicas específicas, como diagnóstica e terapêutica (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; NIKALJE, 2015). Esse termo inclui nanopartículas inorgânicas, as nanopartículas lipídicas e as nanopartículas poliméricas (CONNIOT et al., 2014; DIMER et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas apresentam grande importância na área da saúde em virtude de serem sistemas coloidais que possuem interessantes propriedades físico-químicas, tais como o tamanho reduzido, ampla área superficial, carga superficial, tornando-as eficientes sistemas para aplicação na liberação controlada de fármacos (PUSHPALATHA; SELVAMUTHUKUMAR; KILIMOZHI, 2017; SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012). As nanopartículas poliméricas podem ser divididas em nanoesferas e nanocápsulas, que diferem entre si segundo a organização estrutural e composição. As nanoesferas são sistemas matriciais, onde o fármaco pode ficar retido e/ou adsorvido na matriz polimérica. Já as nanocápsulas são sistemas reservatórios constituídos por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico, sendo que o fármaco pode estar dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido a parede polimérica (GODOY; MONTALDI; SAKAMOTO-HOJO, 2016; SCHAFFAZICK et al., 2003).

A nanoencapsulação é um método eficiente, que resulta em suspensões contendo reservatórios com importante capacidade de armazenamento, sendo muito úteis na otimização da velocidade de liberação de fármacos lipofílicos, principalmente, uma vez que os mesmos apresentam baixa solubilidade em fluidos biológicos (LACATUSU et al., 2015).

As aplicações desses nanossistemas na área da saúde são possíveis graças a essas nanopartículas possuem dimensões inferiores as das células e semelhantes às de biomoléculas(SAALLAH; LENGGORO, 2018). Por este mesmo motivo, elas possuem maior facilidade no transporte através das barreiras biológicas, alcançando os sítios ativos com maior facilidade quando comparadas a outros sistemas ou ainda a molécula livre.

O óleo estruturante, agente lipofílico utilizado com a finalidade de compor e formar núcleo de nanocápsulas, deve ser cuidadosamente escolhido. Suas características de hidrofobicidade, viscosidade e tensão interfacial, influenciam nos parâmetros do nanossistema, como tamanho médio de partícula, polidispersão e perfil de liberação do fármaco(MORAHUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, é crucial avaliar se o polímero utilizado no desenvolvimento das nanocápsulas é inerte ao óleo estruturante, através da imersão de filmes poliméricos nesse componente e avaliação de sua massa ao longo do tempo(GUTERRES et al., 2000). Com maior frequência se utilizam triglicerídeos de cadeia média (TCM), como o ácido cáprico/caprílico(JORNADA et al., 2012), mas a utilização de diversos óleos vegetais já foi descrita(BENVEGNÚ et al., 2018; GEHRCKE et al., 2017; SANTOS et al., 2014; VENTURINI et al., 2016).

A utilização de óleos vegetais como alternativa ao uso do TCM fornece vantagem de agregar as atividades biológicas dos óleos ao nanossistema. Neste cenário, o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) é uma opção interessante para ser empregado como agente estruturante de um nanossistema, pois este apresenta diversas propriedades conhecidas, como seu potencial antioxidante e, dessa forma, é uma interessante opção de agente estruturante para desenvolvimento de nanoestruturas(COLOMBO et al., 2015; GOMES et al., 2018; PIRES et al., 2020; RAISER et al., 2018).

Deste modo, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico desenvolvidas utilizando óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) (LNC_{PEQ}) ou TCM (LNC_{TCM}) como agentes estruturantes sobre a viabilidade de culturas de células aderentes V79 e determinar a IC₅₀ destas formulações visando comparar a citotoxicidade e a aplicabilidade destes nanossistemas para incorporação de fármacos.

Materiais e Métodos

Materiais

Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess), Triglicerídeos de cadeia média (TCM, ácido cáprico/caprílico), Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (DMEM, Sigma-D5523), Ham's Nutrient Mixture F-12 (HAM F-12, Sigma-N6760), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-M5655), sulforrodamina B (SRB, Sigma-341738), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-D4540), estreptomicina (Sigma-S9137), penicilina G (Sigma-P3032), dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma-S5136), paraformaldeído (Sigma-P6148), soro fetal bovino (SFB, Gibco® 12657-029). Os outros reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

Obtenção do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess)

Os frutos utilizados neste trabalho foram coletados no município de Sinop, Mato Grosso (11°49'8,43"S -55°27'43,2" W), após atingirem a maturidade. A identificação botânica foi realizada pelo Herbário Centro-Norte-Mato-Grossense da Universidade Federal de Mato Grosso, sob o número de registro 6491.

O óleo de pequi foi obtido e caracterizado de acordo com PIRES e colaboradores(2020). Os frutos foram secos em estufa de circulação forçada a 40°C por 72h. Em seguida, o pequi foi triturado e submetido à extração com hexano na proporção de 1:5 (m/V) por 2h, utilizando ultrassom (USC-3300, Unique). Este extrato foi filtrado para remoção dos sólidos e o hexano foi completamente removido por evaporação rotativa (R3-Buchi) a 40°C e pressão reduzida de 600 mmHg. O acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado foi cadastrado no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o número A98B8A5.

Obtenção dos nanossistemas

As nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico foram desenvolvidas utilizando a metodologia de deposição interfacial do polímero pré-formado, de acordo com JÄGER e colaboradores(2009), dados apresentados em PIRES e colaboradores(2020).

Cultura celular

A linhagem de fibroblastos de pulmão de hamster chinês V79 foi cultivada em meio DMEM:HAM-F12 (1:1) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina e 100 U.mL^{-1} de penicilina G, pH 7,4 e mantidas a 37°C, de acordo com as instruções da ATCC (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)).

Avaliação da viabilidade celular

O ensaio do MTT baseia-se na redução mitocondrial do MTT a um produto insolúvel, de coloração arroxeadada, denominado formazan, permitindo inferir a viabilidade celular em decorrência da capacidade das células em metabolizar o MTT (MOSMANN, 1983).

Primeiramente, as células da linhagem V79 foram semeadas em placas de 96 poços, 1×10^4 células por poço. Após 24h, foram cultivadas com meio de cultura contendo 50, 250, 750 ou 3000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de TCM livre ou então 50 ou 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) livre. Na sequência, as células foram novamente semeadas seguindo as mesmas condições e cultivadas com meio contendo LNC_{TCM} ou LNC_{PEQ} em concentrações que variaram de 0,08 a 20 %.

Ao final do período de tratamento, o meio de cultura foi removido, as culturas foram lavadas com PBS e incubadas com MTT (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 2 horas. Após, o meio com MTT foi removido, as células foram lavadas, DMSO foram adicionados aos poços para solubilização dos cristais de formazan e a quantificação da absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Spectramax® 190, Molecular Devices) a 540 nm. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em viabilidade celular relativa (%), com 100 % representando culturas controle cultivadas apenas com o meio padrão.

Os dados obtidos ao expor as culturas as LNC foram utilizados para construção da curva concentração-resposta com a finalidade de calcular qual concentração leva à redução da viabilidade celular em 50 % (IC₅₀).

Avaliação da densidade celular

A sulforrodamina B se liga de forma estequiométrica aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas presentes nas células, sendo um indicador direto do conteúdo proteico e assim da quantidade de células (SKEHAN et al., 1990).

As células da linhagem V79 foram semeadas em placas de 96 poços, 1×10^4 células por poço. Após 24h as culturas receberam meio padrão acrescido de 0,4 ou 1,6 % de LNC_{TCM} ou LNC_{PEQ}. Ao final do tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4 % e incubadas com sulforrodamina B 0,4 % por 1 hora protegidas da luz. Após, os poços foram lavados com água destilada, a placa foi completamente seca e SDS a 1 % foi utilizado para quantificação da absorbância em leitor de microplacas (Spectramax[®] 190, Molecular Devices) a 560 nm. A absorbância obtida é linearmente proporcional à quantidade de células presentes ao poço da placa de cultura.

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados quanto a normalidade pelo teste Kolmogorov–Smirnov e as comparações estatísticas dos dados foram realizadas por análise de ANOVA de uma via, seguida por pós-teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média.

Resultados

Obtenção do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess)

Os frutos colhidos após a maturação apresentaram polpa amarelada, formas e tamanhos homogêneos e compuseram a matéria-prima para a obtenção do óleo. A identificação botânica, por meio de galhos, folhas, flores e frutos, confirmou que o pequi pertencente à espécie *Caryocar brasiliense* Cambess. Após a secagem, os frutos apresentaram aparência desidratada e oleosa.

O método de extração com hexano resultou em um rendimento de 38,48 % (m/m) e o óleo de pequi obtido apresentou viscosidade e manteve a coloração amarelo-alaranjada dos frutos.

Avaliação dos efeitos dos nanossistemas sobre parâmetros celulares

Inicialmente avaliou-se o efeito do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) e dos triglicerídeos de cadeia média (TCM), ambos livres, sobre a viabilidade das células da linhagem V79. Os dados obtidos demonstraram que o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) não exerceu efeitos sobre a viabilidade das células em todas as concentrações avaliadas, após 24h de tratamento (Figura1). Em relação ao TCM, verificou-se redução na viabilidade das células V79 em concentrações iguais ou superiores a 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, após 24h de tratamento. E esse efeito foi dependente da concentração, uma vez que 3.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de TCM apresentou maior citotoxicidade quando comparado a concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 2).

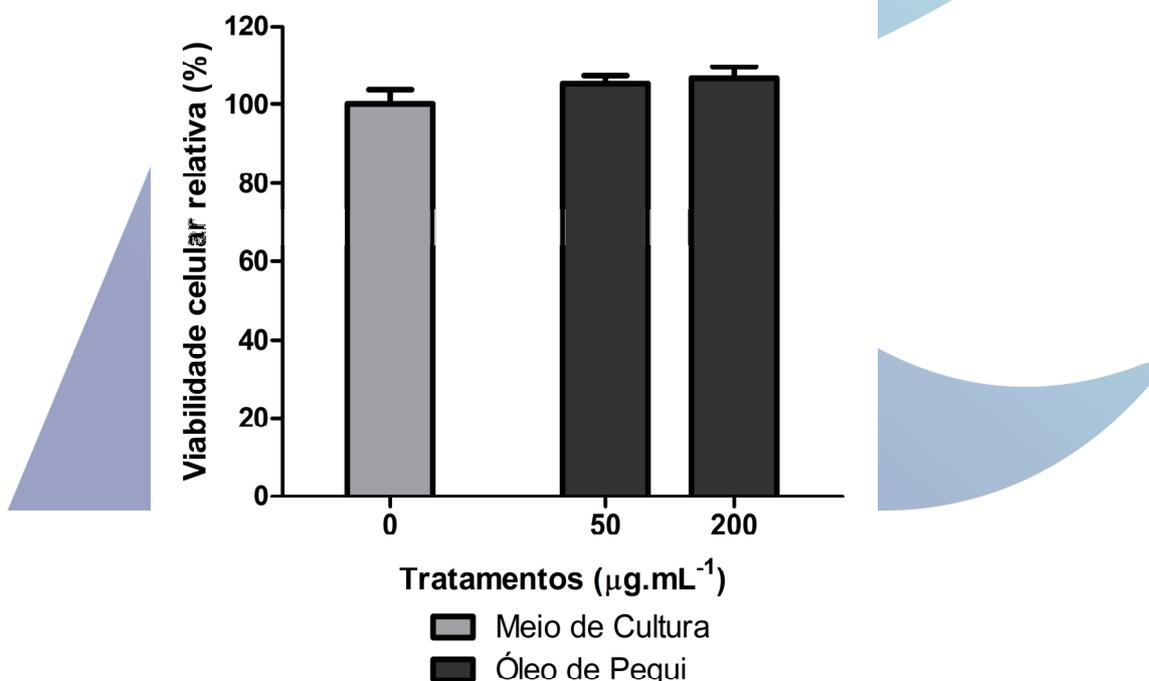


Figura 1. Viabilidade das células V79 na presença de meio de cultura padrão ou acrescido de 50 ou 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) livre, após 24h de tratamento. Os valores foram expressos em percentagem, utilizando meio padrão como controle (100 % de viabilidade celular). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo pós-teste de Tukey. Fonte: Acervo pessoal.

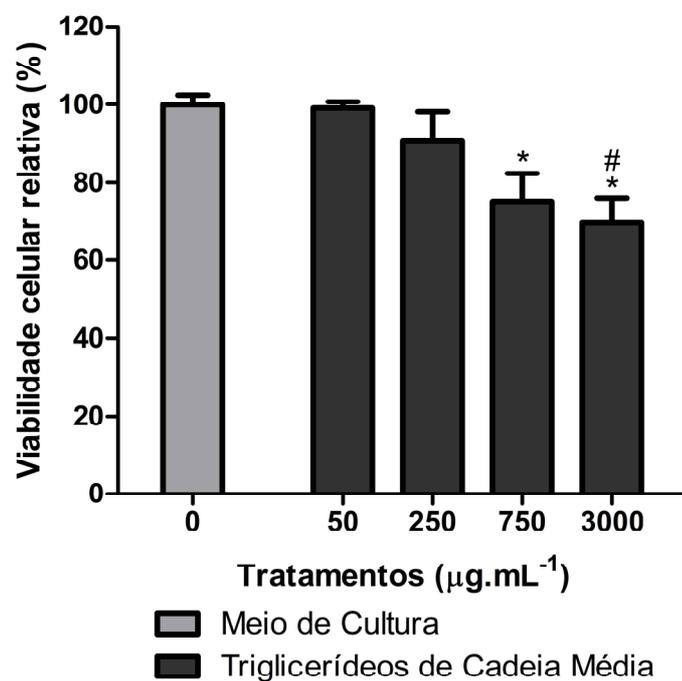


Figura 2. Viabilidade das células V79 na presença de meio de cultura padrão ou acrescido de 50, 200, 750 ou 3000 µg.mL⁻¹ de triglicerídeos de cadeia média (TCM) livre, após 24h de tratamento. Os valores foram expressos em percentagem, utilizando meio padrão como controle (100 % de viabilidade celular). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo pós-teste de Tukey. * Diferente do controle (p<0,05). # Diferente do grupo tratado com TCM na concentração de 50 µg.mL⁻¹ (p<0,05). Fonte: Acervo pessoal.

Na sequência avaliou-se o efeito do LNC_{TCM} e LNC_{PEQ} sobre a proliferação e viabilidade das células V79. Observou-se que após 24h de exposição às LNCs, as concentrações avaliadas não alteraram a proliferação celular (Figura 3).

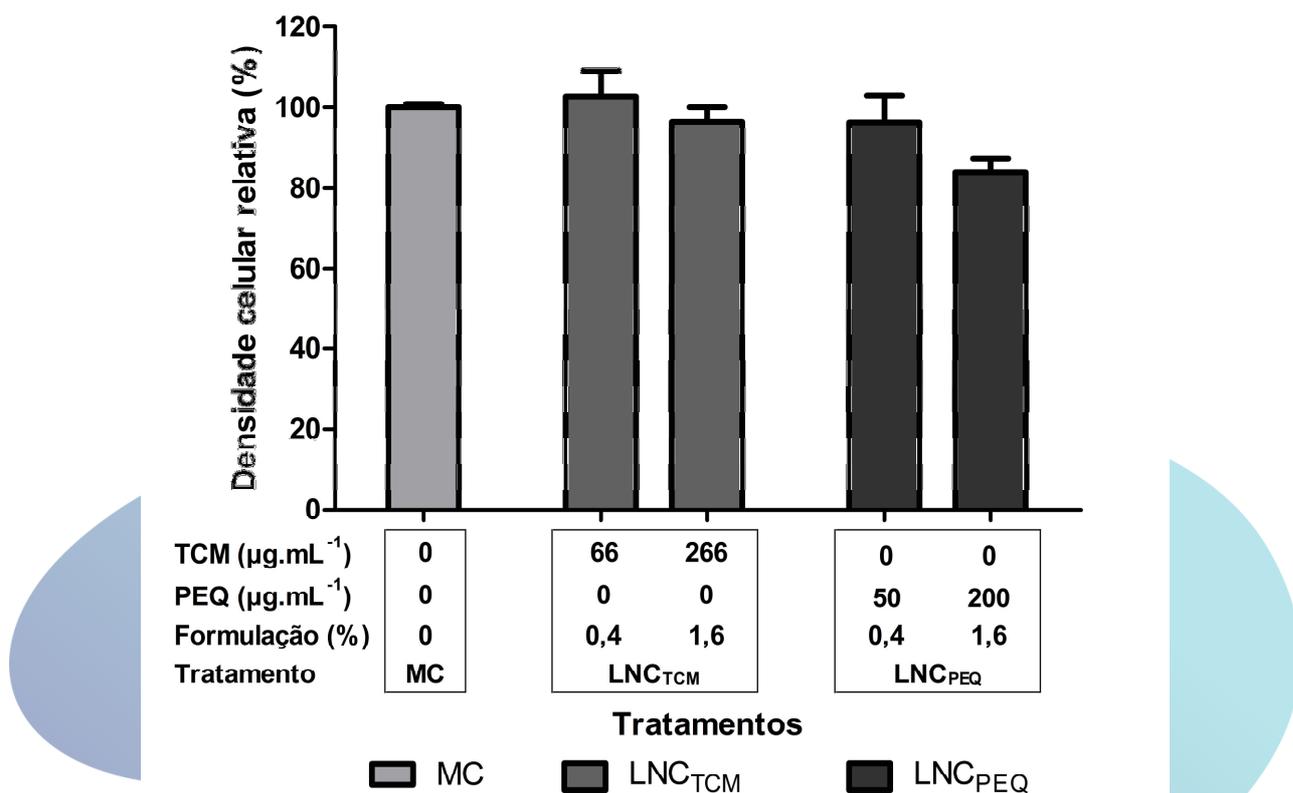


Figura 3. Densidade relativa de células após 24h de tratamento na presença de meio de cultura padrão ou acrescido de diferentes concentrações de LNC_{TCM} ou LNC_{PEQ}. Os valores foram expressos em porcentagem, utilizando meio de cultura (MC) como controle (100 % de densidade celular). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo pós-teste de Tukey. Fonte: Acervo pessoal.

No entanto, após 24h de tratamento das células com LNC_{TCM} a viabilidade reduziu na presença de concentrações a partir de 2,5 % (Figura 4) e LNC_{PEQ} em concentrações a partir de 0,62 % (Figura 5). Já após 72h de tratamento (Figura 6), tanto LNC_{TCM} como LNC_{PEQ} ocasionaram a redução desse parâmetro em todas as concentrações avaliadas ($\geq 0,08$ %), porém nos tratamentos contendo 0,4 ou 0,8 % LNC_{PEQ} resultou em menor efeito citotóxico, quando comparado à LNC_{TCM} ($p < 0,05$).

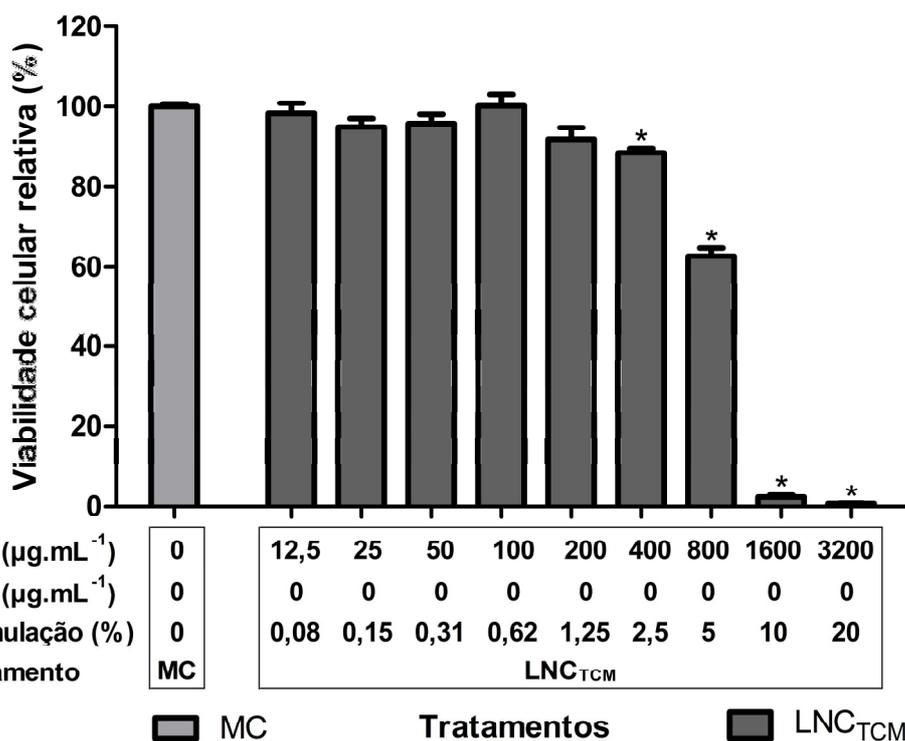


Figura 4. Viabilidade das células V79 após 24h de tratamento na presença de meio de cultura padrão ou acrescido de diferentes concentrações de LNC_{TCM}. Os valores foram expressos em percentagem, utilizando meio de cultura (MC) como controle (100 % de viabilidade celular). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo pós-teste de Tukey. * Diferente do controle ($p < 0,05$). Fonte: Acervo pessoal.

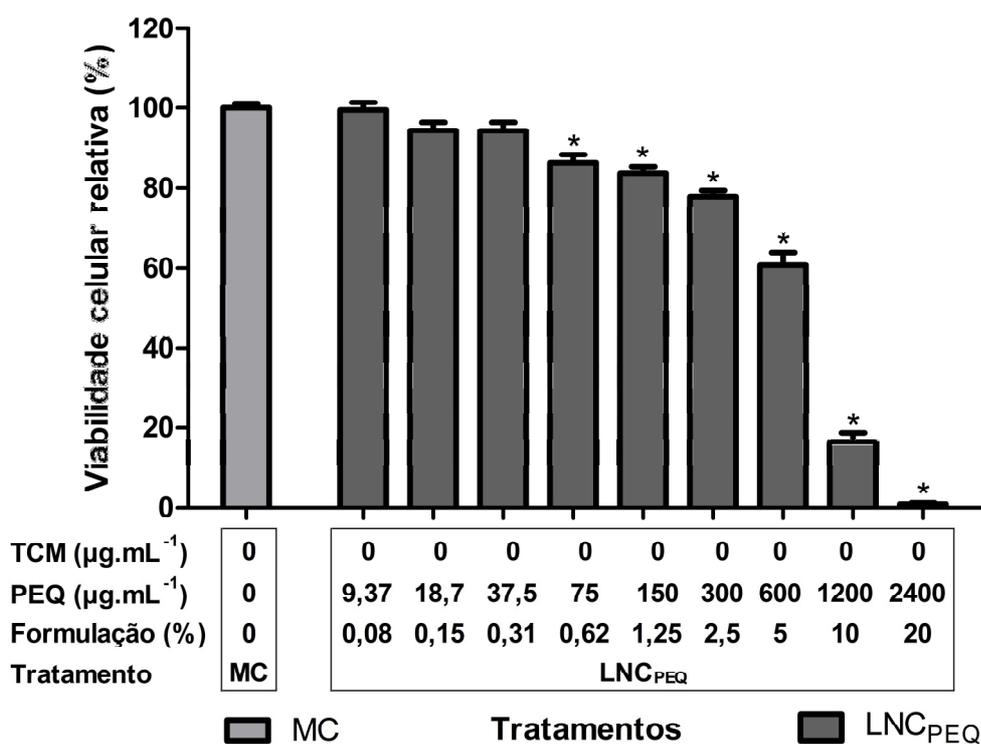


Figura 5. Viabilidade das células V79 após 24h de tratamento na presença de meio de cultura padrão ou acrescido de diferentes concentrações de LNC_{PEQ}. Os valores foram expressos em percentagem, utilizando meio de cultura (MC) como controle (100 % de densidade celular). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo pós-teste de Tukey. * Diferente do controle (p<0,05). Fonte: Acervo pessoal.

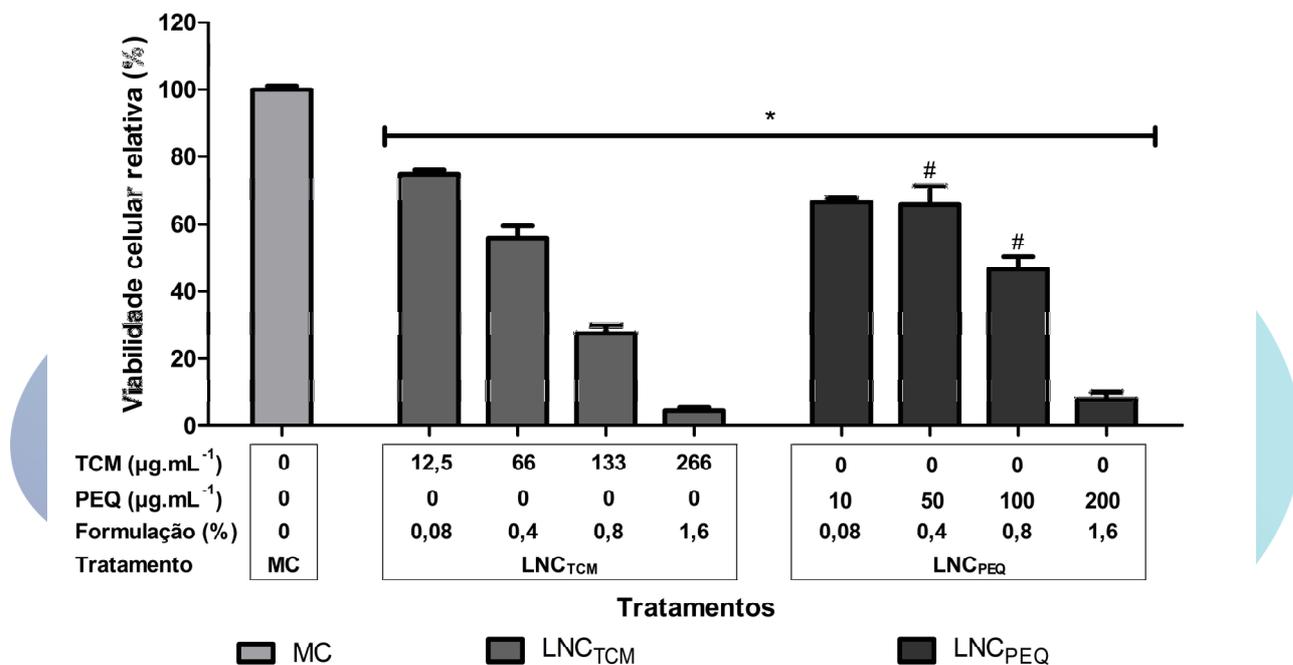


Figura 6. Viabilidade das células V79 após 72h de tratamento na presença de meio de cultura padrão ou acrescido de diferentes concentrações de LNC_{TCM} ou LNC_{PEQ}. Os valores foram expressos em percentagem, utilizando meio de cultura (MC) como controle (100 % de densidade celular). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguidos pelo pós-teste de Tukey. * Diferente do controle (p<0,05). # Diferente do grupo tratado com LNC_{TCM}, na mesma concentração (p<0,05). Fonte: Acervo pessoal.

De acordo com os dados obtidos nos ensaios realizados foi possível estimar em qual concentração da suspensão de LNC_{TCM} ou LNC_{PEQ}, presente no meio de cultivo, há redução de 50 % na viabilidade das células V79 (IC₅₀) (Figura 7). O LNC_{TCM} reduziu a viabilidade celular em 50 % na concentração de 5,6 % – IC_(95 %) = [5,3 %; 5,9 %] – enquanto LNC_{PEQ} reduziu a viabilidade celular em 50 % na concentração de 10,3 % – IC_(95 %) = [6,1 %; 17,2 %].

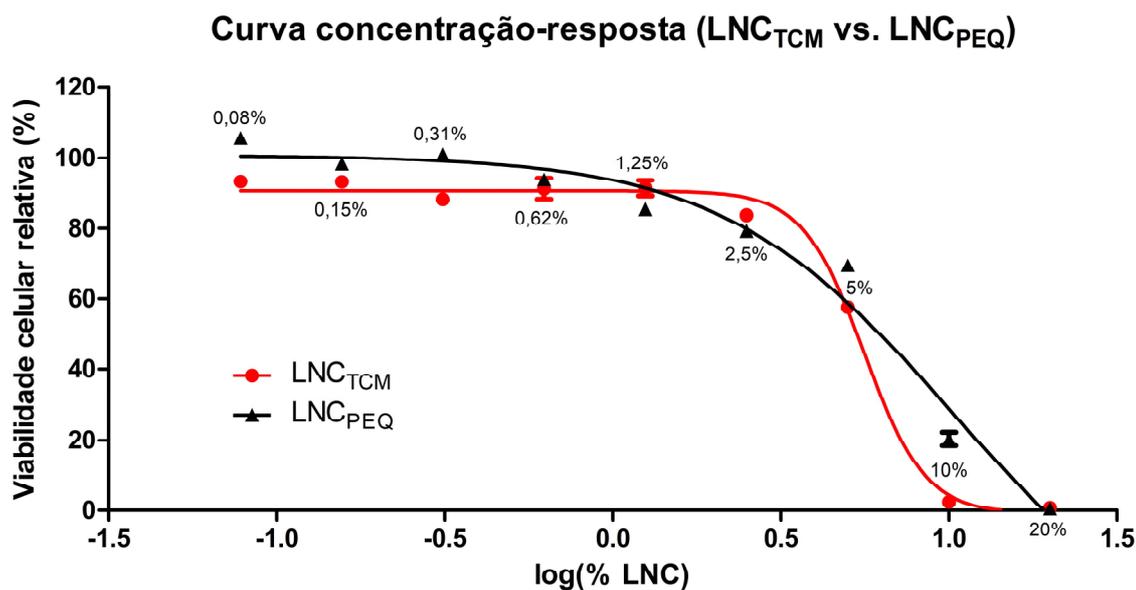


Figura 7. Curva concentração-resposta para as suspensões de nanocápsulas LNC_{TCM} ou LNC_{PEQ} em células V79. Os dados foram analisados por regressão não linear e pelo coeficiente de correlação de Pearson. Fonte: Acervo pessoal.

Discussão

A nanotecnologia é hoje uma ferramenta muito útil para melhora da biodisponibilidade de fármacos, direcionamento e ação farmacológica. Somado a isso, o pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) é um fruto encontrado em uma vasta região do Brasil; cujo óleo apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizante e quimioprotetora amplamente descritas na literatura (MONTALVÃO et al., 2016; PALMEIRA et al., 2016; PIRES et al., 2020; VALE et al., 2018). Além de favorecer a solubilização e, consequentemente, a nanoencapsulação de diferentes moléculas. Diante disso, neste estudo buscamos desenvolver nanocápsulas com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) como agente estruturante e avaliar a citotoxicidade em comparação a nanocápsulas desenvolvidas com TCM.

Citotoxicidade é o efeito nocivo que qualquer agente exerce sobre as células. Uma maneira de avaliar esse efeito é pela utilização de ensaios *in vitro* (SALIH ISTIFLI; TAHIR HÜSUNET; BASRI ILA, 2019). A linhagem celular V79 é amplamente utilizada em ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade por ser muito bem caracterizada, possuir cariótipo estável, rápida multiplicação, além de não expressar o citocromo P450 (BACANLI; BAŞARAN; BAŞARAN, 2015; LEÓN-MEJÍA et al., 2016), importante sistema enzimático responsável pela metabolização de xenobióticos (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

A LNC_{PEQ} levou à redução de 50 % da viabilidade celular em uma concentração cerca de 2 vezes maior, quando comparada a LNC_{TCM}. A influência do agente estruturante sobre o diâmetro e a polidispersão das LNC é descrita em literatura. O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) apresenta maior viscosidade (0,058 Pa·s) (VENTURINI et al., 2016) quando comparado ao TCM (0,025 Pa·s) e óleos mais viscosos resultam em LNC com diâmetro maior, conseqüentemente, resultando em menor número de nanocápsulas por mL (CONTRI et al., 2013).

Diversos trabalhos demonstram que as propriedades físico-químicas das nanopartículas estão relacionadas com seu efeito citotóxico e que as nanopartículas menores são mais nocivas do que as maiores, por apresentarem maior área de contato e por serem captadas mais facilmente para o ambiente intracelular (GUPTA; XIE, 2018; SUKHANOVA et al., 2018). Os efeitos observados em decorrência da exposição podem incluir genotoxicidade, citotoxicidade e necrose (GRIJALVA et al., 2018). Corroborando com essas informações, o trabalho realizado por MENDES e colaboradores (2015) demonstra que um maior número de nanopartículas por mL também resulta em aumento na citotoxicidade.

Ainda, a presença de diversos componentes com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias na composição do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) (COLOMBO et al., 2015; GOMES et al., 2018) e a liberação destes após período prolongado no meio de cultivo, também precisa ser considerada e isso pode ter tornado o ambiente mais favorável para as células, justificando menor citotoxicidade observada após 72h de exposição das culturas ao LNC_{PEQ} quando comparada a LNC_{TCM}.

Por mais que este trabalho apresente algumas limitações, como não quantificar a quantidade de nanopartículas presentes no ambiente intracelular ou a quantificação dos agentes estruturantes liberados pelas nanopartículas no meio de cultura, os dados obtidos nos permitem sugerir que o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) parece promissor como agente estruturante no desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico e apresenta vantagens quando comparado ao TCM, em função de suas características físico-químicas e atividade biológica que podem estar associadas a redução dos efeitos citotóxicos das LNC.

Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho corroboram com a literatura sobre utilização de triglicerídeos de cadeia média (TCM) como agente estruturante no desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) e demonstram a possibilidade de uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) com esta finalidade.

O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) não alterou, por si só, a viabilidade celular, porém o TCM sim. Além disso, os nanossistemas desenvolvidos a partir dos mesmos apresentam particularidades que levam a resposta celular diferenciada, indicando uma possível vantagem do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) sobre o TCM.

Agradecimentos

Os autores agradecem as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMAT pelo apoio financeiro e bolsas de mestrado e iniciação científica. Os autores também agradecem a Prof. Dr. Carmen Lúcia Bassi Branco do Laboratório de Investigação Científica da UFMT por gentilmente conceder as células da linhagem V79 para este estudo.

Referências

- BACANLI, M.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. Cytotoxicity Evaluation of Some Phenolic Compounds in V79 Cells. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 53–61, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.5505/tjps.2015.25744>>.
- BENVEGNÚ, D. M. et al. Effects of Fish and Grape Seed Oils as Core of Haloperidol-Loaded Nanocapsules on Oral Dyskinesia in Rats. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 2, p. 477–487, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-017-2444-0>>.
- BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, 2011. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00598930>>.
- COLOMBO, N. B. R. et al. Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 852–862, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1414-431X20154467>>.

CONNIOT, J. et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 218–225, 26 nov. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00105>>.

CONTRI, R. V. et al. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: Influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 7–8, p. 913–924, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17458080.2011.620019>>.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013001000007>>.

GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 74, p. 279–286, maio 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.006>>.

GODOY, P. R. D. V.; MONTALDI, A. P. L.; SAKAMOTO-HOJO, E. T. HEB silencing induces anti-proliferative effects on U87MG cells cultured as neurospheres and monolayers. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 6, p. 5253–5260, dez. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5877>>.

GOMES, D. J. et al. Possibilidades de uso de Caryocar brasiliense numa perspectiva farmacológica. **Revista de Agroecologia no Semiárido**, v. 2, n. 1, p. 13–20, 2018. Disponível em: <<http://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/ras/article/view/1998>>.

GRIJALVA, M. et al. Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Nanomaterials on Cancer Cell Lines: A Review. **Unraveling Saf. Profile Nanoscale Part. Mater. - From Biomed. to Environ. Appl.** [S.l.]: InTech, 2018. v. i. p. 13. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/intechopen.71685>>.

GUPTA, R.; XIE, H. Nanoparticles in Daily Life: Applications, Toxicity and Regulations. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 37, n. 3, p. 209–230, 2018. Disponível em: <<http://www.dl.begellhouse.com/journals/0ff459a57a4c08d0,2f0b91ba0949bdaf,0972d8736b668842.html>>.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(rac-lactide) nanocapsules containing diclofenac: protection against muscular damage in rats. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 11, n. 12, p. 1347–1355, 2 jan. 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1163/156856200744372>>.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>>.

JÄGER, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130–140, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1004>>.

JORNADA, D. S. et al. Lipid-core nanocapsules: Mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, n. 24, p. 6646–6655, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c2sm25754h>>.

LACATUSU, I. et al. Lipid nanocarriers based on natural oils with high activity against oxygen free radicals and tumor cell proliferation. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, p. 88–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.019>>.

LEÓN-MEJÍA, G. et al. Cytotoxicity and genotoxicity induced by coal and coal fly ash particles samples in V79 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 23, p. 24019–24031, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7623-z>>.

MENDES, L. P. et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1268–1274, set. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.021>>.

MONTALVÃO, T. M. et al. Anti-inflammatory Effect of Antioxidant Pequi (Caryocar Brasiliense) Oil Capsules and Antioxidant Effect of Vitamin D and Physical Activity on Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Journal of Rheumatic Diseases and Treatment**, v. 2, n. 1, 31 mar. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.23937/2469-5726/1510029>>.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)>.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 1–3, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>>.

PALMEIRA, S. M. et al. Chemopreventive effects of pequi oil (Caryocar brasiliense Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 4, p. 299–305, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000187>>.

PIRES, J. et al. Healing of dermal wounds property of Caryocar brasiliense oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105356>>.

PUSHPALATHA, R.; SELVAMUTHUKUMAR, S.; KILIMOZHI, D. Nanocarrier mediated combination drug delivery for chemotherapy – A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 362–371, jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.019>>.

RAISER, A. L. et al. Stability and potential antioxidant activity essay of pequi oil (Caryocar brasiliense Camb.) in cosmetic emulsions. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 37, n. 1, p. 144–151, 2018.

SAALLAH, S.; LENGGORO, I. W. Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 2018, n. 35, p. 89–111, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.14356/kona.2018015>>.

SALIH ISTIFLI, E.; TAHIR HÜSUNET, M.; BASRI ILA, H. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. **Cytotox. - Defin. Identification, Cytotoxic Compd.** [S.l.]: IntechOpen, 2019. . Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/cytotoxicity-definition-identification-and-cytotoxic-compounds/cell-division-cytotoxicity-and-the-assays-used-in-the-detection-of-cytotoxicity>>.

SANTOS, S. S. et al. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.011>>.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>>.

SELVAMUTHUKUMAR, S.; VELMURUGAN, R. Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-159>>.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>> .

SUKHANOVA, A. et al. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 1, p. 44, 7 dez. 2018. Disponível em: <<https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-018-2457-x>>.

VALE, A. F. et al. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 257–262, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.180015>>.

VENTURINI, C. G. et al. Vegetable Oil-Loaded Nanocapsules: Innovative Alternative for Incorporating Drugs for Parenteral Administration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 2, p. 1310–1320, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11666>> .