



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO PEDRO VIANA RODRIGUES

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS LIPOSSOMAIS CONTENDO DERIVADOS DE QUINOXALINAS COMO AGENTES ANTITUMORAIS

FORTALEZA

2017

JOÃO PEDRO VIANA RODRIGUES

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS LIPOSSOMAIS CONTENDO DERIVADOS DE QUINOXALINAS COMO AGENTES ANTITUMORAIS

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Nicolete

FORTALEZA

2017

JOÃO PEDRO VIANA RODRIGUES

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA, DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS LIPOSSOMAIS CONTENDO DERIVADOS DE QUINOXALINAS COMO AGENTES ANTITUMORAIS

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Nicolete (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - CE)

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter conduzido meus passos até aqui.

A meus pais, Ivanice e Rogério, que sempre me apoiaram incondicionalmente, e em minhas vitórias, são os espectadores mais ávidos.

A minhas irmãs - Jane, Cristiane e Iziane, por todo o apoio e companheirismo durante toda minha vida. Aos meus cunhados – Henrique, Wilson e Jota, por agregarem a minha família, e aos meus sobrinhos – Thiago, Gabriel, Ruth, Rafael, Esther, Guilherme e Valentina, por tornarem meus dias mais alegres.

A minha família – avós, tios, tias e primos, pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Roberto Nicolete, pelo apoio, paciência, confiança, presteza em ensinar-me e responder minhas dúvidas.

Ao Colégio da Polícia Militar, pela minha formação e disciplina.

A Universidade Federal do Ceará, por ter me recebido de braços abertos e ter me oferecido subsídio e infraestrutura para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Coordenação do Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, pela apoio e confiança, onde encontrei espaço para desenvolver-me tanto nas disciplinas, quanto nos projetos de extensão, em nome da Profa. Cristina Paiva da Silveira e da Profa. Márjory de Lima Holanda, mas estendendo-se a todos os coordenadores que já passaram pelo curso, em especial a Profa. Dirce Fernandes, idealizadora do curso.

Ao Gilmar, secretário do Curso de Bacharelado em Biotecnologia, pela solicitude em prestar assistência e solucionar os problemas.

A Chefia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela infraestrutura do bloco, o zelo, e por abrigar-me nos últimos cinco anos e representar um lugar acolhedor.

A todos professores do Colegiado do Curso de Bacharelado em Biotecnologia e todos professores que participaram de minha formação, em especial, a Profa. Ana Lúcia Ponte, por ter confiado em mim para gerir o PIQD e a AUG biotec, bem como o Prof. André Luís Coelho da Silva, por ter sido meu primeiro orientador e ter me iniciado na pesquisa científica.

Aos meus colegas de curso, por dividirem comigo, durante esses cinco anos, alegrias, felicidades, angústias e dúvidas da vida acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório – Ricardo, Vanessa e Geraldo, por compartilharem comigo o desenvolvimento desse trabalho e o cotidiano do laboratório.

A Profa. Cláudia do Ó Pessoa e ao Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, por ceder o Laboratório de Oncologia Experimental – LOE, para o desenvolvimento de minha pesquisa, e a todos os laboratoristas que o compõem.

A Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/CE pelos préstimos e por me oferecer subsídio para meu desenvolvimento científico-profissional.

A Profa. Luzia Kalyne e a todos colaboradores do Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos pelo apoio com os ensaios utilizando o Zeta Sizer, em especial a Elizama e a Thalia.

A EMBRAPA Agroindústria Tropical, em especial ao Prof. Guilherme Julião Zocolo, e aos farmacêuticos Edy Ribeiro e Paulo Riceli, pela colaboração com a cromatografia líquida.

A todas agências de fomento que me ofereceram subsídio durante minha graduação, para minha formação, e para o desenvolvimento dessa pesquisa, CNPq e CAPES, em especial a FUNCAP.

A todos, que direta ou indiretamente, me auxiliaram na consecução das minhas metas mas que aqui não foram recordados, o meu muito obrigado.

*“Sê todo em cada coisa.
Põe o quanto és no mínimo que fazes”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Sistemas de liberação modificada de drogas são preparações farmacêuticas com forte apelo vanguardista em área de fronteira do conhecimento. O trabalho prestou-se a realizar levantamento bibliográfico, busca de anterioridades, desenvolver e caracterizar nanopartículas lipossomais padrão. O levantamento e a prospecção foram realizados em bancos nacionais e internacionais. Escolheu-se palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por tecnologias relacionadas aos lipossomas. Na preparação dos lipossomas foram utilizados dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) e colesterol (COL). Os componentes foram dissolvidos em solução clorofórmio/metanol. Os solventes foram evaporados e a preparação foi mantida em dessecador overnight. Após resuspendeu-se o preparado, formando uma emulsão. A emulsão foi submetida ao extrusor para produzir uma população de lipossomas similar. A determinação do tamanho de partícula foi realizada a através de medidas de espalhamento de luz dinâmico. A distribuição do tamanho de partícula é obtida pelo índice de polidispersão. As medidas do potencial zeta médio das partículas foram realizadas pela técnica de microeletroforese. Para a quantificação do material encapsulado, utilizou-se cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-QToF-MSE). Constatou-se que não uma correlação clara entre artigos publicados e patentes depositadas, embora haja muito mais artigos publicados que patentes depositadas e que o Brasil ainda possui uma produção inconsistente em artigos e patentes sobre lipossomas. A caracterização mostrou populações monodispersas de partículas de pequenas dimensões de 185.46 ± 3.76 nm, apresentando índice de polidispersão de 0.48 ± 0.01 . Os lipossomas permaneceram com um tamanho médio de 200 nm. O potencial zeta que foi de -40.9 ± 0.96 mV, representa a carga negativa residual sobre a superfície das partículas. Os resultados obtidos na microscopia de força atômica e de varredura corroboraram os ensaios prévios para atestar o tamanho do lipossoma e permitiu constatar seu formato esférico. A consistência dos resultados obtidos a partir do método estabelecido endossa sua efetividade e eficácia. A natureza lipofílica e o tamanho dos lipossomas obtidos figuram na mesma escala de tamanho das macromoléculas biológicas - ácidos nucléicos, proteínas, etc - permitem uma integração entre a nanotecnologia e a biologia, levando a avanços na utilização destes como veículos de *drug delivery* para estratégias passivas e ativas de seletividade.

Palavras-chave: Nanopartículas, nanotecnologia e lipossomas

ABSTRACT

Modified drug release systems are pharmaceutical preparations with strong avant-garde appeal in the frontier area of knowledge. The work was carried out to perform bibliographical research, search for anteriorities, develop and characterize standard liposomal nanoparticles. The survey and the prospection were carried out in national and international banks. Keywords were chosen that could help refine the search for liposome-related technologies. In the preparation of the liposomes dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) and cholesterol (COL) were used. The components were dissolved in chloroform / methanol solution. The solvents were evaporated and the preparation was kept in an overnight dessicator. After the preparation was resuspended, it formed an emulsion. The emulsion was subjected to the extruder to produce a similar population of liposomes. Particle size determination was performed through dynamic light scattering measurements. The particle size distribution is obtained by the polydispersity index. The measurements of the mean zeta potential of the particles were performed by the microelectrophoresis technique. For quantification of the encapsulated material, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-QToF-MSE) was used. It has been found that there is not a clear correlation between published articles and deposited patents, although there are many more published articles than patents deposited and that Brazil still has inconsistent production on articles and patents on liposomes. The characterization showed monodisperse populations of small particles of 185.46 ± 3.76 nm, with a polydispersity index of 0.48 ± 0.01 . The liposomes remained with an average size of 200 nm. The zeta potential was -40.9 ± 0.96 mV, representing the residual negative charge on the surface of the particles. The results obtained in the atomic force and scanning microscopy corroborated the previous tests to verify the size of the liposome and allowed to verify its spherical shape. The consistency of the results obtained from the established method endorses its effectiveness and effectiveness. The lipophilic nature and size of the liposomes obtained appear in the same size scale of the biological macromolecules - nucleic acids, proteins, etc. - allow an integration between nanotechnology and biology, leading to advances in the use of these as drug delivery vehicles for passive strategies and active selectivity.

Keywords: Nanoparticles, nanotechnology and liposomes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação esquemática dos vários tipos de lipossoma, mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa.....	21
Figura 2	– Esquema representativo dos parâmetros utilizados para caracterização de lipossomas	22
Figura 3	– Representação esquemáticas da metodologia de preparação dos diferentes tipos de lipossomas	22
Figura 4	– Estrutura química da molécula de quinoxalina	26
Figura 5	– Síntese de quinoxalina pela condensação de um aril 1,2-diamina com um composto 1,2-dicarbonil	27
Figura 6 -	– Derivados de quinoxalina preparados a partir de cinamil	27
Figura 7	– Síntese verde eficiente dos derivados de quinoxalina	27
Figura 8	– Núcleos quinoxalínicos que apresentam potencial atividade anticancer	29
Figura 9	– Estrutura química da molécula de PJOV56, derivado de quinoxalina	35
Figura 10	– Preparação dos sistemas nanoestruturados	36
Figura 11	– Esquema do funcionamento de um aparelho Zeta Sizer ZS Malvern	37
Figura 12	– Esquema do funcionamento de um microscópio de força atômica	38
Figura 13	– Esquema do funcionamento de um microscópio de eletrônico de varredura ...	40
Figura 14	– Densidade do número de artigos publicados sobre lipossomas por país	51
Figura 15	– Número de patentes depositadas no banco USPTO por países	54
Figura 16	– Patente de responsabilidade da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)	62
Figura 17	– Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da amostra de lipossomas em mica	68
Figura 18	– Análise da superfície de lipossoma da amostra, mostrando deformidades moderadas em sua superfície	69
Figura 19	– Micrografias eletrônicas de varredura mostrando os lipossomas esféricos, em diferentes magnificações	70
Figura 20	– Cromatograma representando pico de absorvância de PJOV56 (8.55 minutos) detectado no sobrenadante das vesículas lipossomais	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados numéricos e percentuais do levantamento bibliográfico utilizando-se diferentes iscas e combinações destas com o uso de modificadores de busca	48
Gráfico 2 – Relação do número de artigos por ano de publicação	48
Gráfico 3 – Relação do número de artigos publicados sobre lipossomas com áreas do conhecimento	49
Gráfico 4 – Relação do número de artigos publicados sobre lipossomas por país	50
Gráfico 5 – Número de patentes depositadas no banco USPTO por países	53
Gráfico 6 – Número de patentes depositadas no banco USPTO por ano	55
Gráfico 7 – Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por palavra-chave	56
Gráfico 8 – Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por ano	57
Gráfico 9 – Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por país	58
Gráfico 10 – Distribuição de patentes segundo o IPC (International Patent Classification)	59
Gráfico 11 – Subdivisão de patentes em uma macro-área segundo o IPC (International Patent Classification)	60
Gráfico 12 – Nacionalidade dos Inventores das patentes depositadas no EPO (European Patents Office) até dezembro de 2016	61
Gráfico 13 – Nacionalidade dos Depositantes das patentes depositadas no EPO (European Patents Office) até dezembro de 2016	61
Gráfico 14 – Número de patentes depositadas no banco de dados Web of Science por ano	63
Gráfico 15 – Número de patentes depositadas no INPI por palavra-chave	65
Gráfico 16 – Curva analítica de PJOV56 em plasma obtida para a faixa de concentração de 100 a 1000 ng/ml	71
Gráfico 17 – Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LIQ) de PJOV56	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do levantamento bibliográfico utilizando-se diferentes iscas e combinações destas com o uso de modificadores de busca	47
Tabela 2 – Ranking dos autores, nacionalidades e número de artigos publicados sobre lipossomas	51
Tabela 3 – Número de patentes depositadas no USPTO, desde 1976	52
Tabela 4 – Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por palavra-chave	55
Tabela 5 – Número de patentes depositadas no banco de dados Web of Science utilizando diferentes palavras chaves	63
Tabela 6 – Relação entre os 10 principais inventores de patentes utilizando as palavras chaves “lipossom” e “nano” e “therapy” e a quantidade de patentes concedidas	64
Tabela 7 – Número de patentes depositadas no INPI por palavra-chave até dezembro de 2016	65
Tabela 8 – Número de patentes depositadas no INPI por período de tempo	66
Tabela 9 – Patentes depositadas no INPI por período de tempo utilizando as palavras chaves “lipossom*” e "nano" e "terapia"	66
Tabela 10 – Resultado do tamanho vesicular, quociente de dispersividade (PI) e potencial zeta	67
Tabela 11 – Precisão e exatidão no ensaio do método analítico de PJOV56	71
Tabela 12 – Limites de detecção e quantificação do método de análise de PJOV 56	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

abst	Abstract
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BR	Brasil
CA	Canadá
CEFAC	Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos
CIP	Classificação Internacional de Patentes
CN	China
COL	Colesterol
CQL	Linguagem de Consulta contextual
CV	Covariância
D	Determinante
DE	Alemanha
di	Desvio vertical de cada ponto
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DMEM	Meio de cultura celular
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPS	Dipalmitoilfosfatidilserina
EPO	European Patent Office
ESI	Ionização por eletrospray
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FR	França
GB	Inglaterra
GOV	Giant Oligolamellar Vesicle
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
HIV	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HTS	High-throughput System
IC ₅₀	Inhibition Concentration
ICN	Inventor Code Number
IN	Índia
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IP	Índice de Polidispersão
IP	Íons Percussores
ISI	Institute for Scientific Information
IT-ToF	Captura de Íon por Tempo de Voo
JP	Japão
JPO	Japanese Patent Office
KR	Coreia
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LID	Limite Inferior de Detecção
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
LOV	Large Oligolamellar Vesicle
LQ	Limite de Quantificação

LUV	Large Unilamellar Vesicle
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
MLV	Multilamellar Vesicle
MRMS	Espectrometria de Massas de Massa Moderada
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa <i>in tandem</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
MUV	Medium-sized Unilamellar Vesicle
MVL	Multivesicular Liposome
n	Número total de pontos na curva
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OLV	Oligolamellar Vesicle
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão Fosfato Salino
PEG	Polietilenoglicol
PL	Perda Neutra
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
QToF	Triplo-Quadrupolo por Tempo de Voo
RPMI	Meio de cultura celular
Sa	Desvio-padrão do coeficiente angular
Sb	Desvio-padrão do coeficiente linear
SD	Desvio-padrão
SOV	Small Oligolamellar Vesicle
SRE	Sistema Reticuloendotelial
SUV	Small Unilamellar Vesicle
Sy	Desvio-padrão no eixo y
ToF	Tempo de Voo
ttl	Título
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UK	United Kingdom
US	United States of America
USPTO	United States Patent and Trademark Office
WHO	World Health Organization
xi	Valor individual de x

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μN	Micronewton
C ₂ H ₃ N	Acetonitrila
CH ₂ O ₂	Ácido Fórmico
CO ₂	Gás carbônico
Da	Dalton
GI ₅₀	Inibition Growth
h	Horas
H ₂ O	Água
Hz	Hertz
kV	Kilovolts
L	Litro
M	Molar
m/z	Massa/Carga
mbarr	Microbarr
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetros
N.m ⁻¹	Newton por metro
N ₂	Nitrogênio
nm	Nanômetros
pH	Potencial Ácido
rpm	Rotações por minutos
™	<i>Trademark</i>
US\$	Dólar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	Considerações gerais	14
1.2.	Patentes	16
1.2.1.	<i>Web of Science - WoS</i>	16
1.2.2.	<i>United States Patent and Trademark Office – USPTO</i>	17
1.2.3.	<i>European Patent Office – ESPACENET</i>	18
1.2.4.	<i>Instituto Nacional de Propriedade Intelectual – INPI</i>	18
1.3.	Nanotecnologia	19
1.4.	Lipossomas	20
1.4.1.	<i>Estrutura e preparação dos lipossomas</i>	20
1.4.2.	<i>Aplicação dos lipossomas</i>	23
1.4.3.	<i>Lipossomas como transportadores de fármacos</i>	23
1.5.	Quinoxalinas	26
1.5.1.	<i>Síntese de quinoxalinas e seus derivados</i>	26
1.5.2.	<i>Aplicação de quinoxalinas e seus derivados</i>	27
1.5.3.	<i>Atividade anticâncer de quinoxalina e seus derivados</i>	28
2.	OBJETIVO	30
2.1.	Objetivo geral	30
2.2.	Objetivos específicos	30
3.	METODOLOGIA	31
3.1.	Levantamento bibliográfico	31
3.1.1.	<i>Busca na plataforma Web of Science</i>	31
3.2.	Prospecção tecnológica	32
3.2.1.	<i>Busca de patentes no USPTO</i>	32
3.2.2.	<i>Busca de patentes no EPO/ESPACENET</i>	33
3.2.3.	<i>Busca de patentes no Web of Science – WoS</i>	33
3.2.4.	<i>Busca de patentes no INPI</i>	34
3.3.	Moléculas utilizadas no estudo	35
3.4.	Preparação dos sistemas nanoestruturados	35
3.5.	Caracterização físico-química dos sistemas de liberação modificados	36
3.5.1.	<i>Tamanho vesicular, índice de polidispersão e potencial zeta médio</i>	36
3.5.2.	<i>Microscopia de Força Atômica – MFA</i>	37
3.5.3.	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	39
3.5.4.	<i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – CLUE</i>	40
3.5.4.1.	<i>Preparação das amostras</i>	40
3.5.4.1.1.	PJOV em solução	40
3.5.4.1.2.	Rompimento da vesícula lipossomal	41
3.5.4.2.	<i>Condições experimentais</i>	41
3.5.4.3.	<i>Validação do método analítico</i>	43

3.5.4.3.1.	Seletividade	44
3.5.4.3.2.	Linearidade	44
3.5.4.3.3.	Precisão	45
3.5.4.3.4.	Repetibilidade	46
3.5.4.3.5.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação – LD e LQ	46
4.	RESULTADOS	47
4.1.	Levantamento bibliográfico	47
4.2.	Prospecção tecnológica	52
4.2.1.	<i>Busca no USPTO</i>	52
4.2.2.	<i>Busca no EPO/ESPACENET</i>	55
4.2.3.	<i>Busca na Web of Science</i>	62
4.2.4.	<i>Busca no INPI</i>	65
4.3.	Tamanho vesicular, índice de polidispersão e potencial zeta médio	67
4.4.	Microscopia de Força Atômica – MFA	67
4.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	69
4.6.	Curva de calibração e taxa de encapsulamento de PJOV56	70
5.	CONCLUSÃO	74
6.	PERSPECTIVAS	76
7.	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

À medida em que os processos de transição demográfica e epidemiológica se desenvolvem no Brasil e no mundo, as neoplasias vêm se tornando rapidamente uma das principais causas de morbimortalidade. O perfil de morbimortalidade pode ser considerado um indicador relativo, tendo certo grau de sensibilidade e variabilidade, pois é influenciado pelas condições de vida e pelo desenvolvimento de cada população, sendo o resultado da interação entre diversos fatores interdependentes. O declínio da fecundidade e a queda da mortalidade contribuíram para alterações na estrutura populacional, com progressivo envelhecimento da população e aumento na esperança de vida ao nascer. Os modelos de produção econômica e de reprodução humana se relacionam e assim, determinam a estrutura demográfica e econômica de uma população (taxas de fertilidade, mortalidade e migração). Além dos citados acima, os fatores ambientais e socioculturais deverão ser considerados na construção deste perfil, sendo impossível a dissociação entre o nível de mortalidade de sua estrutura e sua relação direta com fatores históricos, socioeconômicos, demográficos e ambientais (PRATA, 1992).

Tais mudanças, geraram queda na mortalidade pelas doenças infecciosas e parasitárias, ao mesmo tempo em que se verificou um aumento na proporção de mortes atribuídas às doenças cardiovasculares, causas externas e neoplasias. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), somente no ano de 2012, 14,1 milhões pessoas foram diagnosticadas com câncer e 8,2 milhões morreram por conta dessa doença. Em comparação ao ano de 2008, houve um aumento em 11,0% e 7,9%, no número de novos casos e óbitos, respectivamente. Os cânceres mais comumente diagnosticados em 2012 foram os de pulmão (1,8 milhão, 12,8% do total), mama (1,7 milhão, 12,1%) e colorretal (1,4 milhão, 9,9%). Ainda segundo a OMS, mais da metade de todos cânceres diagnosticados (56,8%) e os óbitos por câncer em 2012 (64,9%) ocorreram em regiões menos desenvolvidas do mundo, e essas proporções irão aumentar ainda mais devido ao crescimento e envelhecimento da população e aumento da prevalência de fatores de risco conhecidos (WHO, 2014). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foram estimados aproximadamente 596 mil casos novos de câncer até o fim do ano de 2016. Foram 295.200 mil novos casos para o sexo masculino e 300.800 mil para o sexo feminino, sendo o câncer de pele do tipo não melanoma o mais

incidente (175.760 mil casos novos) (INCA, 2016).

Com relação à busca de novos compostos de origem sintética para a terapia antitumoral, a quinoxalina é o nome dado à unidade heterocíclica oriunda da fusão de unidades benzênicas e pirazínicas, de caráter aromático, como consequência da deslocalização de um sistema contendo dez elétrons π , com cada átomo da estrutura bicíclica colaborando com um elétron π (em orbitais p), e tendo ainda, cada nitrogênio, um par de elétrons livre em orbitais sp^2 . Diferente do naftaleno, a presença de dois átomos de nitrogênio no sistema quinoxalínico induz a um maior caráter polar nas ligações químicas, o que torna as interações intermoleculares mais fortes que seus parentes hidrocarbonetos, que, como consequência, fornece estabilidade térmica a seus derivados. Os derivados de quinoxalina desempenham importante papel em áreas de âmbitos biológico e tecnológico (VIEIRA et al., 2014). Diversos estudos constataam a importância da unidade quinoxalínica para uma série de atividades biológicas, incluindo atividade anticâncer, com exemplos de moléculas efetivas no combate a células tumorais sendo postuladas como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento desta doença (WU et al., 2012). Outras atividades relatadas são anti-HIV, antibacteriana, antifúngica, antituberculose, propriedades anti-inflamatórias e antiprotozoária também são exploradas por atuarem como clivadores do DNA (TOSHIMA et al., 2014).

Sistemas de liberação modificada de drogas são preparações farmacêuticas com forte apelo vanguardista em área de fronteira do conhecimento e com grande potencial para modificação das propriedades farmacológicas de fármacos e outros compostos para fins terapêuticos. Os lipossomas são vesículas esféricas formadas basicamente por substâncias anfifílicas que se associam espontaneamente na forma de bicamadas contendo no centro uma cavidade aquosa. Geralmente são formados por fosfolípides de origem natural, sintética ou semi-sintética e possuem grande potencialidade para o transporte de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas (LASIC et al., 1998). Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas, *per se*, são estruturas versáteis com características de reduzir potenciais toxicidades das substâncias (KALYANKAR et al., 2010).

As drogas convencionais usadas no tratamento do câncer são distribuídas de um modo não-específico pelo organismo, atingindo tanto as células cancerosas como as células saudáveis, o que impõe um limite para sua dosagem por conta de sua citotoxicidade. Tal limite, por sua vez, faz com que o tratamento da doença produza efeitos aquém do que seria

desejável. Neste contexto, o uso de nanopartículas orgânicas, poliméricas, metálicas ou semicondutoras, conjugadas com drogas anticâncer, é objeto de intensas pesquisas, não só por causa de suas propriedades únicas relacionadas com suas dimensões, mas também por se situarem na mesma escala de tamanho das macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos, proteínas). Tal similaridade permite uma integração entre a nanotecnologia e a biologia, levando a avanços sem precedentes usando estratégias passivas e ativas de seletividade, podendo aumentar a concentração intracelular das drogas no interior das células doentes ao mesmo tempo evitando a toxicidade nas células normais (MAEDA, 2008).

1.2. Patentes

Patente é uma concessão pública, conferida pelo estado, que garante ao seu titular a exclusividade ao explorar comercialmente a sua criação. A patente insere-se nos denominados direitos de Propriedade Industrial, cujos normativos legais são, em Portugal, o Código da Propriedade Industrial, e no Brasil, a Lei da Propriedade Industrial.

Outra modalidade de patente é o modelo de utilidade. O direito de exclusividade garantido pela patente refere-se ao direito de prevenção de que outros de fabricarem, usem, vendam, ofereçam ou importem a dita invenção. Em contrapartida, é disponibilizado acesso ao público sobre o conhecimento dos pontos essenciais e as reivindicações que caracterizam a novidade no invento. Os registros de patentes, por estarem disponíveis em bancos de dados de livre acesso, constituem grandes bases de conhecimento tecnológico, que podem ser usadas em pesquisas de diversas áreas (QUONIAM et. al, 2014). Diz-se também patente, mas, no Brasil, com maior precisão, carta-patente, o documento legal que representa o conjunto de direitos exclusivos concedidos pelo Estado a um inventor

1.2.1. *Web of Science*

O Web of Science, anteriormente conhecida como Web of Knowledge, é um serviço de indexação de citações científicas baseada em assinatura, originalmente produzido pelo Institute for Scientific Information (ISI), agora mantido pela Clarivate Analytics, anteriormente o negócio de Propriedade Intelectual e Ciência da Thomson Reuters, que fornece uma pesquisa abrangente de citação. Dá acesso a múltiplos bancos de dados que

fazem referência à pesquisa interdisciplinar, que permite a exploração aprofundada de subcampos especializados dentro de uma disciplina acadêmica ou científica (LANKES, 2004).

Um índice de citações baseia-se no fato de que as citações em ciência servem como vínculos entre itens de pesquisa semelhantes e levam a literatura científica correspondente ou relacionada, como artigos de revistas, trabalhos de conferências, resumos, etc. Além disso, a literatura que mostra o maior impacto em um campo particular, ou mais de uma disciplina, pode ser facilmente localizado através de um índice de citações. Por exemplo, a influência de um papel pode ser determinada ligando-se a todos os trabalhos que o citaram. Desta forma, as tendências atuais, os padrões e os campos de pesquisa emergentes podem ser avaliados.

1.2.2. United States Patent and Trademark Office - USPTO

O Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos (USPTO) é uma agência do Departamento de Comércio dos Estados Unidos que emite patentes para inventores e empresas para suas invenções e registro de marca registrada para identificação de produtos e propriedade intelectual.

O USPTO é único entre as agências federais porque opera exclusivamente com taxas cobradas pelos usuários, e não com dólares dos contribuintes (BOHLE, 2014). Sua estrutura operacional é como uma empresa, a medida em que recebe pedidos de serviços - aplicações para patentes e registros de marcas registradas, cobra taxas projetadas para cobrir o custo de executar os serviços que fornece (USPTO, 2014).

O USPTO coopera com o Escritório Europeu de Patentes (EPO) e o Escritório de Patentes do Japão (JPO) como um dos Escritórios de Patentes Trilaterais. O USPTO também é um escritório de recepção, uma autoridade de pesquisa internacional e uma autoridade de exame preliminar internacional para pedidos de patentes internacionais arquivados de acordo com o Tratado de Cooperação de Patentes. A missão do USPTO é manter um registro histórico permanente e interdisciplinar de todos os pedidos de patentes dos Estados Unidos para cumprir objetivos delineados na Constituição dos Estados Unidos (BOHLE, 2014).

1.2.3. European Patent Office – EPO/ESPACENET

Espacenet (antigamente escrito como esp@cenet) é um serviço on-line gratuito para pesquisar patentes e pedidos de patentes. A Espacenet foi desenvolvida pelo Escritório Europeu de Patentes (EPO), juntamente com os Estados-membros da Organização Europeia de Patentes. A maioria dos Estados membros tem um serviço Espacenet em sua língua nacional e acesso ao banco de dados mundial do EPO, a maioria dos quais em inglês. Em 2015, o serviço mundial Espacenet afirmou ter registros em mais de 90 milhões de publicações de patentes (WHITE, 2006).

Ao lançar o Espacenet em 1998, o EPO teria revolucionado o acesso público às informações internacionais de patentes, liberando dados de patentes do papel e mudando como as patentes são disseminadas, organizadas, pesquisadas e recuperadas. Em 2004, ou seja, nos primeiros anos do Espacenet, embora livre, o Espacenet, como o banco de dados dos Estados Unidos de Patentes e Marcas (USPTO) de patentes dos EUA, ainda tende a ter motores de busca primitivos e em alguns mecanismos bastante pesados para baixar patentes (LAMBERT, 2004). Relatou-se que era deliberada, por parte da USPTO e EPO, a forma de dizer que que não desejam competir de forma injusta com os vendedores comerciais. Em 2009, a Espacenet ofereceu o chamado SmartSearch, que permite que uma consulta seja composta usando um subconjunto de linguagem de consulta contextual (CQL).

1.2.4. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual – INPI

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) é uma autarquia federal brasileira, criada em 1970, vinculada ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Localiza-se na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Antecedido pelo Departamento Nacional da Propriedade Industrial.

Tem por finalidade principal, segundo a Lei 9.279/96 (Lei da Propriedade Industrial), executar, no âmbito nacional, as normas que regulam a Propriedade Industrial, tendo em vista a sua função social, econômica, jurídica e técnica. É também sua atribuição pronunciar-se quanto à conveniência de assinatura, ratificação e denúncia de convenções, tratados, convênios e acordos sobre propriedade industrial. O INPI é

responsável pelo registro e concessão de marcas, patentes, desenho industrial, transferência de tecnologia, indicação geográfica, programa de computador e topografia de circuito integrado.

1.3. Nanotecnologia

A nanotecnologia consiste na manipulação da matéria em uma escala atômica, molecular e supramolecular. A descrição mais antiga e generalizada da nanotecnologia, refere-se ao objetivo tecnológico específico de manipular precisamente átomos e moléculas para a fabricação de produtos de escala macromolecular, também conhecidos como nanotecnologia molecular (DREXLER, 1992). Uma descrição mais generalizada da nanotecnologia foi posteriormente estabelecida pela National Nanotechnology Initiative, define a nanotecnologia como a manipulação da matéria com pelo menos uma dimensão de 1 a 100 nanômetros. Esta definição reflete o fato de que os efeitos mecânicos quânticos são importantes nesta escala do universo quântico e, portanto, a definição mudou de um objetivo tecnológico particular para uma categoria de pesquisa, incluindo todos os tipos de pesquisa e tecnologias que lidam com as propriedades especiais da matéria que ocorrem abaixo do limite de tamanho dado. Por conseguinte, é comum ver a forma plural "nanotecnologias", bem como "tecnologias de nanoescala" para se referir à ampla gama de pesquisas e aplicações cuja característica comum é o tamanho. Devido à variedade de aplicações potenciais, incluindo industrial e militar, os governos investiram bilhões de dólares em pesquisa em nanotecnologia. Até 2012, através da National Nanotechnology Initiative, os Estados Unidos investiram US\$ 3,7 bilhões, a União Europeia investiu US \$ 1,2 bilhão e o Japão US\$ 750 milhões (*The Daily Star*, 2012).

A nanotecnologia, tal como definida pelo tamanho, é naturalmente muito ampla, incluindo campos de ciência tão diversos como ciência da superfície, química orgânica, biologia molecular, física de semicondutores, armazenamento de energia (HUBLER, 2010 e SHINN, 2012), microfabricação (LYON et. Al., 2013), engenharia molecular (SAINI et. Al., 2010), etc. A pesquisa e as aplicações associadas são igualmente diversas, desde extensões da física de dispositivos convencionais até abordagens completamente novas baseadas na auto-organização molecular (BELKIN, et. al., 2015); desde o desenvolvimento de novos materiais com dimensões na nanoescala até o controle direto da matéria na escala atômica. Os cientistas atualmente debatem as futuras implicações da nanotecnologia. A nanotecnologia poderá criar muitos novos materiais e dispositivos com uma vasta gama de aplicações, como nanomedicina, nanoeletrônica, produção de energia, biomateriais e produtos de consumo. Por

outro lado, a nanotecnologia suscita muitas das mesmas questões que qualquer nova tecnologia, incluindo preocupações quanto à toxicidade e ao impacto ambiental dos nanomateriais (BUZEA et. al., 2007) e seus efeitos potenciais sobre a economia global, bem como a especulação sobre vários cenários do dia do juízo final. Essas preocupações levaram a um debate entre grupos de defesa e governos sobre se a regulamentação especial da nanotecnologia é justificada.

1.4. Lipossomas

Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídios anfipáticos, que se organizam espontaneamente encerrando-se em estruturas esféricas fechadas (SANTOS, 2002). Podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídios sintéticos, disponíveis comercialmente. Os lipossomas podem ser classificados em termos de tamanho; número de lamelas e sua posição relativa; constituição lipídica, o que também condiciona a sua carga; estabilidade e modo de preparação (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988).

1.4.1. Estrutura e preparação dos lipossomas

A nomenclatura adotada para os lipossomas baseia-se no número de bicamadas lipídicas e no tamanho (SZOKA JR., 1980). Para muitas das aplicações dos lipossomas, torna-se importante a utilização de um sistema de interpretação mais simples e melhor definido em termos estruturais. Deste modo, em grande parte dos estudos, as vesículas multilamelares ou MLV (“multilamellar vesicles”) são escolhidas em detrimento de vesículas unilamelares. Destes lipossomas, os mais utilizados são as vesículas unilamelares grandes ou LUV (“large unilamellar vesicles”), de diâmetro superior a 100 nanômetros, bem como as vesículas unilamelares pequenas ou SUV (“small unilamellar vesicles”), com diâmetro entre 20 e 50 nanômetros (LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988). Além destas vesículas unilamelares, devem-se ainda considerar as vesículas unilamelares gigantes ou GUV (“giant unilamellar vesicles”), com dimensões superiores a 1 µm, podendo chegar às dezenas de µm (LASIC e NEEDHAM, 1995) tamanho comparável ao de uma célula eucariota. Alguns autores definem ainda uma classe de vesículas unilamelares médias ou MUV (“medium-sized unilamellar vesicles”), com dimensões compreendidas entre os SUV e os LUV (LICHTENBERG e

BARENHOLZ, 1988). De menor importância, mas também caracterizados (LASIC e NEEDHAM, 1995), encontram-se os lipossomas multivesiculares ou MVL ("multivesicular liposomes") e as vesículas oligolamelares ou OLV ("oligolamellar vesicles") que, à semelhança das unilamelares, podem ser subdivididas em pequenas, grandes e gigantes (SOV, LOV e GOV).

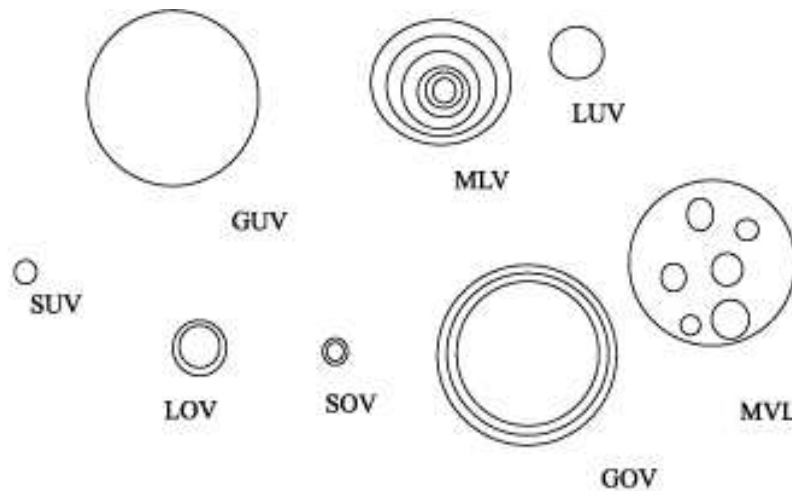


Figura 1. Representação esquemática dos vários tipos de lipossoma, mostrando a base de sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa em: vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares pequenas (SUV); vesículas unilamelares grandes (LUV); vesículas unilamelares gigantes (GUV); lipossomas multivesiculares (MVL); vesículas oligolamelares grandes (LOV) e vesículas oligolamelares gigantes (GOV). Cada linha representa uma bicamada lipídica (lamela). Adaptado de TYRRELL et. al., 1976 (SANTOS, 2012).

Para além do tamanho e número de lamelas, outro fator essencial para a caracterização de um lipossoma compreende a constituição das bicamadas lipídicas. A composição fosfolipídica, a presença de esteróis, a proporção destes componentes e a inserção de outras moléculas nas bicamadas, vão condicionar vários parâmetros da membrana e do próprio lipossoma; nomeadamente, a sua carga, estabilidade, curvatura da(s) bicamada(s), fase da membrana e formação de domínios lipídicos (BAGATTOLI, 2000).

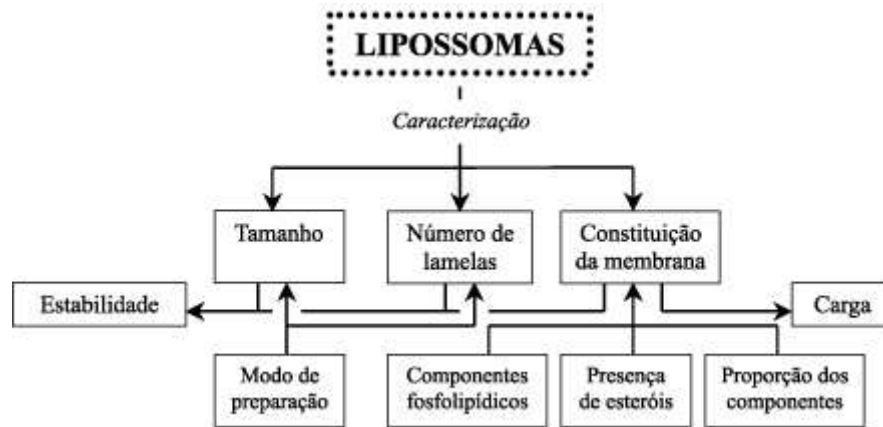


Figura 2. Esquema representativo dos parâmetros utilizados para caracterização de lipossomas. Adaptado de LICHTENBERG e BARENHOLZ, 1988. (SANTOS, 2012).

O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação. Assim, visto a composição química, número de camadas, distribuição de tamanhos, número de lamelas e o volume encapsulado influenciarem consideravelmente qualquer aplicação dos lipossomas, o seu método de preparação deverá ser sempre escolhido criteriosamente. De um modo geral, a preparação de vesículas lipídicas pode ser dividida em três fases consecutivas: preparação das fases aquosa e lipídica, hidratação do lipídio e ainda, para a maioria dos sistemas, um processamento secundário, necessário para a obtenção do produto final (WOODLE, 1989).

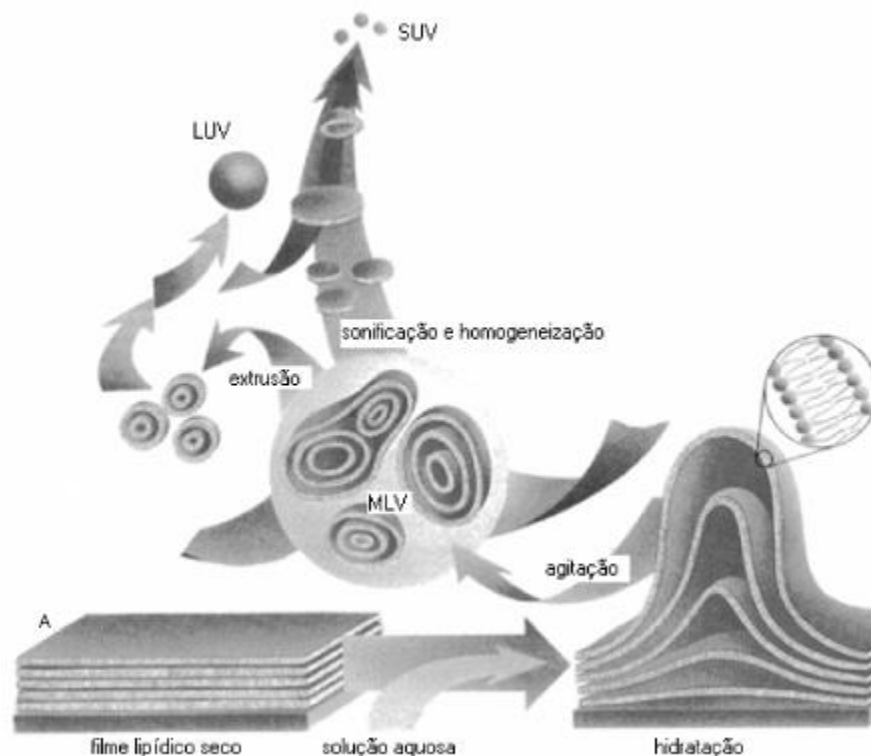


Figura 3. Representação esquemática da metodologia de preparação dos diferentes tipos de lipossomas. Adaptado de <http://avantilipids.com> (SANTOS, 2012).

1.4.2. Aplicações dos lipossomas

Os lipossomas são usados como meio de transporte para a entrega de corantes em têxteis (BARANI e MONTAZER, 2008), pesticidas para plantas, suplementos nutricionais para alimentos e produtos cosméticos para a pele (MEURE et. al., 2009). Os usos dos lipossomas têm sido intimamente relacionados com a entrega de medicamentos, até muito recentemente. Todavia, os lipossomas possuem versatilidade que os permitiram ser empregados de diversas formas, as habilidades agora estão sendo descobertas em muitas outras configurações. Com a ajuda de lipossomas, certos alimentos e suplementos nutricionais agora podem ser entregues na área visada (SOHIJA e NAKASHIMA, 2004).

A toxicidade das drogas no organismo pode ser prevenida pela injeção lipossomas vazios com gradiente de pH transmembranar. As vesículas atuarão eliminando os medicamentos que circulam no sangue (BERTRAND et. al., 2009). Os lipossomas também são usados para a transformação do DNA em uma célula hospedeira, esse processo é chamado de lipofecção (BALAZS e GODBEY, 2011). Além disso, o lipossoma também desempenha um papel benéfico em nanocosmetologia. Entre os benefícios estão uma melhor penetração, bem como, a difusão de ingredientes ativos, maior estabilidade de ingredientes ativos, aumento do tempo de liberação e diminuição no número de complicações negativas (FEINGOLD, 1997) (KULKARNI et. al., 2011).

Outra propriedade única dos lipossomas é a sua capacidade de ter células cancerígenas como alvo (PERCHE e TORCHILIN, 2013). Células endoteliais encontradas em vasos sanguíneos humanos saudáveis são mantidos unidos por junções apertadas. A presença dessas junções evita que grandes partículas encontradas no sangue deixem os vasos. Os vasos tumorais, por outro lado, não contem tantas junções como vasos saudáveis e é, portanto, descrito como vazado. Portanto, lipossomas de tamanhos menores são capazes de obter acesso a tumores por meio do sangue e são mantidos na corrente sanguínea em vasos saudáveis.

1.4.3. Lipossomas como transportadores de fármacos

O conceito de sistema de lipossomas como transportadores de fármacos foi estabelecido (GREGORIADIS e RYMAN, 1971) pouco depois da descoberta dos lipossomas (BANGHAM, 1965) no final anos 60. Desde o início, ficou claro que o aprisionamento de

drogas, tanto hidrofílicas, quanto drogas hidrofóbicas, em um interior lipossomal poderia melhorar a biodistribuição de drogas *in vivo* em comparação com outros sistemas de *delivery* (KIMELBERG et. al., 1976; POSTE e PAPAHADJOPOULOS, 1976; JULIANO e STAMP, 1978). No entanto, os estudos sobre o lipossoma como transportadores de fármacos encapsulados baseados em lipossomas iniciais, tidos como tradicionais (ALLEN e CULLIS, 2013; MAHLI et. al., 2013)) revelaram uma série de problemas de seu uso *in vivo*, como: a dificuldade de encapsulamento de alguns tipos de drogas; vazamento de conteúdo para fora do interior do lipossoma; o efeito das proteínas séricas na liberação do fármaco; a rápida dispersão de lipossomas da circulação por absorção pelo sistema reticuloendotelial (SRE), predominantemente no fígado e no baço; e barreiras celulares e intracelulares para o *delivery* dos lipossomas.

O desenvolvimento inicial dos sistemas lipossomais de administração de fármacos visou superar esses obstáculos. Por exemplo, para reduzir um vazamento de lipossomas, colesterol (MCINTOSH, 1978) e esfingomiélin (CULLIS e HOPE, 1980) foram incorporados numa bicamada lipídica e um fosfolípido com uma temperatura de transição superior (STORM, 1987) foi utilizada para formar uma bicamada lipídica mais sólida.

O encapsulamento e a retenção da droga nos lipossomas dependem da natureza da própria droga. Muitas drogas são bases fracas e podem ser carregadas em resposta aos gradientes de pH (DEAMER et. al., 1972; MAYER et. al., 1986; MAYER et. al., 1990; MADDEN et. al., 1990 e BOLOTIN et. al., 1994). Algumas drogas, como a doxorrubicina, apresentam boas propriedades de retenção sob condições que aumentam sua precipitação dentro dos lipossomas (MAURER et. al., 1998; DRUMMOND et. al., 2006 e JOHNSTON et. al., 2008). Retenção de drogas altamente hidrofóbicas, como paclitaxel, em lipossomas ainda é um desafio (BARTOLI et. al., 1990 e CABANES et. al. 1998), no entanto, eles podem ser encapsulados e retidos em lipossomas se forem convertidos em bases fracas (ZHIGALTSEV et. al., 2010). É óbvio que, em fornecer uma atividade terapêutica razoável no sítio-alvo, a taxa de retenção da droga deve ser otimizada em relação a taxa de liberação de drogas (LAGINHA et. al., 2015; JOHNSTON et. al., 2006 e CHARROIS et. al. 2004). Pode-se distinguir dois métodos para desencadear a liberação de conteúdo lipossomal no sítio-alvo: indutores remotos como calor e radiação; e indutores locais tais como como enzimas e pH (BIBI et. al., 2012). É sabido que a taxa de liberação dos lipossomas é mais lenta se estes

forem neutros ou ligeiramente negativos e seu tamanho for de cerca de 100 nm (JULIANO et. al., 1975 e POSTE et. al, 1982). Além disso, os chamados "*stealth liposome*" com a circulação prolongada podem ser desenvolvidos pela estabilização dos lipossomas com polímeros protetores (por exemplo, polietilenoglicol, PEG) (GABIZON et. al, 1994).

Existem três maneiras de facilitar a administração intracelular de fármacos: introduzir de lipídios fusogênicos ou peptídeos ativos de membrana em uma bicamada lipossomal para melhorar a fusão ou mesmo a ruptura da membrana da célula ou da organela e, assim, melhorar a entrega de drogas no citoplasma (WEISSMANN et. al., 1976; OZAWA et. al, 1981; PARENTE et. al., 1988; BAILEY et. al., 1997 e TORCHILIN et. al., 2001); utilizar de macrófagos para a endocitose natural dos fármacos encapsulados dentro dos lipossomas (KELLY et. al, 2011); e receptores de endocitose mediados por lipossomas carreadores de fármacos com ligantes-alvo dispostos em sua superfície para dentro do compartimento intracelular (TORCHILIN, 2005; ZHAO e RODRIGUEZ, 2013 e ALLEN, 2002).

Os lipossomas têm sido utilizados como transportadores para vários tipos de macromoléculas bioativas como anti-câncer, anti-bacteriana, antifúngicos e antivirais (KAZAKOV e LEVON, 2006). Os sistemas de administração de fármacos lipossomais, que já foram aprovados para comercialização e que estão em desenvolvimento clínico estão bem documentados em revisões recentes (ALLEN e CULLIS, 2013; DESHPANDE et. al., 2013; CHANG e YEH, 2012 e TAHOVER et. al, 2015). Os produtos anticâncer que utilizam lipossomas clinicamente mais bem-sucedidos são os seguintes: Pegylated liposomal (90 nm) doxorubicina (Doxil®/Caelyx®) foi aprovado nos Estados Unidos (Janssen Pharmaceuticals) em 1995 (sarcoma de Kaposi), em 1999 (câncer de ovário), e em 2003 (câncer de mama) (BARENHOLZ, 2012). A forma genérica do Doxil (LipoDOX®) foi aprovada em Taiwan em 2002 para o tratamento do sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e câncer de mama (Sun Pharmaceuticals, Índia). Non-pegylated liposomal (180 nm) doxorubicina em combinação com ciclofosfamida (Myocet®) foi aprovado na Europa (Cephaton-TEVA, USA) e no Canadá (Sopherion Therapeutics, Israel) em 2000 para o tratamento de câncer de mama metastático. Non-pegylated liposomal (60 nm) daunorrubicina (análogo da doxorubicina, DaunoXome®) foi aprovado na Europa e nos Estados Unidos (1996, Galen, UK) para o tratamento do sarcoma de Kaposi. A injeção lipossomal de sulfato de vincristina, uma formulação de vincristina composta de esfingomielina e colesterol (Marqibo®) foi aprovada

nos Estados Unidos (Talon Therapeutics) em 2012 para o tratamento de leucemia linfóide aguda (SILVER e DEITCHER, 2013). O primeiro paclitaxel lipossomal (Lipusu®) foi aprovado na China (Luye Pharma Group) em 2006 para o tratamento de tumores sólidos (ovário, mama e pulmão) (SHARMA e KUMAR, 2015).

1.5. Quinoxalinas

Quinoxalina ($C_8H_6N_2$) (CHEESEMAN, 1963), também chamada de 1,4-benzodiazina, 1,4-diazanaftaleno, 1,4-naftiridina, benzoparadiazina, fenotiazina, chinoxalina ou benzopirazina, é um composto heterocíclico, sem anel complexo, de caráter aromático, composto por um anel benzênico e um anel pirazínico. A quinoxalina e seus derivados é uma classe muito importante de compostos heterocíclicos que contem nitrogênio. Um sistema deslocalizado contendo dez elétrons π , em cada átomo da estrutura bicíclica colabora com um elétron π em orbitais p. Os nitrogênios com um par de elétrons livre em orbitais sp^2 , induz a um maior caráter polar nas ligações químicas, o que torna as interações intermoleculares mais fortes, diferente de seus parentes hidrocarbonetos, fornecendo estabilidade térmica a seus derivados.

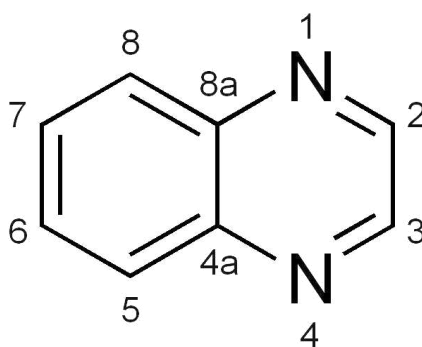


Figura 4. Estrutura química da molécula de quinoxalina

1.5.1. Síntese de quinoxalina e seus derivados

Há vários métodos sintéticos disponíveis para a síntese de quinoxalina e seus derivados. O método mais comum é a condensação de um aril 1,2-diamina com um composto de 1,2-dicarbonil em um solvente adequado (KURASAWA e TAKADA, 1985; VOGEL, 1989).

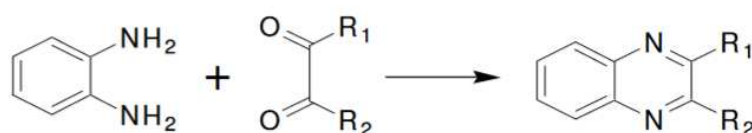


Figura 5. Síntese de quinoxalina pela condensação de um aril 1,2-diamina com um composto 1,2-dicarbonil (DHANARAJ et. al., 2014)

Os derivados de quinoxalina também são preparados a partir de cinamil em água sob métodos convencionais ou micro-ondas de irradiação (THIRUMURUGAN et. al., 2009).

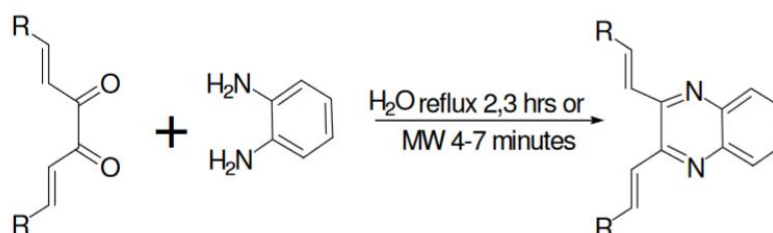


Figura 6. Derivados de quinoxalina preparados a partir de cinamil (DHANARAJ et. al., 2014)

Thakuria et. al. (2006) relataram um método bastante eficiente para a síntese verde de quinoxalina e seus derivados. A síntese substitui 1,4-dihidroquinoxalina-2,3-dienos em temperatura ambiente por fenilendiamina e ácido oxálico.

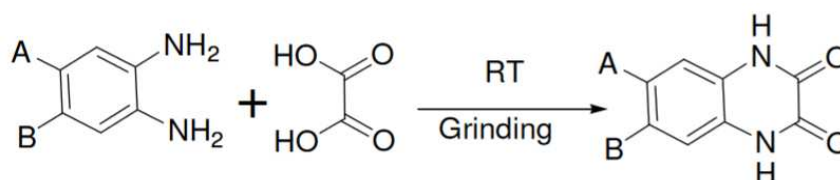


Figura 7. Síntese verde eficiente dos derivados de quinoxalina (DHANARAJ et. al., 2014)

1.5.2. Aplicações de quinoxalina e seus derivados

Os derivados de quinoxalina servem como sub-unidades rígidas em receptores macrocíclicos. Os complexos metálicos de derivados de quinoxalina são importantes devido a suas propriedades fotoquímica, fotofísica, catalítica e biológica. Derivados de quinoxalinas são amplamente utilizados como ligantes em complexos homobimetálicos e heterobimetálicos (DHANARAJ et. al., 2014). Os derivados de quinoxalina desempenham importante papel em áreas de âmbitos biológico e tecnológico (VIEIRA et al., 2014). Eles são utilizados como dispositivos optoeletrônicos (CHANG et. al., 2012), polímeros de auto-extinção e resistentes

a chamas (MIGHANI et. al. 2010), fluoróforos (ALDAKOV et. al., 2005), fotosensibilizadores (KOZYREV et. al., 2000), inibidores de corrosão (ZARROUK et. al., 2011) transportadores de elétrons (HUANG et. al., 2006) e em energia fotovoltaica (ZMUJDZIN, 1974). Outras atividades relatadas são anti-HIV, antibacteriana, antifúngica, antituberculose, propriedades anti-inflamatórias e antiprotozoária também são exploradas por atuarem como clivadores do DNA (TOSHIMA et al., 2014).

1.5.3. Atividade anticâncer da quinoxalina e seus derivados

Os núcleos de quinoxalina exibem potencial atividade anticancerígena, o que os torna uma base importante para os fármacos anticancerígenos (HUSAIN & MADHESIA, 2011). Uma nova série de derivados de 2-alkilcarbonila e 2-benzoil-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-N-óxido foram sintetizados e avaliados para a actividade antitumoral *in vitro* contra um linhagens de 3 tipos de células de linhagens tumorais humanas: MCF7 (mama), NCIH 460 (pulmão) e SF-268 (sistema nervoso central). Após, avaliou-se em um *screening* completo de 60 linhagens de células tumorais humanas, derivadas de nove tipos de células cancerígenas. Verificou-se que, em geral, a atividade anticâncer depende dos substituintes no grupo carbonila, aumentando a atividade na ordem: etil < isopropil < terc-butil < fenil. Entre estes, os compostos (Figura 8) 2(3,metilbut-1-en-2-il)-3(trifluorometil)quinoxalina-1,4-di-N-óxido (composto 1); 2-benzoil-6,7-dicloro-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-N-óxido (composto 2); difluorinados analógos (6,7-difloro-2-isobutiril-3-trifluormetilquinoxalina-1,4-di-N-óxido e 2-benzoil-6,7-difluoro-3-trifluorometilquinoxalina-1,4-di-N-óxido (compostos 3 e 4, respectivamente); e 2-(2,2-dimetilpropanoil)-3-trifluormetilquinoxalina-1,4-di-N-óxido (composto 5) foi o mais ativo, com maior atividade anticancerígena com valores médios de GI₅₀, inibição do crescimento, de 1,02, 0,42, 0,52, 0,15 e 0,49 µM, respectivamente (HUSAIN & MADHESIA, 2011; ZARRANZ et. al., 2004).

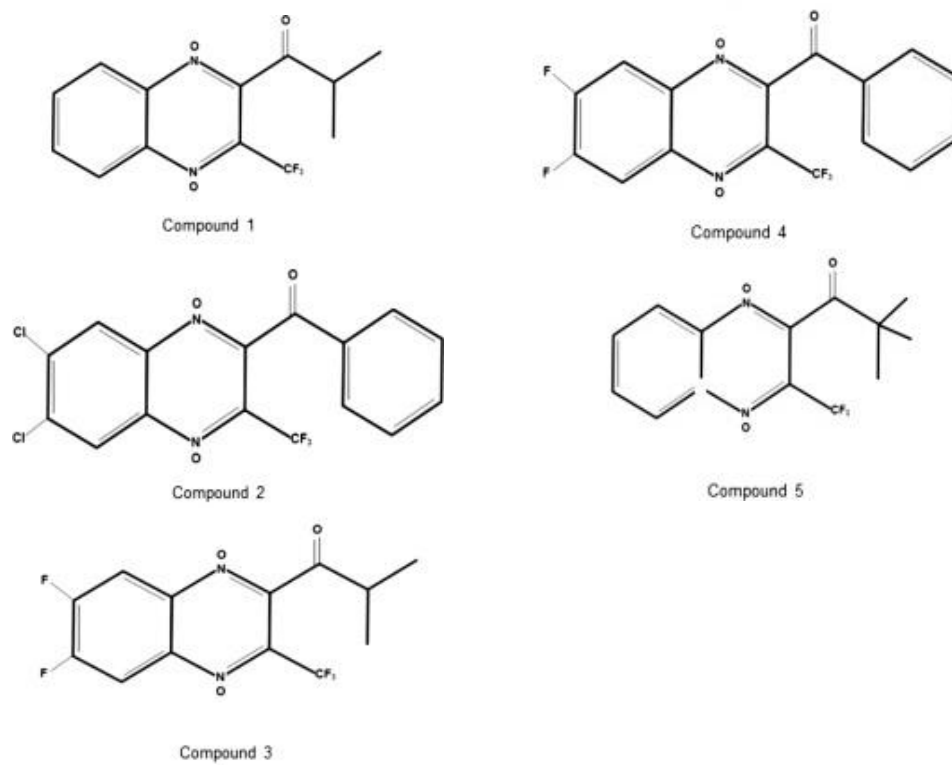


Figura 8. Núcleos quinoxalínicos que apresentam potencial atividade anticancer (PEREIRA et. al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar a prospecção tecnológica, desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipossomais como veículos de moléculas derivadas de quinoxalinas para posterior avaliação da atividade antitumoral *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico acerca dos artigos científicos publicados sobre nanopartículas lipossomais;
- Realizar busca de anterioridades, em bancos de patentes, nacional (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual - INPI) e internacionais (USPTO – Estados Unidos e EPO/ESPACENET – Europa), em tecnologias relacionadas à produção de nanopartículas lipossomais;
- Realizar uma correlação entre o número de patentes depositadas e a quantidade de artigos científicos publicados no mundo relacionados à produção de nanopartículas, bem como os principais autores de artigos e inventores/depositantes de patentes;
- Avaliar como o Brasil se insere no cenário global como gerador de propriedade intelectual na área;
- Estabelecer e reproduzir o método de preparação dos sistemas nanoestruturados;
- Realizar a análise físico-química dos lipossomas produzidos, buscando avaliar a estabilidade das formulações; e
- Avaliar a eficácia do método de encapsulação empregado.

3. METODOLOGIA

3.1. Levantamento bibliográfico

Para analisar a produção científica relacionada a nanopartículas lipossomais, fez-se uso da plataforma Web of Science, a principal plataforma de pesquisa da atualidade. Foram realizadas buscas utilizando todas as bases de dados, e em especial a Web of Science, fazendo uso de palavras-chave relacionadas ao tema. Levantou-se o número de artigos publicados até outubro do ano corrente. Toda a pesquisa foi realizada utilizando-se o servidor proxy da Universidade Federal do Ceará, o qual permite a utilização de serviços restritos ao domínio ufc.br.

3.1.1. Busca de artigos na plataforma Web of Science

Acessou-se o site oficial da Web of Science (<https://wokinfo.com/>). Na aba “Product Access”, selecionou-se a opção “Web of Science”. Foi utilizada a aba All Databases, a fim de englobar o máximo de dados possíveis. Palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por artigos relacionados às nanopartículas lipossomais foram intuitivamente escolhidas e inseridas no campo “Topic” como isca, ou *query*, para a busca, entre elas: “lipossom*” ou “lipossom*”, “nano*”, “terapia” ou “terapia”, e “drug delivery”. Utilizou-se também combinações das iscas previamente citadas, lançando-se mão dos modificadores de busca *and* (e) e *or* (ou).

Após iniciar-se a busca, é possível refiná-la em diversos campos utilizando a ferramenta “Web of Science Categories”. Visto isso, na seção “Document Types” selecionou-se a opção “Articles”, em seguida a opção “Countries/Territories”, para realizar uma busca pelos países que realizam produção científica acerca de nanopartículas lipossomais.

Utilizando a ferramenta “Analyse Results”, clicou-se em “Authors” para que fosse possível uma busca dos principais autores que publicaram artigos relacionados as palavras-chaves, previamente utilizadas. A partir dos dados obtidos, criou-se uma tabela e construiu-se gráficos de número de artigos por ano, no programa Microsoft Excel 2013.

3.2. Prospecção Tecnológica

Para analisar a tendência acerca das patentes relacionadas aos lipossomas como agentes terapêuticos, buscas foram feitas nos principais bancos de dados de patentes utilizando palavras-chave relacionadas ao tema. Levantou-se o número de patentes depositadas e/ou concedidas nos escritórios de patentes dos Estados Unidos (USPTO), no escritório europeu (EPO-ESPACENET), no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e no Web of Science. Toda a pesquisa foi realizada utilizando-se o servidor proxy da Universidade Federal do Ceará.

É importante destacar que esses dados não representam os valores absolutos das patentes depositadas nesse período e que podem conter redundâncias, uma vez que a mesma patente pode ser depositada em vários desses bancos de dados. Esses dados representam acima de tudo o padrão de patentes depositadas nesses bancos de patentes.

3.2.1. Busca de patentes no USPTO

Acessou-se o site oficial do escritório de patentes dos Estados Unidos (<http://www.uspto.gov/>). Na aba “Patents”, e na sub-aba selecionou-se a opção “Search for patente”. Aberta a página guia para a pesquisa, optou-se por “USPTO Patent Full-Text and Image Database (PatFT)” e sub-opção “Searching Full Text Patents (Since 1976)”, e selecionou-se “Advanced Search”. Palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por patentes relacionadas a lipossomas como agentes terapêuticos foram intuitivamente escolhidas e usadas como iscas, ou *query*, para a busca, entre elas: “liposome”; “liposome” e “*drug delivery*”; “liposome” e “nano*”; “liposome” e “*therapy*”; e “liposome” e “nano*” e “*therapy*”.

Para buscar por palavras que estivessem contidas no resumo ou no título da patente, seguiram-se os passos já mencionados, adicionando-se os códigos “abst” e “ttl”, respectivamente, antes da palavra-chave, dentro do quadro *query*. Exemplificando: o código “abst/liposome and *drug delivery*” foi usado para uma busca por patentes que contivessem os termos “liposome” e “*drug delivery*” dentro do resumo e o código “ttl/liposome and *drug delivery*” foi usado para uma busca por patentes que contivessem os termos “liposome” e “*drug delivery*” dentro do título.

Para analisar o quadro de patentes relacionadas aos lipossomas em diferentes países, usou-se o código ICN, referente ao país do inventor da patente, seguido do código padrão de duas letras referente a cada país. Os países escolhidos para se fazer a busca foram: Estados Unidos (US), Inglaterra (GB), Brasil (BR), Índia (IN), França (FR), Alemanha (DE), Japão (JP), Canadá (CA), China (CN) e Coréia (KR).

Exemplificando, para uma busca utilizando os termos “liposome” e “*drug delivery*” contidos no resumo da patente e selecionando os Estados Unidos como país do inventor da patente, o código usado no campo *query* foi o seguinte: abst/liposome and drug delivery and (ICN/US).

3.2.2. Busca de patentes no EPO/ESPACENET

Acessou-se o site oficial do escritório de patentes europeu (<http://www.epo.org/>). Na aba “Searching for patentes”, selecionou-se a opção Espacenet - patent search. Aberta a página, clicou-se em “Open Espacenet”. Após o redirecionamento da página, selecionou-se “Advanced Search”. A coleção utilizada foi “Worldwide”, tentando-se englobar o máximo de dados possíveis.

Assim como no USPTO, as palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por patentes relacionadas a lipossomas como agentes terapêuticos foram intuitivamente escolhidas e usadas como isca, ou *query*, para a busca, entre elas: “liposom*”; “liposom*” e “*drug delivery*”; “liposom*” e “nano*”; “liposom*” e “*therapy*”; e “liposom*” e “nano*” e “*therapy*”. Estes termos foram inseridos nos campos “Title or Abstract”.

3.2.3. Busca de patentes na Web of Science

Acessou-se o site oficial da Web of Science (<http://wokinfo.com/>). Na aba “Product access” Web of Science. Foi utilizada a aba “Todas as bases de dados”, tentando-se englobar o máximo de dados possíveis. Assim como no USPTO, palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por patentes relacionadas a lipossomas como agentes terapêuticos foram intuitivamente escolhidas e usadas como isca, ou *query*, para a busca, entre elas: “liposom*”; “liposom*” e “*drug delivery*”; “liposom*” e “nano*”; “liposom*” e “*therapy*”; e “liposom*” e “nano*” e “*therapy*”. que foram inseridos no campo “Topic”. Na sessão “Timespan”, fez-se

uso de todos os anos até 2016. Na sessão “Documents Types”, foi selecionada a opção “Patent”.

3.2.4. Busca de patentes no INPI

Acessou-se o site oficial do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (<http://www.inpi.gov.br/>). No canto direito da tela, clicou-se na opção “Faça uma busca”. A página que se abre solicita um login, porém a opção usada foi para continuar fazendo uma busca no modo anônimo, para isso selecionou-se a opção “Continuar”, em azul, após o texto “Para realizar a pesquisa anonimamente aperte apenas o botão”. Após o redirecionamento da página, clicou na opção “Patente”.

Então aberta a página de Consulta à Base de Dados do INPI, selecionou-se a opção “Pesquisa em base de patentes” e em seguida selecionou-se a opção: Consulta por “Pesquisa avançada”, após tirou-se a seleção da opção número e clicando na opção “Palavra-chave”.

Assim como no USPTO, palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por patentes relacionadas a lipossomas como agentes terapêuticos foram intuitivamente escolhidas e usadas como isca, ou *query*, para a busca, entre elas: “lipossom*”; “lipossom*” e “*drug delivery*”; “lipossom*” e “nano*”; “lipossom*” e “terapia”; e “lipossom*” e “nano*” e “terapia”, que foram inseridos no campo “Resumo”. Vale ressaltar que, no INPI, utiliza-se palavras chaves em português, porém quando for utilizar duas palavras elas devem ser separadas por “and” ou “or”.

A prospecção tecnológica foi realizada a partir da busca de patentes através dos bancos de dados: INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) e EPO (European Patent Office). As escolhas por esses bancos de dados foram baseadas no fato do primeiro ser brasileiro e poder oferecer um diagnóstico nacional do tema e pelo segundo poder oferecer uma leitura global das patentes depositadas deste assunto. Escolheu-se palavras-chave que pudessem ajudar a refinar a pesquisa por patentes relacionadas aos lipossomos foram escolhidas e usadas como isca, ou *query*, para a busca.

As patentes encontradas no INPI foram categorizadas a partir do período em que foram depositadas. Para isto, foi decidido utilizar apenas a palavra-chave: “lipossom*” que

consegue abranger o maior número de patentes possíveis, tornando assim o resultado mais válido.

Os resultados obtidos a partir da base de dados do EPO foram analisados a partir dos seguintes parâmetros: país de depósito, ano de publicação da patente e a Classificação Internacional de Patentes (CIP) quanto à seção e subseção. As informações analisadas foram organizadas e resumidas através de gráficos.

3.3. Moléculas utilizadas no estudo

As moléculas (derivados de quinoxalina, PJOV56) estudadas quanto à atividade antitumoral e alvo do processo de encapsulamento foram doadas pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio Manguinhos) ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), como atividade de colaboração entre projetos de pesquisa conjuntos.

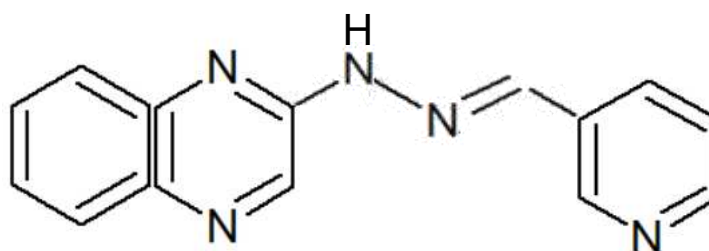


Figura 9. Representação da molécula de PJOV56, derivado de quinoxalina.

3.4. Preparação dos sistemas nanoestruturados

Na preparação dos lipossomas, foram utilizados os lipídios dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) e colesterol (COL) com >99% de pureza foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Os lipídios foram pesados na proporção de 5:3:1 de DPPC:COL:DPPS. A quinoxalina (1 mg) foi adicionada ao tubo e os componentes foram dissolvidos com 1 mL de solução clorofórmio/metanol (1:1), com >99% de pureza foram obtidos da Dinâmica Reagentes (Diadema, São Paulo, Brasil). Os solventes foram evaporados em nitrogênio, obtido da White Martins (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) formando um filme na parede do tubo, que foi mantido em dessecador overnight (por 18 horas). Após este período, foi adicionado 1 mL de tampão PBS (Phosphate Buffer Saline

1,0M pH 7,2) e o tubo foi submetido ao vórtex e banho-maria (57 °C) repetidas vezes para ressuspender os lipossomas, formando uma emulsão. A emulsão foi submetida a um extrusor (LiposoFast™, Avestin) com membranas de policarbonato com poros de 200 nm de diâmetro, por 40 vezes, para produzir uma população de lipossomas com tamanho uniforme (BARROS et al., 2013). Lipossomas sem a incorporação do fármaco (placebo) foram utilizados como controle.

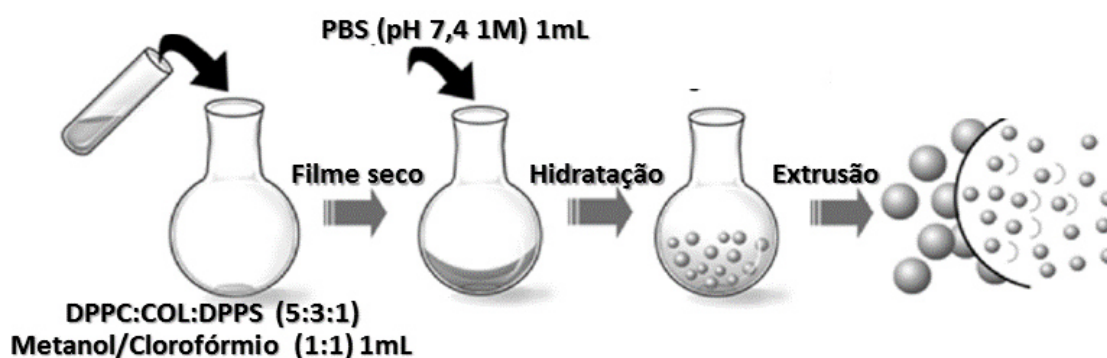


Figura 10. Preparação dos sistemas nanoestruturados. Elaborado pelo autor.

3.5. Caracterização físico-química dos sistemas de liberação modificados

3.5.1. Tamanho Vesicular, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta Médio

O espalhamento dinâmico da luz é utilizado para medir o tamanho hidrodinâmico de partículas. Nesta técnica, a difusão das partículas (movimento browniano) é medida e convertida em uma distribuição de tamanhos usando a equação de Stokes-Einstein. Suas principais aplicações incluem a caracterização de tamanho de partículas, proteínas, polímeros e dispersões coloidais.

Já o potencial zeta é medido utilizando-se a técnica de microeletroforese doppler a laser para medir a mobilidade eletroforética. Uma vez que um campo elétrico é aplicado a uma dispersão de partículas, estas passam a se mover com uma velocidade relacionada ao seu potencial zeta. Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser, sendo possível calcular a mobilidade eletroforética e, a partir desta, o potencial zeta e a distribuição do potencial zeta. Sua principal aplicação é no estudo da carga e da variação de carga de partículas e proteínas.

Na técnica de espalhamento de luz estático, a intensidade de espalhamento de luz de uma dada amostra é medida em uma série de concentrações, em ângulos diferentes, e utilizada para criar um gráfico de Debye. A partir daí, é possível calcular a massa molar média e o segundo coeficiente virial, que fornece uma medida da solubilidade das moléculas. A massa molar de proteínas e polímeros é medida por espalhamento de luz estático.

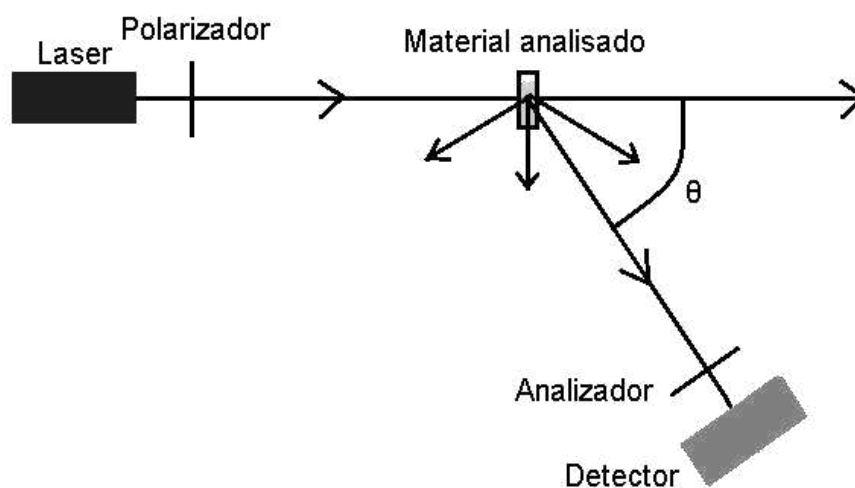


Figura 11. Esquema do funcionamento de um aparelho Zeta Sizer ZS Malvern, por meio do qual é possível medir o tamanho dos lipossomas e a distribuição de seu tamanho, ou seja, o índice de polidispersão (IP), por meio do espalhamento dinâmico da luz (DLS). Também é possível medir o potencial zeta, a distribuição das cargas sobre a superfície dos lipossomas, por meio de microeletroforese associada à anemometria doppler.

A determinação do tamanho de partícula foi realizada a 25 °C, utilizando-se diluições seriadas com água milliQ nas proporções de de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A distribuição do tamanho de partícula foi obtida pelo índice de polidispersão (IP). As medidas do potencial zeta médio das partículas foram realizadas a 25 °C, pela técnica de microeletroforese associada à Anemometria Doppler de Laser, através da submissão da amostra a um campo elétrico. As análises foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS, (Malvern), no Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) / Laboratório de Farmacognosia, no Departamento de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.5.2. Microscopia de Força Atômica - MFA

A microscopia de força atômica é uma técnica de análise que consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda a fim de obter sua imagem topográfica com

resolução atômica, além de mapear certas propriedades mecânicas e físico-químicas dos materiais que as compõe. Para tal fim, utiliza-se o microscópio de força atômica, desenvolvido em 1985 pelo Dr. Gerd Binnig et al. Ao desenvolver o aparelho, Binnig visava medir forças menores que $1\mu\text{N}$ entre a ponteira (tip) e a superfície da amostra (BUSHAN, 2004).

A técnica se tornou um excelente artifício para construção do perfil topográfico de uma superfície e medidor de força normal em micro e nanoescala. Hoje, as análises são feitas em áreas multidisciplinares como Física, Química, Biologia, Engenharia de Materiais, Eletrônica e Nanotecnologia. Essa variedade é possível, porque a técnica pode ser usada em amostras condutoras ou isolantes, magnéticas ou não magnéticas, secas ou em líquidos.

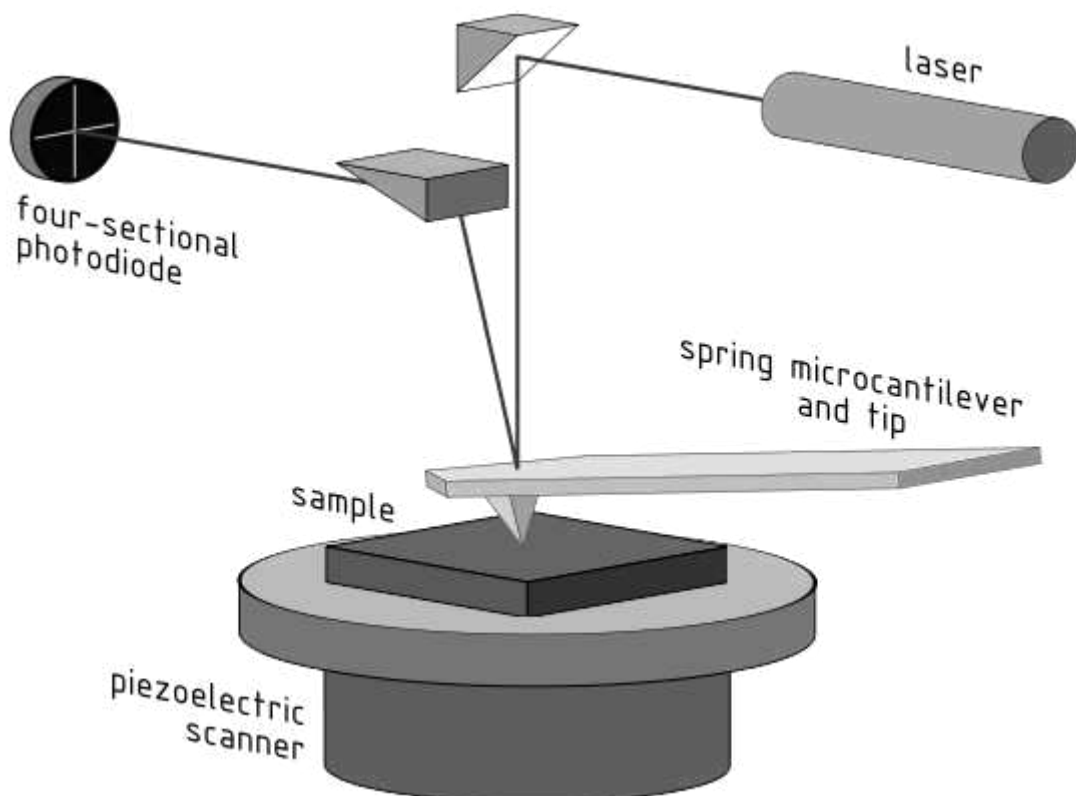


Figura 12. Esquema do funcionamento de um microscópio de força atômica, por meio do qual é possível mapear a superfície de um analito e imagens topográficas com resolução atômica.

A Microscopia de Força Atômica (MFA) foi utilizada para confirmar o resultado obtido previamente pela análise do tamanho, bem como para determinar a forma e a morfologia da superfície do lipossoma. A análise foi realizada com o Nanoscope IIIa

Multimode (Veeco Metrology, Santa Barbara, Califórnia, Estados Unidos). As suspensões foram diluídas em 1000 vezes em água Milli-Q. Alíquotas (5mL) das diluições foram depositadas em substratos de mica e deixadas até a completa evaporação da água antes da análise por MFA. As amostras analisadas no modo de contato para obter imagens topográficas usando sondas com uma constante de mola de 42 Nm^{-1} . A velocidade de varrimento utilizada foi de 1 Hz.

3.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utiliza-se de um feixe de elétrons como fonte de iluminação sobre uma amostra a ser observada, ao invés de luz visível onde é possível a obtenção de imagens com resoluções espaciais da ordem de centenas a milhares de vezes. Esta incidência de elétrons produz diversas interações passíveis de serem coletadas fazendo esta técnica ir muito além da simples obtenção de imagens. Instrumentos de microscopia eletrônica modernos oferecem um grau detalhado de caracterizações estruturais, espectroscópicas, composicionais e cristalográficas, em diferentes materiais tais como metais, ligas metálicas, cerâmicas, semicondutores, vidros, polímeros, madeira, têxteis, concreto, amostras biológicas, etc.

Na técnica de MEV, ocorre a irradiação da superfície da amostra, onde os sinais elétricos produzidos são traduzidos na forma de imagem. A coleta dos raios-x característicos pode ser empregada para se estudar a composição elementar da amostra através do mapeamento composicional e semi-quantitativo.

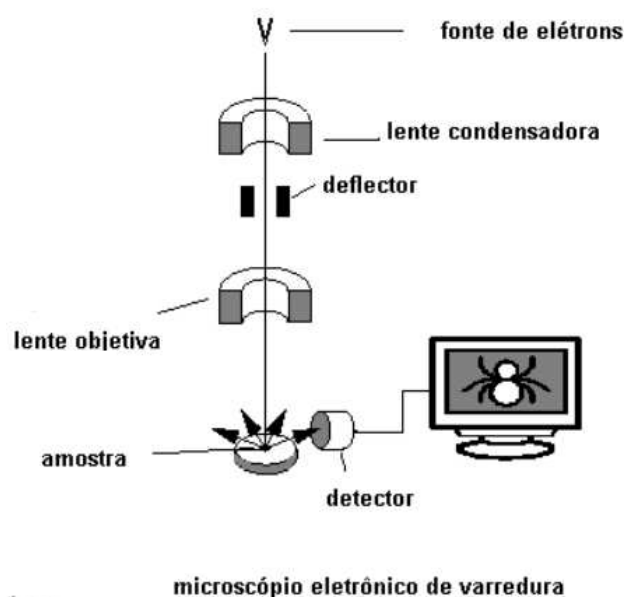


Figura 13. Esquema do funcionamento de um microscópio de eletrônico de varredura, por meio do qual é possível verificar a careacterização estrutural e composicional de um analito.

A morfologia foi analisada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, no Campus do Pici. O microscópio de varredura FEG Quanta 450, estágio de resfriamento e aquecimento (FEI Company, Hillsboro, Oregon, Estados Unidos) foi utilizado para a análise da amostra. Para a realização das medidas 5,0 μL de amostra foram depositados em grids de cobre de 2 mm, o excesso de amostra foi removido e então foi seco por 48 h, a temperatura ambiente. As micrografias de varredura eletrônica foram obtidas usando um campo de emissão de microscopia eletrônica de varredura de 20.00 kV. A imagem obtida dos lipossomas foi obtida de uma varredura aleatória do stub.

3.5.4. Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

3.5.4.1. Preparação das amostras

3.5.4.1.1. PJOV56 em solução

Para a utilização da droga em solução, primeiramente, foi preparada uma solução-mãe concentrada 1M. Para tal, foi pesado a droga e, em seguida, esta foi solubilizada em DMSO (dimetil-sulfóxido). Para garantir a solubilização integral da droga, esta foi realizada sob agitação térmica. Em utilização posteriores, retirou-se uma alíquota da solução-mãe

concentrada, foi feita a agitação térmica para garantir a resuspensão de qualquer eventual precipitado e para a homogeneização da solução, e completou-se o volume com água milliQ até o volume respectivo para a concentração desejada. A droga solubilizada pode ser estocada em temperatura ambiente.

3.5.4.1.2. Rompimento da vesícula lipossomal

Para a determinação da concentração total de PJOV56 nos lipossomas (2 mg/ml) foi adicionado Triton X[®] (3% v/v) a uma alíquota da suspensão, mantendo em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para quebra dos lipossomas. Após esse período, a suspensão foi centrifugada para a separação das fases e uma alíquota foi coletada da fase aquosa para diluição com fase móvel. O fármaco livre foi determinado no sobrenadante após a centrifugação de outra alíquota da suspensão (14.000 rpm, 22.000g 30 minutos) e diluição em fase móvel para análise por CLUE.

3.5.4.2. Condições experimentais

A cromatografia líquida/espectrometria de massa por ionização por eletrospray (LC/ESI-MS) evoluiu para a ferramenta mais adequada e efetiva para a análise do metabolismo de fármacos (TOLONEM et. al., 2009). Foi estabelecido que a separação cromatográfica dos metabolitos dos picos da matriz endógena tem um papel vital na identificação de metabólitos (CASTRO-PEREZ, 2009). Recentemente, a aplicação de partículas porosas e de medidas menores que 2µm ao processo de cromatografia líquida demonstrou induzir maior eficiência com altas taxas de fluxo, resultando em análises mais rápidas e melhor sensibilidade com base na curva Van Deemter (MORTISHIRE-SMITH, 2005). A cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC), utilizando uma coluna com partículas porosas de 1,7 µm, mostrou proporcionar melhores separações cromatográficas com sensibilidade e resolução aumentadas em um período de tempo muito mais rápido do que anteriormente (CASTRO-PEREZ, 2009).

Os espectrômetros de massa de baixa resolução, como a armadilha de íons linear (*ion trap*) e espectrômetros de massa triplo-quadrupolares (triplo-quadrupolo), podem ser usados para identificar metabolitos comuns, que são realizados usando uma verificação de espectrometria de massas completa. Além disso, técnicas de análise de cromatografia iônica extraída, técnicas de varredura de íons precursores (PI) e perda neutra (NL) também podem

ser realizadas com espectrometros de massa de íons linear (*ion trap*) e espectrômetros de massa triplo-quadrupolares (triplo-quadrupolo) ou híbridos (TOLONEM et. al., 2009). No entanto, é sabido que em baixas concentração ou em utilização de metabólitos incomuns podem ser ignorados usando esses instrumentos. Os estudos de identificação de metabólitos foram grandemente melhorados pela disponibilidade de espectrômetros de massa modernos que são rotineiramente capazes de fornecer resolução e precisão moderadas. A espectrometria de massa de resolução moderada (MRMS), como a captura de íons por tempo de voo (IT-TOF) e triplo-quadrupolo/tempo de voo (QTOF), pode ser empregada para a determinação de fórmulas moleculares de metabólitos e suas fragmentos de massa precisos para auxiliar na caracterização estrutural. No entanto, há uma grande desvantagem para os instrumentos MRMS, que é a falta de capacidade para realizar análises verdadeiras de varredura PI ou NL para detectar metabolitos incomuns (ZHU et. al., 2007).

Recentemente, uma técnica de filtro de defeito de massa, que pode remover íons interferentes endógenos das matrizes complexas (ou seja, urina, plasma e bile) foram utilizadas para detectar metabolitos de fármacos através do processamento pós-aquisição de dados LC/ESI-QTOF-MS de resolução moderada (ZHU et. al., 2007 e MORTISHIRE-SMITH, 2009) Esta técnica revela o verdadeiro poder da resolução moderada e massa precisa para identificação de metabólitos. Além disso, uma abordagem superior, chamada MSE (onde E representa energia de colisão), foi aplicada para detectar e identificar metabólitos de drogas (WRONA et. al., 2005 e BATEMAN et. al., 2007). A função MSE pode adquirir mais informações com uma única injeção de amostra. A primeira verificação dos íons intactos na amostra usa uma energia de colisão baixa e a segunda varredura para os íons fragmentos da varredura anterior usa uma energia de colisão em rampa, o que é equivalente a um espectrometro de massa *in tandem* não seletivo (MS/MS) (BATEMAN et. al., 2007). O software está disponível para auxiliar a análise de dados de LC/MS para identificar metabolitos de drogas (TOLONEM et. al., 2009 e CASTRO-PEREZ, 2009). Metabolynx™ é um software que é capaz de identificar automaticamente metabolitos comuns e incomuns, comparando LC/ESI-QTOF e dados da espectrometria de massas da amostra e controle. (CASTRO-PEREZ, 2009; MORTISHIRE-SMITH et. al., 2005 e TILEER et. al., 2008).

Para a quantificação efetiva de PJOV56 no sobrenadante, as separações cromatográficas foram realizadas com uma coluna ACQUITY UPLC™ BEH C18 (tamanho de partícula de 50mm×2,1mm, 1,7µm, Waters Company, Milford, MA, EUA) utilizando um

sistema ACQUITY UPLC™ (Waters Co.) equipado com um sistema binário de distribuição de solvente e um auto-amostrador. A coluna foi mantida a 30 °C. A fase móvel consistiu em 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂) em água (H₂O) como solvente A e 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂) em acetonitrila (C₂H₃N) como solvente B. O programa de eluição com gradiente foi: 0 - 2,5 minutos, um gradiente linear de 2% a 5% de B; 2,5 - 7,5 minutos, um gradiente linear para 30% de B; 7,5 - 9,0 minutos, um gradiente linear para 100% de B; 9,0 - 11,5 minutos, 100% de B; 11,5 - 15 minutos, um gradiente linear para 2% de equilíbrio de B da coluna a um vazão de 0,3 mL.min⁻¹. O volume da amostra de teste injetada foi de 10 µL. Cada ciclo de lavagem consistiu em 200 µL de solvente de lavagem forte (90% de C₂H₃N/H₂O, 9:1, v/v) e 600 µL de solvente de lavagem fraco (10% de C₂H₃N/H₂O, 1:9, v/v).

O sistema UPLC foi acoplado a um SYNAPT™ HDMS™ híbrido (Waters, Manchester, Reino Unido) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e foi controlado pelo software MassLynx™ (Versão 4.1). As condições típicas da fonte para a intensidade máxima de íons precursores foram as seguintes: tensão capilar, 3,0 kV; temperatura da fonte, 100 °C; temperatura de dessimulação, 300 °C; fluxo de gás cone (N₂), 30L/h; taxa de fluxo de dessolvatação (N₂), 600L/h. A pressão do argônio na célula de colisão foi de 3,5×10⁻³ mbar. A fonte ESI foi operada no modo de ionização positiva. Os dados foram adquiridos de 50 a 2000 Da e centralizados durante a aquisição usando uma referência externa compreendendo uma solução de 1 ng/µL de leucina encefalina infundida a 50 µL/min, gerando um íon de referência no modo ESI⁺ em m/z. As transições MS/MS otimizadas, bem como tensões de cone específicas e energias de colisão. A calibração foi realizada para obter um erro de precisão aceitável de ± 5 ppm.

3.5.4.3. Validação do método analítico

O protocolo de validação foi estabelecido de acordo com o método proposto pela ANVISA (BRASIL, 2003), baseado em valores definidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (intra-dia e inter-dia), repetibilidade, limites de detecção e quantificação. Com o objetivo de monitorar e quantificar a PJOV56 presente em amostra, de maneira precisa e eficiente, levando em consideração todos os parâmetros avaliados.

3.5.4.3.1. Seletividade

Esse parâmetro é capaz de determinar de maneira inequívoca a presença de um analito e outras substâncias que possam interferir na determinação. A determinação da pureza dos picos de quinoxalina foi avaliada através da comparação dos espectros de ultravioleta obtidos dos picos cromatográficos, por meio do software Shimadzu LC Solution. Picos com espectros de ultravioleta (254 a 400 nm) com similaridade maior que 95% foram considerados puros.

3.5.4.3.2. Linearidade

Para determinação da linearidade foi usado o coeficiente de correlação (r^2) obtido pela regressão linear da concentração de PJOV56. Para a construção da curva analítica foi usado um padrão externo, com sete diferentes pontos de concentração (50; 100; 250; 500; 750; 1000 e 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em triplicata. Gerando uma equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde, y é a variável dependente; x a variável independente, a o coeficiente angular e b o coeficiente linear. Foram aplicados os testes estatísticos t-Student e teste F a um nível de confiança de 95%, para dar maior confiabilidade aos dados da calibração da curva e regressão linear. Os cálculos estatísticos foram conduzidos através das equações:

$$S^2a = \frac{S^2y \cdot n}{D}$$

$$S^2b = \frac{S^2y \cdot \sum(x^2i)}{D}$$

$$S^2y = \frac{\sum(d^2i)}{n - 2}$$

Onde, Sa é o desvio padrão do coeficiente angular (a); Sb é o desvio padrão do coeficiente linear (b); Sy é o desvio padrão no eixo y; xi é o valor individual de x; n é o número total de pontos na curva; di é o desvio vertical de cada ponto; D é o determinante dado por:

$$\begin{vmatrix} \sum(x^2_i) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix}$$

A partir dos cálculos dos diferentes desvios padrões, foram calculados os valores de $t_{calc(a)}$, $t_{calc(b)}$ e F_{calc} de acordo com as equações:

$$t_{calc(a)} = \frac{|1 - a|}{S_a}$$

$$t_{calc(b)} = \frac{|b|}{S_b}$$

$$F_{calc} = \frac{\frac{S_y}{1}}{\frac{\sum d_i}{3}}$$

Se $t_{calculado} > t_{tabelado}$ o parâmetro é significativo a um nível de confiança de 95% e deve permanecer na equação da curva, porém se $t_{calculado} < t_{tabelado}$ o parâmetro não possui significância e pode ser excluído da equação da curva sem nenhum prejuízo. Todavia, o mesmo procedimento é aplicado ao teste F, onde valores de $F_{calculado} > F_{tabelado}$ são valores significativos a um nível de 95% de confiança para regressão linear, valores de $F_{calculado} < F_{tabelado}$ não possuem significância, portanto, não existe relação linear entre os eixos x e y, independente de valores para o coeficiente de correlação (r^2).

3.5.4.3.3. Precisão

Para determinação da precisão do método usando padrão externo, foi avaliada a reprodutibilidade dos 7 diferentes pontos de concentração (50; 100; 250; 500; 750; 1000 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A repetibilidade dos pontos intra-dia foi determinada em triplicata e suas médias analisadas no mesmo dia e posteriormente analisada em dias diferentes (inter-dia). A precisão foi obtida em função dos desvios padrões e coeficientes de variação, de acordo com as equações:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Onde S é o desvio padrão, n o número de medidas, x_i é a diferença entre cada valor medido e \bar{x} é a média.

3.5.4.3.4. Repetibilidade

A repetibilidade expressa o quão fiel é o método nas mesmas condições operacionais em curto intervalo de tempo. Um ponto intermediário da curva de calibração, de concentração conhecida, foi injetado. Os tempos de retenção e as áreas obtidas foram usados para calcular o desvio padrão e os coeficientes de variação.

3.5.4.3.5. Limite de Detecção e Quantificação – LD e LQ

Os limites de detecção e quantificação foram estimados de acordo com a concentração mínima para cada parâmetro, segundo as equações a seguir. Portanto, para o limite de detecção (LOD) foi estabelecida uma concentração que consegue diferenciar um analito de um ruído. Para o limite de quantificação (LOQ) a concentração mínima estabelecida é aquela capaz de quantificar com exatidão e fidelidade um analito.

$$LOD = 3,3 \cdot \frac{S_b}{a}$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{S_b}{a}$$

Onde, S_b é o desvio padrão da intersecção do eixo Y e a é o coeficiente angular da curva da calibração (RIBANI et al., 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Levantamento bibliográfico

Para a busca utilizando apenas o termo “liposom*” ou “lipossom*” no banco de dados Web of Science foram encontrados 68.524 artigos publicados entre 1946 e outubro de 2017. Utilizando a palavras-chave “liposom*” e “*drug delivery*” ou “lipossom*” e “*drug delivery*” foram encontrados 11.515 artigos publicados; para “liposom*” e “nano*” ou “liposom*” e “nano” foram encontrados 13.027 artigos. Buscas com outras combinações de palavras-chave, como “liposom*” e “terapia” ou “liposom*” e “*therapy*” foram encontrados 14.306 artigos publicados e buscando por “liposom*” e “nano*” e “terapia” ou “liposom*” e “nano*” e “*therapy*” foram encontrados 3.991 artigos, todos esses dados estão demonstrados no Tabela 1. A partir das palavras-chaves “liposom*” e “nano*” e “terapia” ou “liposom*” e “nano*” e “*therapy*” foram realizadas diversas buscas acerca das áreas do conhecimento onde esses artigos foram publicados, ano de publicação, países e autores.

Palavras-chave	Nº de artigos
“liposom*” ou “lipossom*”	68.524
“liposom*” e “ <i>drug delivery</i> ” ou “lipossom*” e “ <i>drug delivery</i> ”	11.515
“liposom*” e “nano*” ou “lipossom*” e “nano*”	13.027
“liposom*” e “ <i>therapy</i> ” ou “lipossom*” e “terapia”	14.306
“liposom*” e “nano*” e “ <i>therapy</i> ” ou “lipossom*” e “nano*” e “terapia”	3.991
TOTAL	111.363

Tabela 1. Resultados do levantamento bibliográfico utilizando-se diferentes iscas e combinações destas com o uso de modificadores de busca. Elaborado pelo autor.

Pode-se inferir a partir da Tabela 1 que apesar de haver muitos artigos publicados sobre a temática de lipossomas, é notória a pequena quantidade de artigos que relacionam lipossomas, nanotecnologia e terapia, visto que menos de 4% do total de artigos publicados abordam tal tema.

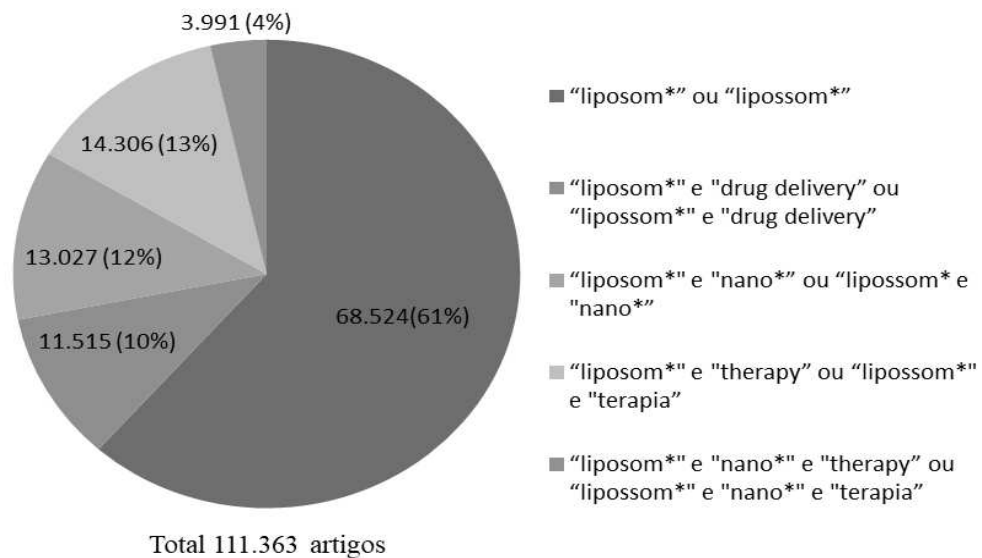


Gráfico 1. Resultados numéricos e percentuais do levantamento bibliográfico utilizando-se diferentes iscas e combinações destas com o uso de modificadores de busca. Elaborado pelo autor.

A ferramenta “Analyze Results” da plataforma Web of Science foi utilizada para visualizar o número de artigos sobre lipossomas, nanotecnologia e terapia publicados por ano. Elaborou-se então um *ranking* acerca dos resultados pela categoria “Publication Years” e obteve-se uma tabela com o número de artigos e seu respectivo ano de publicação. A partir desta, foi construída o Gráfico 2. Artigos científicos relacionados a lipossomas têm sido publicados desde 1996, com apenas 3 artigos. Como pode ser observado no Gráfico 2, os artigos publicados relacionados a lipossomas tiveram um aumento exponencial entre os anos de 2001 e 2017, todavia, antes disso, entre os anos de 1996 e 2001, apresentou oscilações de aumento e diminuição no número de publicações. Nos últimos 5 anos teve-se uma média de cerca de 508 artigos publicados a respeito do tema por ano e até outubro de 2017 foram publicados 547 artigos.

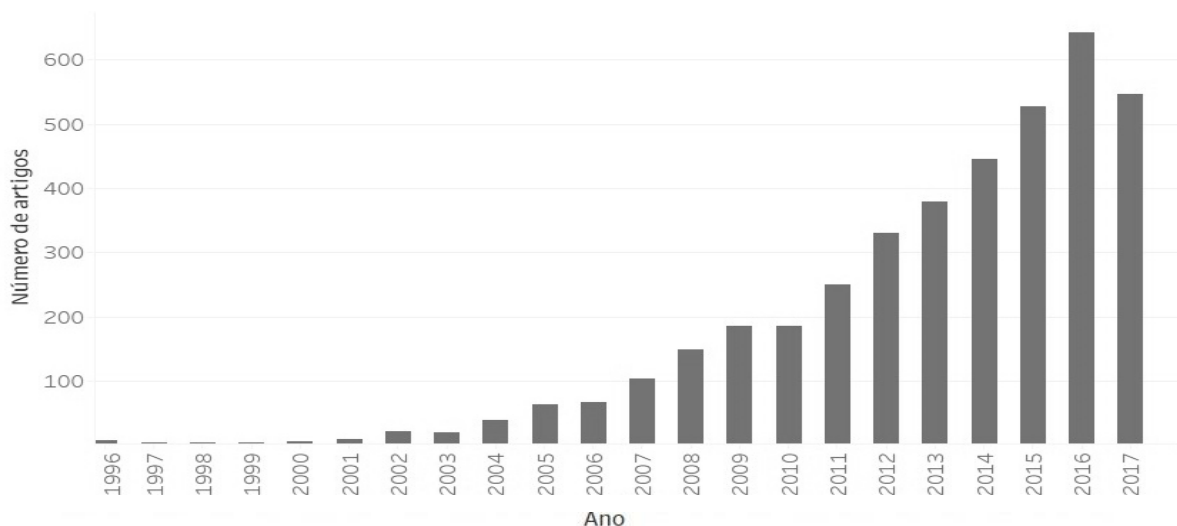


Gráfico 2. Relação do número de artigos por ano de publicação. Elaborado pelo autor.

Para refinar ainda mais as pesquisas, utilizou-se o “Analyze Results” e desta vez foram selecionadas 10 áreas que mais continham artigos publicados com as palavras chaves “lipossom*” e “nano*” e “terapia” ou “liposom*” e “nano*” e “therapy”.

As áreas que mais continham artigos publicados foram: Farmácia e Farmacologia (1.534 artigos; 24,65%); Química (1.087 artigos; 17,47%); Tecnologia em Ciências e outros tópicos (913 artigos, 14,67%); Ciência dos Materiais (899 artigos; 14,45%); Pesquisa em Medicina Experimental (356 artigos; 5,72%); Bioquímica e Biologia Molecular (329 artigos; 5,29%); Engenharia (311 artigos; 5,00%); Oncologia (279 artigos; 4,48%); Física (264 artigos; 4,24%) e Biotecnologia aplicada à Microbiologia (250 artigos; 4,02%). Todos esses resultados estão demonstrados no Gráfico 3. A partir desses resultados é possível inferir que as áreas que mais publicam artigos científicos contendo as palavras-chave previamente escolhidas são Farmácia e Farmacologia, visto que essas áreas tem um grande enfoque em medicamentos e sua administração. Pode-se observar também que os lipossomas embora tenham um amplo espectro de aplicação, estes possuem um grande apelo relacionado à saúde humana, constituindo uma *trend* das ciências aplicadas à saúde.

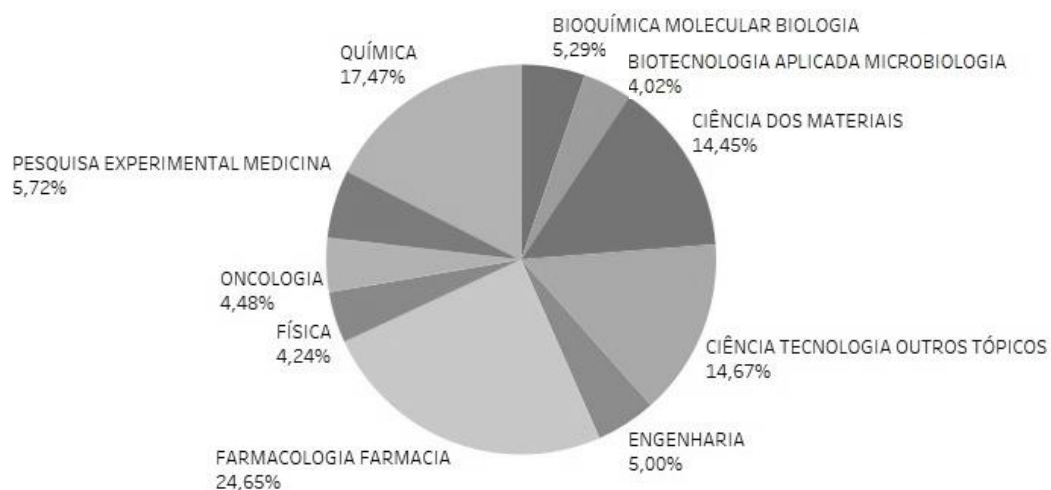


Gráfico 3. Relação do número de artigos publicados sobre lipossomas com áreas do conhecimento. Elaborado pelo autor.

Buscando-se elaborar um panorama dos países que mais publicam sobre o tema, foi

feita uma pesquisa utilizando as mesmas palavras chaves “lipossom*” e “nano*” e “terapia” ou “liposom*” e “nano*” e “therapy” e desta vez utilizando o “Analyze Results” pela opção países. Foram selecionados 20 países que tiveram mais artigos publicados, para que o Brasil estivesse dentro do escopo. O resultado encontrado foi de que o país que mais publica é os Estados Unidos da América (1.154 artigos), seguido do China (985 artigos), logo após Índia (335 artigos); Japão (275 artigos); Coreia do Norte (173 artigos); Itália (167 artigos); França (161 artigos); Alemanha (159 artigos); Inglaterra (140 artigos); Canadá (120 artigos); Taiwan (113 artigos); Holanda (103 artigos); Espanha (99 artigos); Irã (95 artigos); Brasil (86 artigos); Austrália (76 artigos); Singapura (65 artigos); Israel (58 artigos); Portugal (50 artigos) e Suíça (44 artigos). Todos esses resultados são mostrados no Gráfico 4. A partir desses resultados, vemos uma grande diferença entre os Estados Unidos e os outros países, visto que sozinho o mesmo tem muito mais que os demais países analisados. Todavia, a China possui uma produção científica tão boa quanto a americana. Haja visto, é possível constatar também que o Brasil tem muito a crescer, pois, atualmente ocupa somente a 15^o posição dos países que mais publicam com o tema, tendo 86 artigos. Por meio do Figura 14 é possível ver a distribuição mundial dos artigos publicados por meio do gráfico de densidade, que mostra no mapa, a distribuição mundial dos países produtores de ciência acerca de lipossomas.

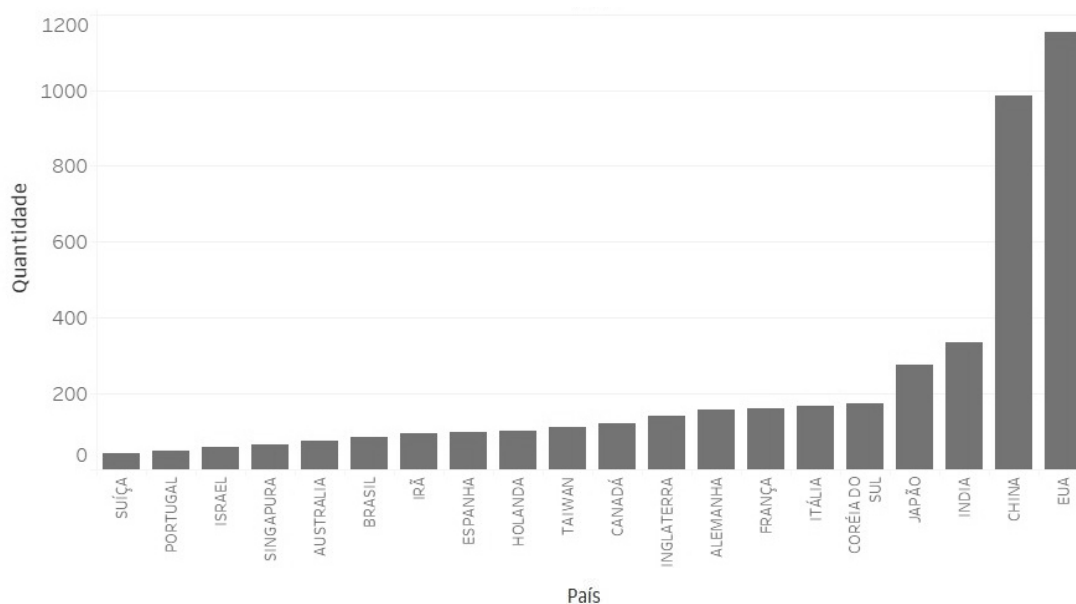


Gráfico 4. Relação do número de artigos publicados sobre lipossomas por país. Elaborado pelo autor.



Figura 14. Densidade do número de artigos publicados sobre lipossomas por país. Elaborado pelo autor.

Ainda sobre a utilização da ferramenta “Analyze Results” foi possível elaborar um *ranking* dos 10 primeiros autores que mais publicaram acerca do tema, e as palavras utilizadas foram as mesmas “lipossom*” e “nano*” e “terapia” ou “liposom*” e “nano*” e “therapy”. Os resultados obtidos constituem a tabela 3 mostrada abaixo.

COLOCAÇÃO	AUTOR	NACIONALIDADE	Nº DE ARTIGOS
1º	HARASHIMA H.	Japonês	60
2º	LIU Y.	Estadunidense	36
3º	ZHANG Y.	Chinês	34
4º	STORM G.	Holandês	32
5º	ZHANG L.	Chinês	32
6º	ZHANG Q.	Chinês	32
7º	HUANG L.	Estadunidense	30
8º	WANG Y.	Chinês	29
9º	ZHANG X.	Chinês	29
10º	WANG H.	Chinês	28

Tabela 2. Ranking dos autores, nacionalidades e número de artigos publicados sobre lipossomas. Elaborado pelo autor.

Pode-se observar que a diferença do autor que mais produz para o segundo lugar é quase o dobro. Contudo, do segundo ao décimo, o número de artigos é bastante próximo, não demonstrando nenhuma discrepância. Pode-se notar também que o autor que mais publica, HARASHIMA H. que é japonês, não é do país que mais publica, que no caso é os Estados

Unidos. Os demais autores, em sua maioria são dos países que mais publicam, Estados Unidos e China, sendo que os autores chineses possuem uma representatividade melhor, em detrimento dos autores estadunidenses. É interessante verificar que o país do quarto colocado, STORM G., a Holanda, não figura como um dos primeiros que publicam artigos sobre a temática, todavia, sua produção científica é substancial na área.

4.2. Prospecção Tecnológica

4.2.1. Busca no USPTO

Para a busca utilizando apenas o termo “*liposome*” no resumo da patente, foram encontrados, ao total, 913 patentes concedidas entre 1976 e outubro de 2017. A pesquisa foi então refinada, adicionando-se diferentes conjuntos de palavras-chave de forma a encontrar patentes relacionados a lipossomas como agentes terapêuticos. Foram encontradas 80 patentes para os termos “*liposome*” e “*nano*”; 508 patentes para “*liposome*” e “*therapy*”; 457 patentes para “*liposome*” e “*drug delivery*” e 59 patentes para “*liposome*” e “*nano*” e “*therapy*”. A Tabela 3 sumariza o resultado da pesquisa, mostrando a representatividade de cada conjunto de palavras-chave. É importante ressaltar que pode haver sobreposição de patentes contidas em dois ou mais conjuntos.

PALAVRAS-CHAVES	QTD. DE PATENTES ENCONTRADAS
" <i>liposome</i> "	913
" <i>liposome</i> " and " <i>nano</i> "	80
" <i>liposome</i> " and " <i>therapy</i> "	508
" <i>liposome</i> " and " <i>drug delivery</i> "	457
" <i>liposome</i> " and " <i>nano</i> " and " <i>therapy</i> "	59

Tabela 3. Número de patentes depositadas no USPTO, desde 1976. Elaborado pelo autor.

Para comparar-se o número de patentes concedidas entre diferentes países, para cada termo pesquisado no USPTO, usou-se o código ICN, referente ao país do inventor da patente, seguido do código padrão de duas letras referente a cada um dos 10 países escolhidos, a escolha foi feita baseando-se nos países que continham mais artigos publicados, como mostrado no Gráfico 4. Dentre os países pesquisados, os Estados Unidos foi o país líder em patentes encontradas para o termo pesquisado “*lipossom**” e “*nano**” e “*terapia*” ou

“liposom*” e “nano*” e “therapy” seguido pela China, Índia, Japão, Coreia do Sul, Itália, França, Alemanha, Inglaterra e Canadá. Embora o Brasil não figure entre os dez primeiros países que publiquem acerca da temática acima supracitada, resolveu-se inclui-lo na análise.

O Brasil não apresentou nenhuma patente neste banco relacionado a “liposom*” e “nano*” e “terapia” ou “liposom*” e “nano*” e “therapy”, o que demonstra que os trabalhos desenvolvidos no Brasil com essa temática não são patenteados nos Estados Unidos. Os Estados Unidos, como esperado, assumem a liderança com uma grande diferença para os demais, chegando a ser mais de três vezes maior que o segundo país que mais deposita em seu banco de patentes.

A partir desses resultados, é possível notar que apenas uma pequena parte do que é produzido e publicado em formato de artigo científico é transformado em patentes. Haja visto que, os Estados Unidos possuem mais de 1.154 artigos relacionados ao tema e no seu banco de dados possui apenas 37 patentes, ou seja, representando em torno de 3% do que é produzido como artigo torna-se patente. Outro fato notório é a classificação dos países comparada com o ranque dos países em relação ao número de artigos publicados. Pode-se notar uma grande diferença, a exemplo da China que é o 2º país que mais publica, como 985 artigos, e possui apenas 2 patentes concedidas no banco americano.

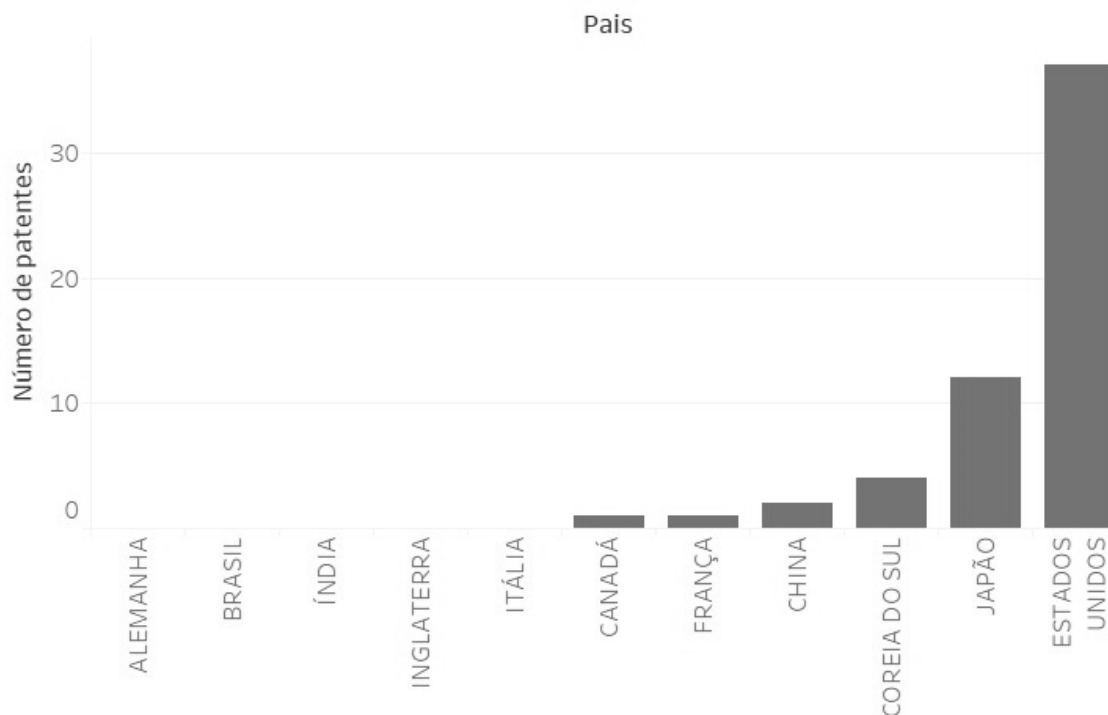


Gráfico 5. Número de patentes depositadas no banco USPTO por países. Elaborado pelo autor.



Figura 15. Número de patentes depositadas no banco USPTO por países. Elaborado pelo autor.

Buscando analisar os resultados obtidos por ano, coletou-se todas as 59 patentes com as palavras-chaves para “liposome” e “nano” e “therapy”. Em resumo, e fez-se uma lista no Excel, visto que os 4 primeiros números da patente representam o ano da mesma, cortou-se utilizando a ferramenta “texto para coluna” na aba dados, após utilizou-se a fórmula “cont.se” do mesmo software para contar a quantidade de patentes por ano, como demonstrado na Gráfico 6. Observou-se que há registro de patentes com o tema pesquisado neste banco somente a partir do ano de 2002, tendo apenas 1 patente registrada nesse mesmo ano, e a partir de então houve período escasso e depósitos até 2011. Contudo, a partir do ano de 2012 houve um aumento no número de patentes depositadas, embora houvesse períodos de alta e quedas intercalados até 2015. Após esse ano, o número de patentes voltou a subir ano após ano, até 2016.

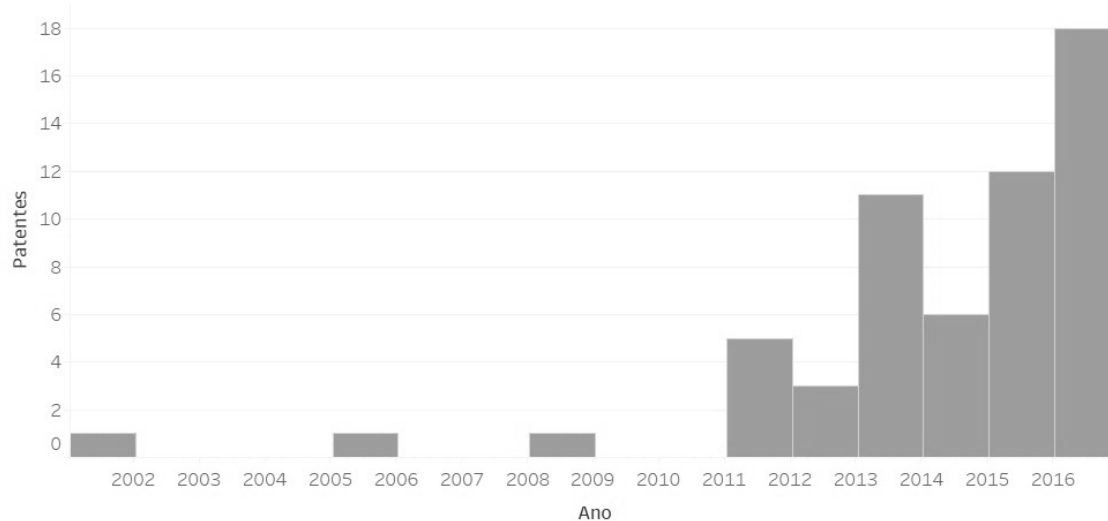


Gráfico 6. Número de patentes depositadas no banco USPTO por ano. Elaborado pelo autor.

4.2.2. Busca no EPO/ESPACENET

Para a busca utilizando apenas o termo “liposom*” que estivesse contido no título ou resumo, foram encontrados, ao total, 9.857 patentes concedidas. A pesquisa foi então refinada, adicionando-se diferentes conjuntos de palavras-chaves de forma a encontrar patentes relacionados a lipossomas como agentes terapêuticos. Foram encontradas 765 patentes para os termos “liposom* e “*drug delivery*”; 1383 patentes para “liposom*” e “nano”; 749 patentes para “liposom*” e “*therapy*”; e 78 patentes para “liposom*” e “nano” e “*therapy*”. A Tabela 4 sumariza o resultado da pesquisa, mostrando a representatividade de cada conjunto de palavras-chave. É importante ressaltar que pode haver sobreposição de artigos patentes contidas em dois ou mais conjuntos.

PALAVRAS-CHAVES	QTD. DE PATENTES ENCONTRADAS
"liposom*"	9.857
"liposom*" e " <i>therapy</i> "	765
"liposom*" e "nano"	1.383
"liposom*" e " <i>drug delivery</i> "	749
"liposom*" e "nano" e " <i>therapy</i> "	78

Tabela 4. Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por palavra-chave. Elaborado pelo autor.

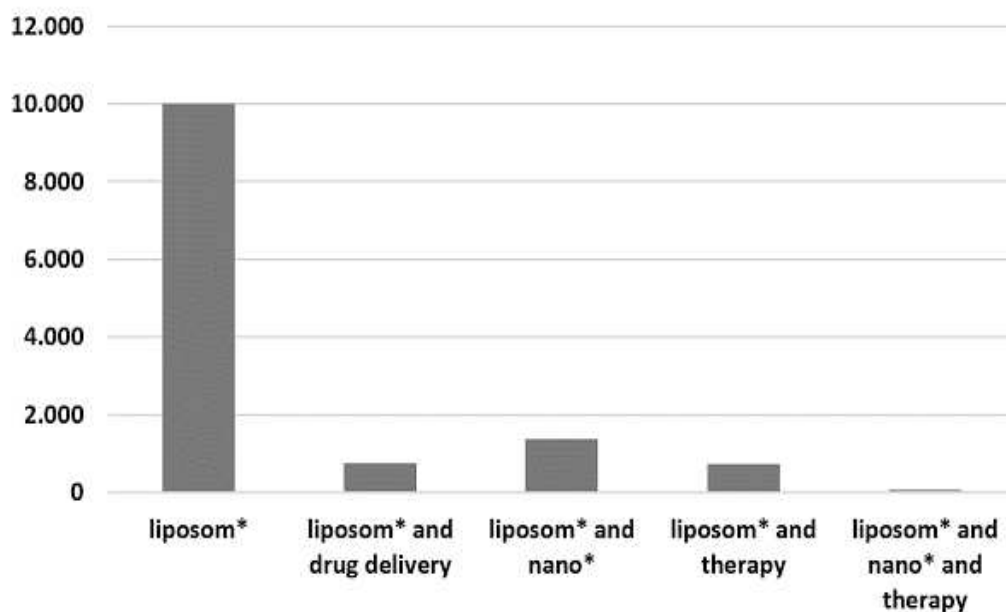


Gráfico 7. Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por palavra-chave. Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de analisar com mais detalhes, as patentes que foram encontradas com os termos “liposom*” e “nano” e “therapy”, clicou-se na opção “Select all”, após em “Export” no formato xls. Após fazer isso, fez-se um download de um arquivo do Excel com todos os dados da patente depositadas até dezembro de 2016. A partir dessa tabela, selecionou-se apenas a data de publicação e através da ferramenta texto para coluna, dentro da aba dados, realizou-se um corte apenas nos anos. Por fim, utilizou-se a fórmula *cont.se* para contar quantas patentes foram publicadas por ano.

O resultado mostra que, somente após 2005 o banco de patentes EPO/ESPACENET começou a receber patentes que abordam o tema pesquisado. É interessante salientar que o USPTO também começou a receber patentes sobre o tema um pouco antes, em 2002. Um crescimento notório no número de patentes deu-se a partir de 2009, todavia, houve oscilações nos anos seguintes, com altas e baixas na quantidade de patentes sobre a temática pesquisada. O ápice foi no ano de 2014, com 34 patentes, e de lá para cá, a quantidade de depósitos vem decrescendo.

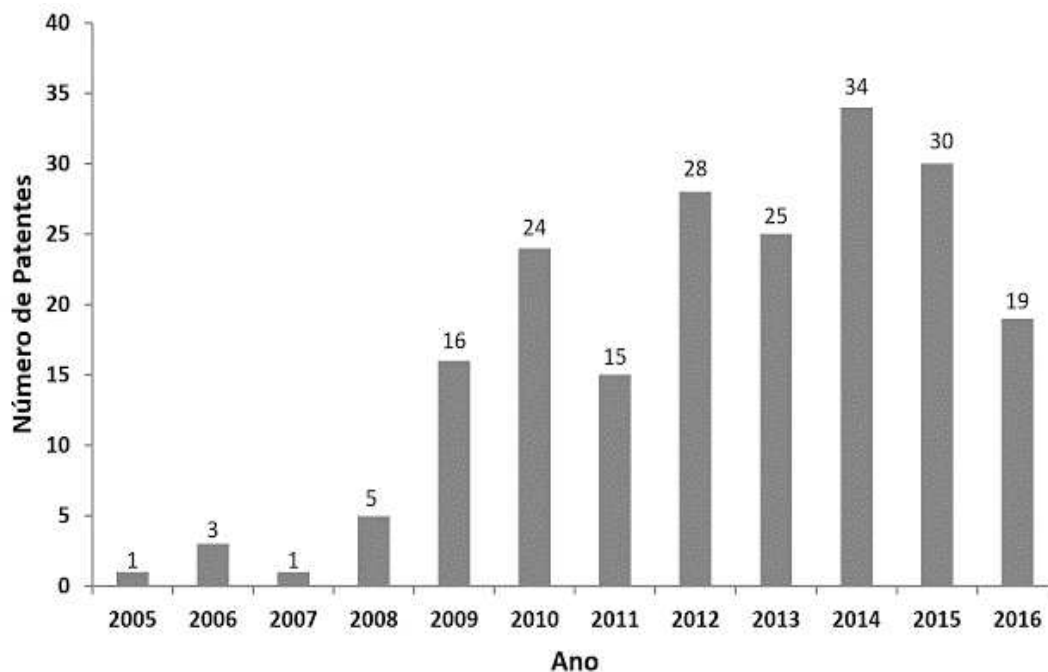


Gráfico 8. Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por ano. Elaborado pelo autor.

Para refinar ainda mais as pesquisas, buscou-se pelos países que patenteavam nesse banco no assunto abordado. Para isso, utilizou-se a mesma tabela que foi exportada, desta vez selecionando a coluna número de aplicação, visto que as duas primeiras letras representam os países de aplicação da patente, que no caso, todos são dos mesmos países dos inventores.

Não surpreendentemente, os Estados Unidos ocupa o primeiro lugar em número de patentes no assunto, com 74 patentes concedidas; em segundo lugar, vem a China com 45 patentes; em terceiro, República da Coreia com 18 patentes; em seguida, Japão com 16 patentes; Taiwan com 11 patentes; Índia, Nova Zelândia e Austrália com 3 patentes cada; e por fim, Canadá, Hong-Kong, Eslovênia e Alemanha, com 1 patente cada. Sabe-se que o investimento e incentivo à pesquisa nos Estados Unidos possui grande importância, onde grande parte de suas patentes são depositadas por Universidades ou Instituto de Pesquisas, ao contrário da maioria dos países onde as patentes costumam ser depositadas por grandes empresas.

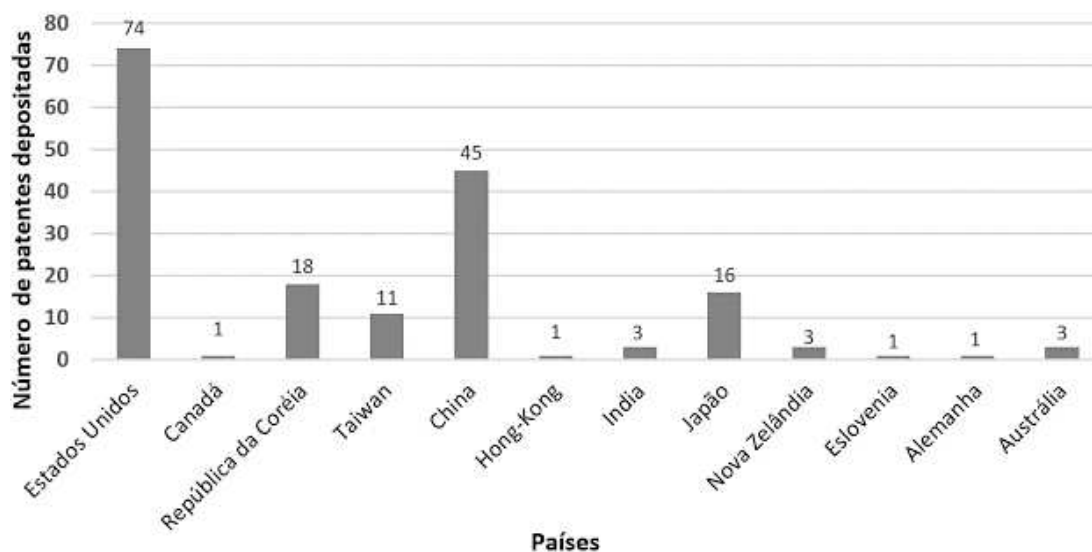


Gráfico 9. Número de patentes depositadas no EPO/ESPACENET por país. Elaborado pelo autor.

Nota-se que os Estados Unidos possui um resultado bem representativo nesse banco. O segundo colocado, a China demonstra um resultado expressivo no EPO/ESPACENET, com 45 patentes, em detrimento do USPTO, onde possui nenhuma patente, demonstrando a preferência chinesa pelo mercado europeu, em vez do mercado americano, visto que a mesma procura patentear seus produtos nos bancos europeus e não nos bancos americanos. O Brasil novamente não apresentou nenhuma patente concedida nesse banco.

Além de analisar os depósitos de patentes por países e por ano de publicação, esse trabalho também avaliou a classificação de patentes de acordo com sua aplicação, através do IPC (Classificação Internacional de Patentes). Os resultados gerados pelo Gráfico 10 mostram que a busca está distribuída entre 4 sessões: A – Necessidades Humanas; B - Operações de Processamento; Transporte; C – Química; Metalúrgica; e G - Física, no entanto, é possível observar que a maior utilização de patentes relacionadas à combinação de palavras-chave feitas neste trabalho está na área de necessidades humanas, a qual deteve 87% de aplicação.

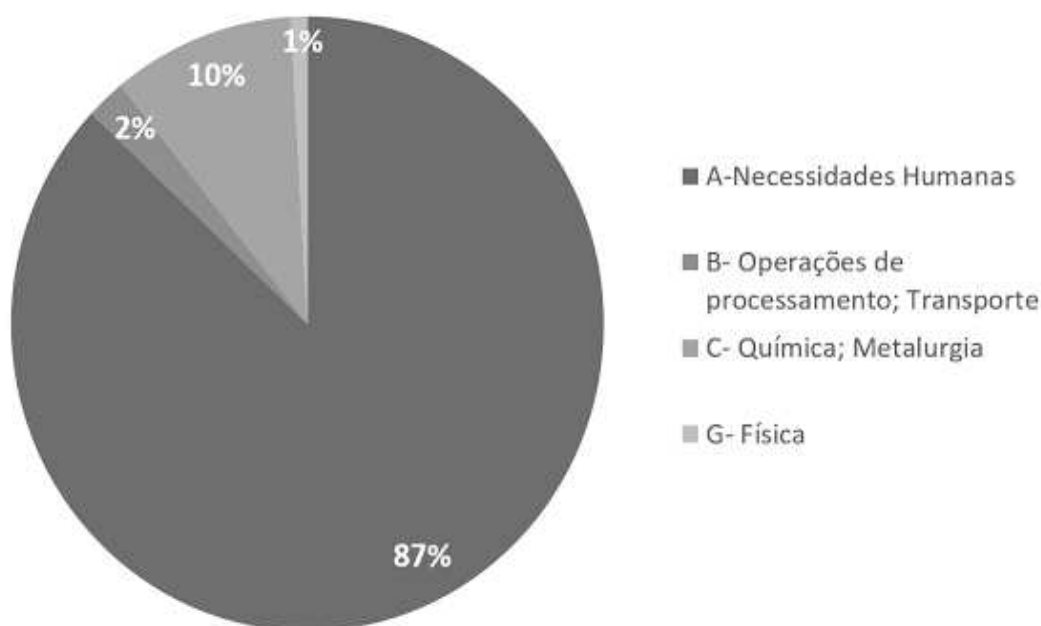


Gráfico 10. Distribuição de patentes segundo o IPC (International Patent Classification). Elaborado pelo autor

Os depósitos da classe A estão subdivididos em 16 subclasses. Dessas subclasses, todos os depósitos encontrados durante a busca estão alocados na subclasse A61, que versa acerca de ciências médicas, veterinárias; higiene, indicando que a maioria das patentes está direcionada para essa área. Essa subclasse, por sua vez, apresenta uma subdivisão, que é mostrada no Gráfico 11.

O maior número de patentes encontra-se na subdivisão A61K, que corresponde a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas (dispositivos ou métodos, especialmente adaptados para dar aos produtos farmacêuticos formas físicas determinadas ou para sua administração; aspectos químicos de medicamentos, ou uso de materiais para ataduras, curativos, absorventes ou artigos cirúrgicos; composições saponáceas, ou seja, essa subdivisão está muito relacionada com a administração de produtos farmacêuticos e materiais médico-hospitalares, mostrando que essas patentes estão direcionadas a essa área.

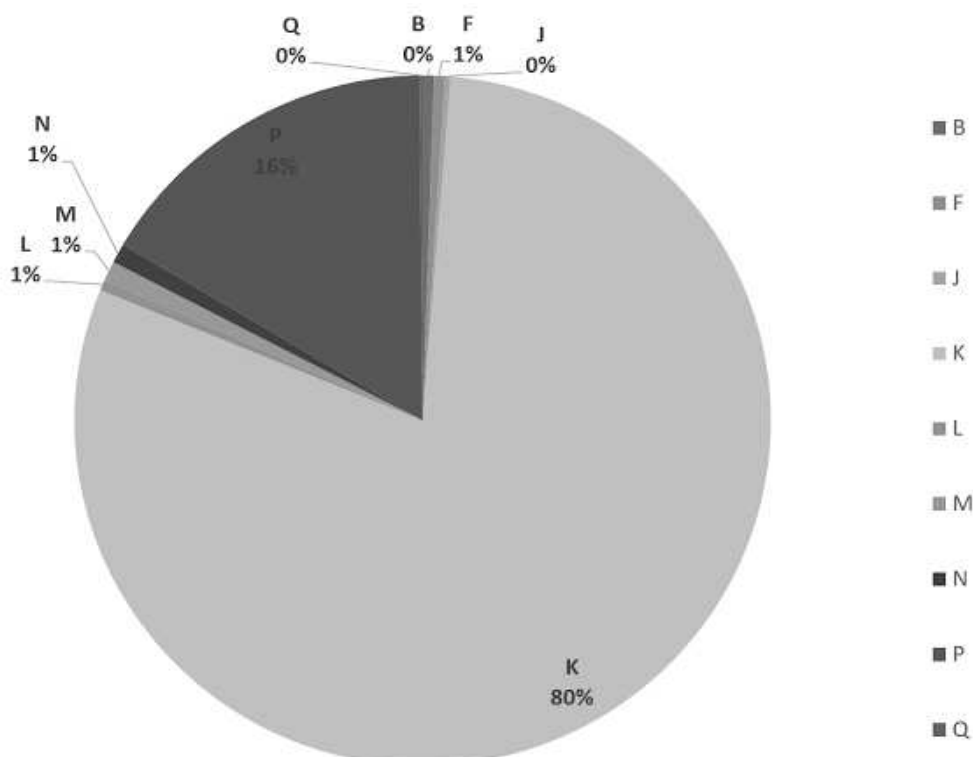


Gráfico 11. Subdivisão de patentes em uma macro-área segundo o IPC (International Patent Classification). Elaborado pelo autor. **A61B** - Diagnóstico; Cirurgia; Identificação; **A61C** - Odontologia; Aparelhos ou métodos para higiene oral ou higiene dental; **A61D** - Instrumentos, implementos, ferramentas ou métodos de veterinária; **A61F** - Filtros implantáveis nos vasos sanguíneos; Próteses; Dispositivos que promovem desobstrução ou previnem colapso de estruturas tubulares do corpo; Dispositivos ortopédicos, de enfermagem ou anticoncepcionais; Fomentação; Tratamento ou proteção dos olhos ou ouvidos; Ataduras, curativos ou almofadas absorventes; Estojos para primeiros socorros; **A61G** - Transporte, pessoal, ou acomodação especialmente adaptada para pessoas deficientes físicas; mesas ou cadeiras cirúrgicas; cadeiras de dentista; dispositivos para sepultamento **A61H** - Aparelhos de fisioterapia; Respiração artificial; Massagem; Dispositivos de banho para usos especiais terapêuticos ou de higiene ou partes específicas do corpo; **A61J** - Recipientes especialmente adaptados para finalidades médicas ou farmacêuticas; Dispositivos ou métodos especialmente adaptados para converter os produtos farmacêuticos em formas físicas especiais ou de administração; Dispositivos para administrar alimentos ou remédios por via oral; Chupetas de criança; Escarradeiras; **A61K** - Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas; **A61L** - Métodos ou aparelhos para esterilizar materiais ou objetos em geral; Desinfecção, esterilização ou desodorização do ar; Aspectos químicos de ataduras, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos; Materiais para ataduras, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos; **A61M** - Dispositivos para introduzir matérias no corpo ou depositá-las sobre o mesmo; Dispositivos para fazer circular matérias no corpo ou para dele as retirar; Dispositivos para produzir ou por fim ao sono ou à letargia; **A61N** - Eletroterapia; Magnetoterapia; Terapia por radiação; terapia por ultrassom; **A61P** - Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais; e **A61Q** - Uso específico de cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal.

A partir dos dados obtidos pela busca de patentes de lipossomas no banco de dados europeu EPO/ESPACENET, foi possível analisar que a maior parte dos inventores das patentes são norte-americanos, com um percentual aproximadamente de 38,5%, seguidos por coreanos, taiwaneses, canadenses, italianos, alemães e holandeses, como apresentado no Gráfico 12. Em relação à nacionalidade dos depositantes observa-se que predominam os norte-americanos, seguido pelos coreanos, taiwaneses, alemães, japoneses, canadenses e

singapurianos.

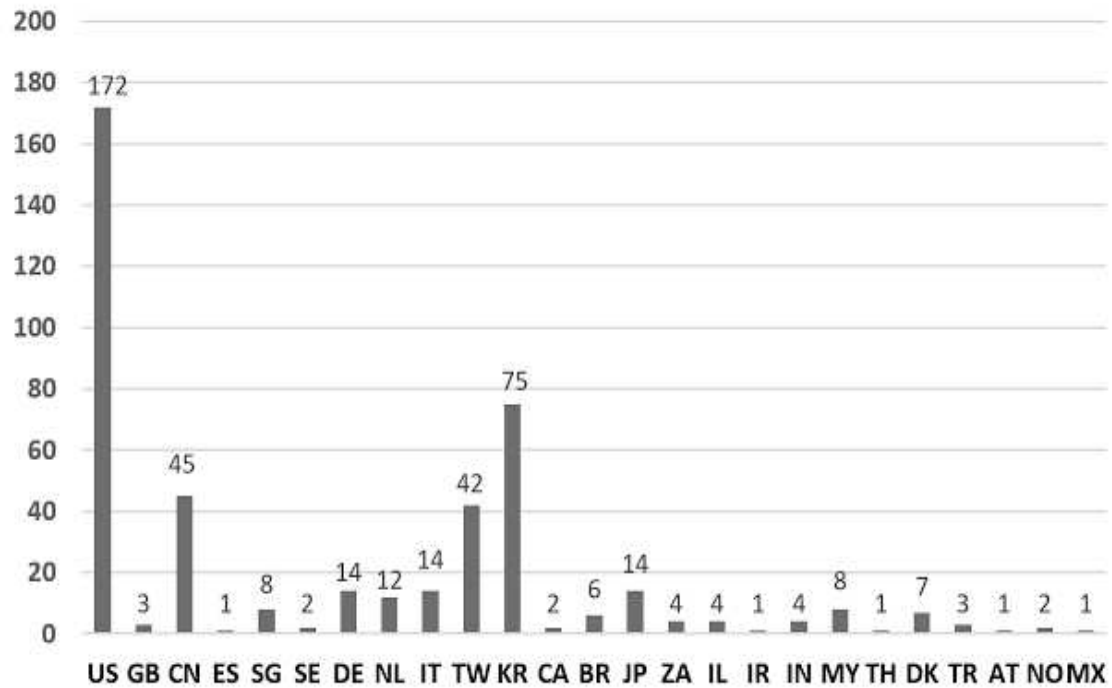


Gráfico 12. Nacionalidade dos Inventores das patentes depositadas no EPO (European Patents Office) até dezembro de 2016. Elaborado pelo autor. US = Estados Unidos; GB = Grã-Bretanha; CN = China; ES = Espanha; SG = Singapura; SE = Suécia; DE = Alemanha; NL = Países baixos; IT = Itália; TW = Taiwan; KR = República da Coreia; CA = Canadá; BR = Brasil; JP = Japão; ZA = África do Sul; IL = Israel; IN = Índia; MY = Malásia; TH = Tailândia; DK = Dinamarca; TR = Turquia; AT = Áustria; NO = Noruega; e MX = México.

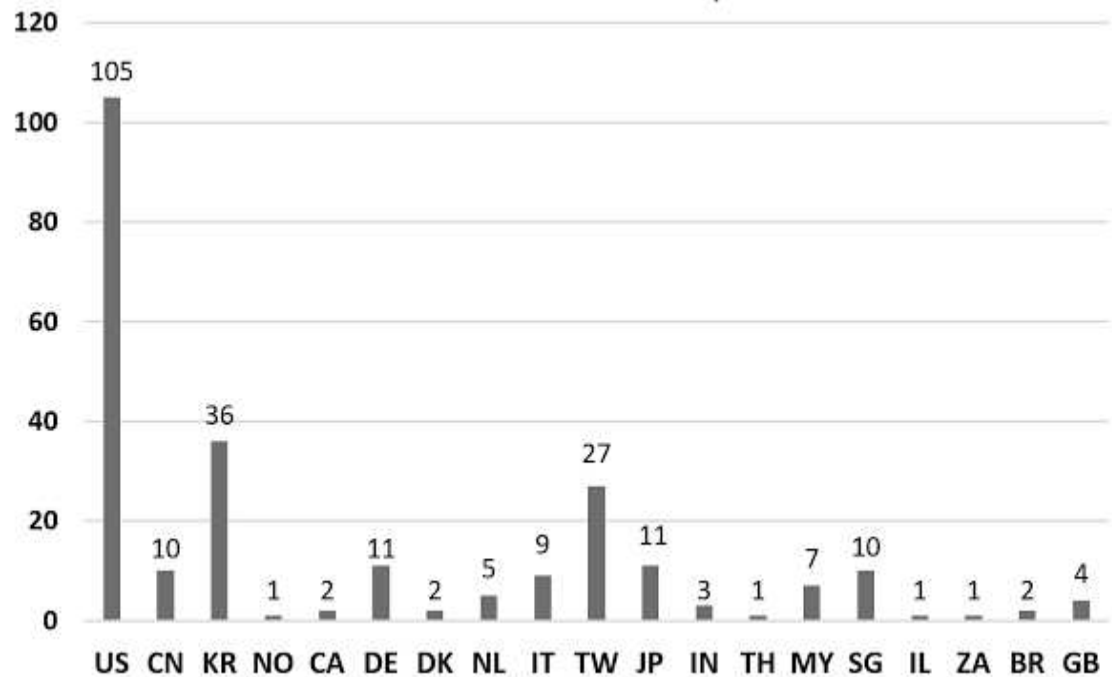


Gráfico 13. Nacionalidade dos Depositantes das patentes depositadas no EPO (European Patents Office) até dezembro de 2016. Elaborado pelo autor. US = Estados Unidos; CN = China; KR = República da Coreia; NO = Noruega; CA = Canadá; DE = Alemanha; DK = Dinamarca; NL = Países baixos; IT = Itália; TW = Taiwan; JP =

Japão; IN = Índia; TH = Tailândia; MY = Malásia; SG = Singapura; IL = Israel; ZA = África do Sul; BR = Brasil; e GB = Grã-Bretanha.

Apesar do Brasil não possuir patentes concedidas no EPO/ESPACENET, há seis inventores de nacionalidade brasileira, bem como, dois depositantes também da mesma nacionalidade. Fazendo uma pesquisa minuciosa, percebeu que os inventores e os depositantes constituem apenas uma patente, que tem como código US2015306035 e título “*Pharmaceutical composition containing conventional liposomes and prolonged-circulation liposomes for the treatment of visceral leishmaniasis*” (Figura 16). Vale ressaltar, que a patente não figura como concedida ao Brasil, uma vez que seu número de aplicação se inicia com as letras referentes aos Estados Unidos, figurando como patente inerente a este. Devido a isso, não apareceu nas análises gerais. Os depositantes constituem a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). Já os inventores constituem os pesquisadores e alunos da instituição de ensino já mencionada.

The screenshot displays the Espacenet Patent search results page for patent US2015306035 (A1). The page header includes the Espacenet logo and navigation options. The main content area shows the following bibliographic data:

Bibliographic data: US2015306035 (A1) — 2015-10-29	
Page bookmark	US2015306035 (A1) - PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING CONVENTIONAL LIPOSOMES AND PROLONGED-CIRCULATION LIPOSOMES FOR THE TREATMENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS
Inventor(s)	JEAN GEORGES FREZARD FREDERIC [BR]; GUILHERME AZEVEDO ERLY [BR]; RIO BIBEIRO RAUL [BR]; PERES DEMICHELI CYNTHIA [BR]; MAGNO DA SILVA SYDNEI [BR]; APARECIDA REZENDE SIMONE [BR] ±
Applicant(s)	UNIV MINAS GERAIS [BR]; FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS FAPEMIG [BR] ±
Classification	- international: A61K31/29; A61K9/127 - cooperative: A61K31/29; A61K31/555; A61K9/127; A61K9/1271
Application number	US201314384155 20130311 Global Dossier
Priority number(s)	BR20121005265 20120309 ; BR20131005601 20130308 ; WO2013BR00079 20130311
Also published as	JP2015509507 (A) WO2013131164 (A1)

Figura 16. Patente de responsabilidade da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

4.2.3. Busca no Web of Science

Para a busca utilizando apenas o termo “liposom*” foram encontrados, ao total, 11.144 patentes concedidas entre 1975 e 2016. A pesquisa foi então refinada, adicionando-se diferentes conjuntos de palavras-chaves de forma a encontrar patentes relacionados a

lipossomas como agentes terapêuticos. Foram encontradas 804 patentes para os termos "liposom*" e "therapy"; 534 patentes para "liposom*" e "nano"; 583 patentes para "liposom*" e "drug delivery"; e 21 patentes para "liposom*" e "nano" e "therapy". A Tabela 5 sumariza o resultado da pesquisa, mostrando a representatividade de cada conjunto de palavras-chaves. É importante ressaltar que pode haver sobreposição de patentes contidos em dois ou mais conjuntos.

PALAVRAS-CHAVES	QTD. DE PATENTES ENCONTRADAS
"liposom*"	11.144
"liposom*" e "therapy"	804
"liposom*" e "nano"	534
"liposom*" e "drug delivery"	583
"liposom*" e "nano" e "therapy"	21

Tabela 5. Número de patentes depositadas no banco de dados Web of Science utilizando diferentes palavras chaves. Elaborado pelo autor.

Como as patentes são documentos que não são permitidos ranquear pela categoria *Publication Years* através da ferramenta *Analyze Results*, fez-se necessário refinar a busca para os termos "liposom*" e "nano" e "therapy" para cada ano separadamente, a fim de visualizar o número de patentes sobre a lipossomas como agentes terapêuticos, desde 1975. Como pode ser observado na Gráfico 14, patentes relacionadas a lipossomas como agentes terapêuticos, têm sido publicadas desde 1975. Pode-se observar que apenas a partir de 1993, houve depósitos de patentes sobre a lipossomas como agentes terapêuticos. A quantidade de patentes não é tão expressiva se comparada com os demais bancos já analisados, totalizando apenas 21, bem como não apresenta uma constância de depósitos.

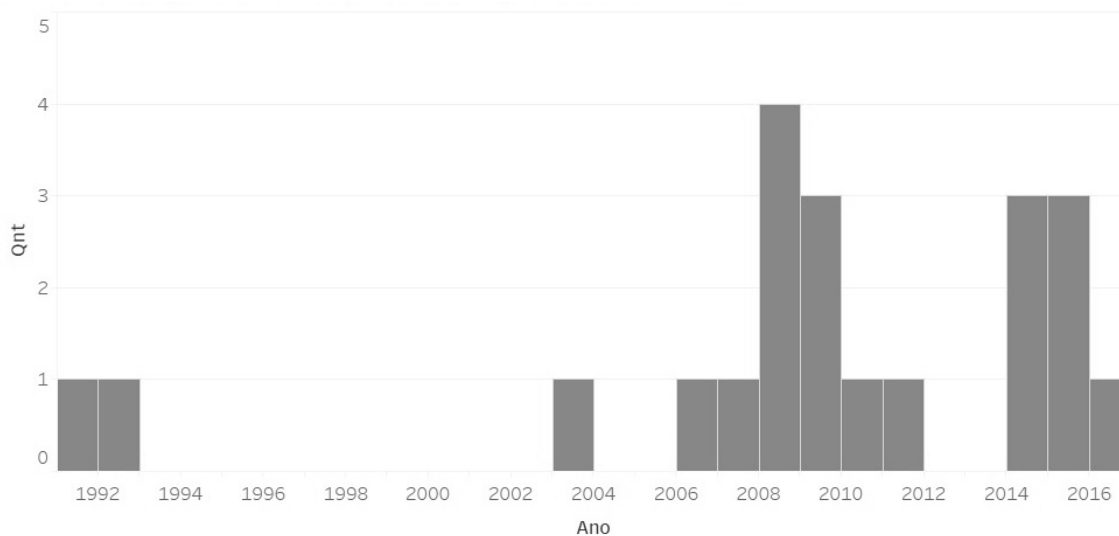


Gráfico 14. Número de patentes depositadas no banco de dados Web of Science por ano. Elaborado pelo autor.

A partir desses resultados pode-se realizar uma comparação com o número de artigos publicados por ano e as patentes depositadas. É possível constatar que, o número de artigos publicados não é diretamente proporcional ao número de patentes depositadas. Apesar de 642 artigos publicados no ano de 2016 na plataforma *Web of Science* acerca de lipossomas como agentes terapêuticos, apenas três patentes foram depositadas na mesma plataforma. Pode-se inferir, portanto, que boa parte dos artigos publicados, não chegam a tornar-se patentes.

Buscando comparar os autores que mais publicam artigos científicos com os que mais patenteiam no tema, fez-se uma busca dos autores que mais têm patentes concedidas. Pode-se observar na Tabela 6 que os autores que mais patenteia sobre o tema tem apenas 2 patentes, quando comparado com o autor que mais publica artigo (60 artigos publicados), logo, pode-se inferir que poucos trabalhos que são publicados em artigos se tornam em patente. Outro resultado alarmante é o fato de que nenhum dos 10 primeiros dos que mais publicam artigos estão entre os 10 que mais patenteiam, o que demonstra o maior interesse por parte dos pesquisadores em publicar artigo do que por patetejar suas pesquisas.

COLOCAÇÃO	AUTORES	Nº DE PATENTES
1º	CHANG C.	2
2º	LEE T.	2
3º	LEE T. W.	2
4º	YU C.	2
5º	YUC. Y.	2
6º	COESTER C.	1
7º	HSU W.	1

8º	RADIN D. N.	1
9º	DAYTON D.	1
10º	JANG Y.	1

Tabela 6. Relação entre os 10 principais inventores de patentes utilizando as palavras chaves “lipossom” e “nano” e “therapy” e a quantidade de patentes concedidas. Elaborado pelo autor.

4.2.4. Busca no INPI

Para a busca utilizando apenas o termo “lipossom*” que estivesse contido no resumo, foram encontrados, ao total, 226 patentes depositadas. Para os termos “lipossom*” e “*drug delivery*”, encontrou-se nenhuma patente; para “lipossom*” e “nano*”, encontrou-se 32 patentes; “lipossom*” e “terapia” 15 patentes e para “lipossom*” e “nano*” e “terapia” encontrou-se 3 patentes.

PALAVRAS-CHAVES	QTD. DE PATENTES ENCONTRADAS
"lipossom*"	226
"lipossom*" and "terapia"	0
"lipossom*" and "nano"	32
"lipossom*" and " <i>drug delivery</i> "	15
"lipossom*" and "nano" and "terapia"	3

Tabela 7. Número de patentes depositadas no INPI por palavra-chave até dezembro de 2016. Elaborado pelo autor.

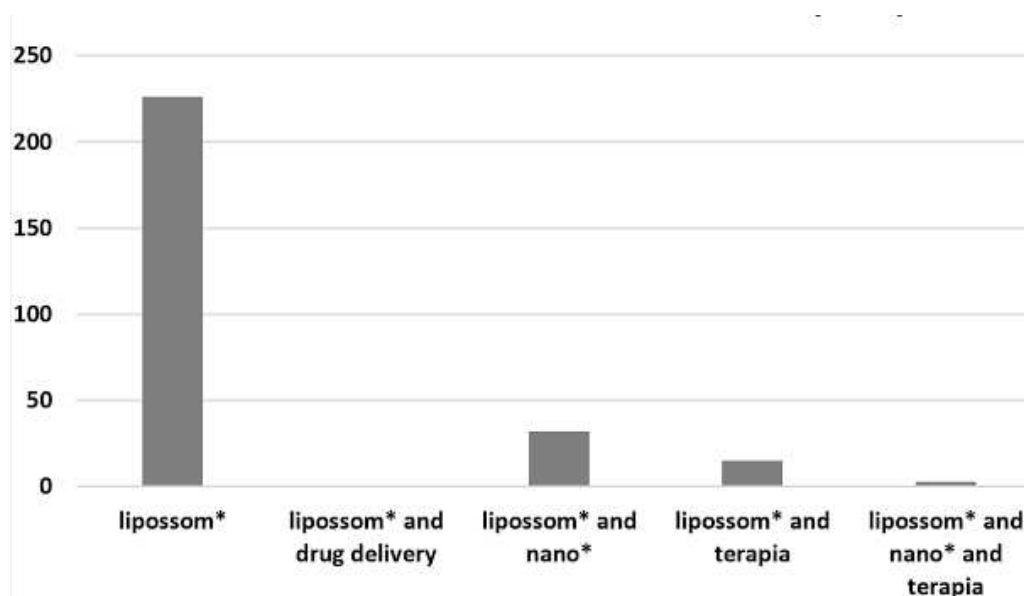


Gráfico 15. Número de patentes depositadas no INPI por palavra-chave. Elaborado pelo autor.

A Tabela 8 apresenta a quantidade de patentes depositadas no INPI durante vários

períodos no decorrer dos anos, utilizando o termo “lipossom*”. Através da busca no banco de dados foi possível observar que as primeiras patentes sobre os lipossomas foram depositadas na década de 1990, onde em 1991 a Chiron Corporation, empresa americana, depositou no Brasil a patente de uma composição de vacina em associação com um lipossoma. A partir desse ano várias patentes sobre os processos de produção de lipossomas foram depositadas e na década de 2000, o número de patentes depositadas no INPI dobrou, em contrapartida o número de patentes encontradas na década de 2010 até o ano de 2016 não vem acompanhando os valores crescentes em relação aos anos anteriores.

PERÍODO	NÚMERO DE PATENTES DEPOSITADA
01/01/2010 – 01/01/2017	41
01/01/2000 – 01/01/2010	125
01/01/1990 – 01/01/2000	60
Antes de 1990	0

Tabela 8. Número de patentes depositadas no INPI por período de tempo. Elaborado pelo autor.

As patentes encontradas utilizando as palavras-chave “lipossom*” e "nano" e "terapia" estão relacionadas na Tabela 9. É possível constatar que pela classificação internacional de patentes, estas estão na mesma sub-classe, A61K, que engloba preparações médicas, odontológicas ou higiênicas, o que também pode ser percebido pelos títulos das mesmas. Um fato intrigante que nem todas as patentes pertencem a brasileiros. A primeira pertence à companhia alemã THERMOSE GMBH, a segunda à Universidade Federal de Minas Gerais e a terceira à Universidade Estadual da Pensilvânia (The Pennsylvania State University), nos Estados Unidos. Isto revela uma tendência de proteção de patentes em diferentes bancos de proteção intelectual que não sejam apenas de seu país.

PEDIDO	TÍTULO	IPC
BR 112015 031495 3	Lipídeos estereoespecíficos para a terapia locorregional com sistemas nanocarreadores sensíveis a estímulos de circulação de longo prazo	A61K 9/127
PI 1104409-8	Materiais magnéticos nanoestruturados à base de Fe para o uso em biomedicina	A61K 9/51
PI 0409663-0	Método e sistema para o envio sistêmico de compostos bioativos derivados de lipídeo de detenção de crescimento	A61K 9/127

Tabela 9. Patentes depositadas no INPI por período de tempo utilizando as palavras chaves “lipossom*” e "nano" e "terapia". Elaborado pelo autor.

4.3. Tamanho Vesicular, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta Médio

Foram preparados em três lotes dos sistemas nanoestruturados seguindo as especificações prévias. A caracterização e análise por dispersão de luz dinâmica dos lotes, feitas em triplicata mostraram populações monodispersas de partículas de pequenas dimensões para o controle. A Tabela 10 mostra os diâmetros de 185.46 nm para o controle. Como esperado, os lipossomas permaneceram com um tamanho médio de diâmetro semelhante ao do tamanho de poro da membrana utilizada na extrusão (200 nm). O potencial zeta representa a carga negativa residual sobre a superfície das partículas, fornecendo informações sobre estabilidade do sistema e as propriedades superficiais que são modificadas nos processos e formulações. Isso endossa o controle da distribuição do tamanho dos sistemas e a reprodutibilidade do processo. A Tabela 10 também mostra os valores das medições do potencial zeta.

Formulação	Tamanho (nm) ± SD	PI ± SD	Potencial Zeta (mV) ± SD
Lipossoma 1:50	185.46 ± 3.76	0.48 ± 0.01	- 40.9 ± 0.96

Tabela 10. Resultado do tamanho vesicular, quociente de dispersividade e potencial zeta. Elaborado pelo autor. Tamanho (nm) e o Potencial Zeta (mV) de lipossomas controle. As medições foram realizadas com amostras diluídas utilizando água como um meio de dispersão, a 25 ° C. Os valores foram obtidos a partir de triplicatas. PI = índice de polidispersividade.

4.4. Microscopia de Força Atômica - MFA

As imagens obtidas a partir de Microscopia de Força Atômica (MFA) da amostra de lipossomas em mica são mostradas na Figura 4. Conforme descrito em literatura (RUOZI et al., 2007), a Microscopia de Força Atômica nas abordagens de modo de contato permite a observação da morfologia dos lipossomas sem qualquer manipulação da amostra, tal como mancha, marcação ou fixação (vide Figura 17). Particularmente, o movimento de contato intermitente da ponta elimina as forças laterais ou de cisalhamento que deformariam ou raspariam a amostra (ALBRETCH et al., 1991 e ZHONG et al., 1995). A principal vantagem da técnica é a possibilidade de operar com alta resolução no ar ou no fluido em tempo real em escala nanométrica. Mas, os lipossomas podem mudar a sua forma uma vez depositados no suporte de mica também utilizando o modo de contato e operando em solução aquosa (dentro de 10-15 minutos da deposição quando os lipossomas ainda estão hidratados e mergulhados em água). De fato, a interação entre a amostra e o substrato, bem como o movimento contínuo

da ponta, pode induzir deformação (JASS, et al., 2000), dependendo principalmente da composição da vesícula (RUOZI et al., 2005).

Os resultados experimentais concordam com as hipóteses da literatura, visto que o lipossoma analisado apresentou um formato esférico, com diâmetro médio de 463.86 nm e altura de 6 nm. A comparação entre o diâmetro e o valor de altura da vesícula enfatizou o achatamento no suporte apenas alguns minutos após a deposição. Isto indicou uma estabilidade moderada dos lipossomas num substrato de mica. De fato, o lipossoma manteve uma forma esférica, bem definida, embora o diâmetro fosse superior à altura relacionada. Devido à delonga que houve entre a preparação da amostra e sua análise, isso fez com que o lipossoma aumentasse de tamanho, devido à incorporação da solução na qual estava suspenso. A MFA foi capaz de identificar também os detalhes importantes das propriedades de superfície mostrando forma regular com deformidades moderadas em sua superfície. (KOOPMARSAUDON, et al., 2000) (Figura 5).

Em conclusão, a possibilidade de obter informação local sobre a superfície dos lipossomas utilizando MFA reforça a versatilidade e a aplicabilidade desta técnica no campo farmacêutico e médico.

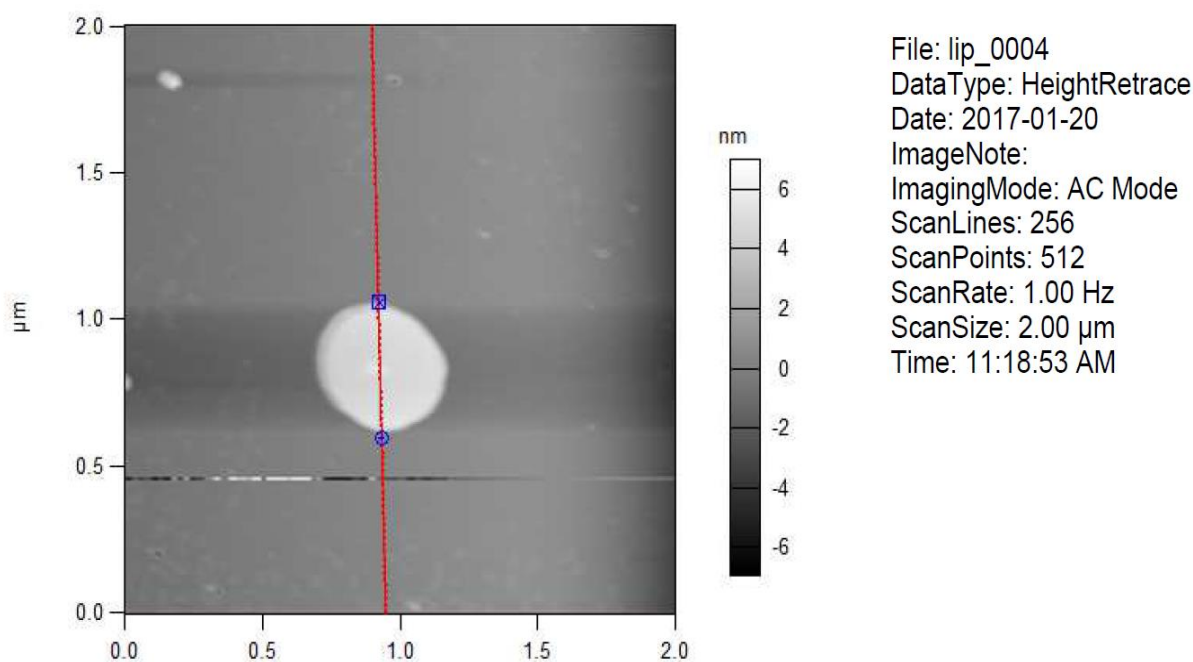


Figura 17. As imagens de microscopia de força atômica (AFM) da amostra de lipossomas em mica, mostrando altura da amostra de 6 nm.

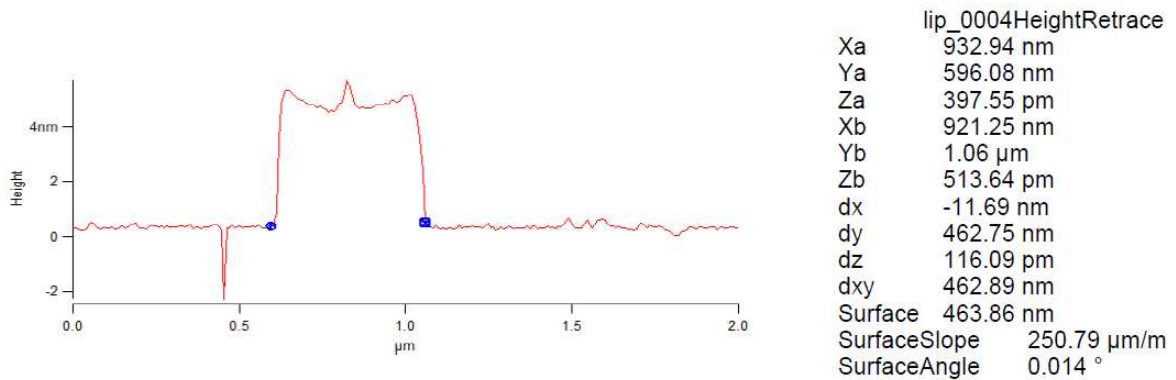
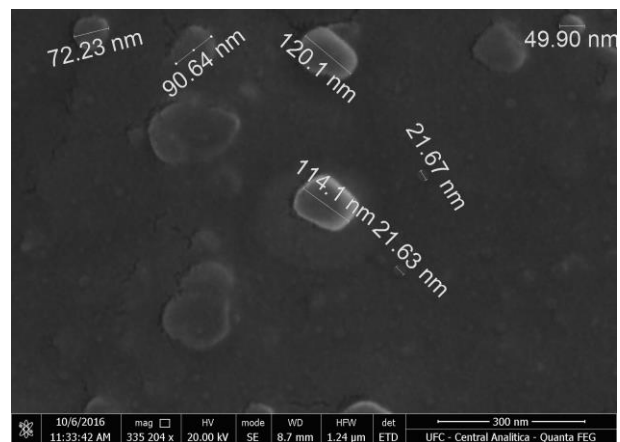
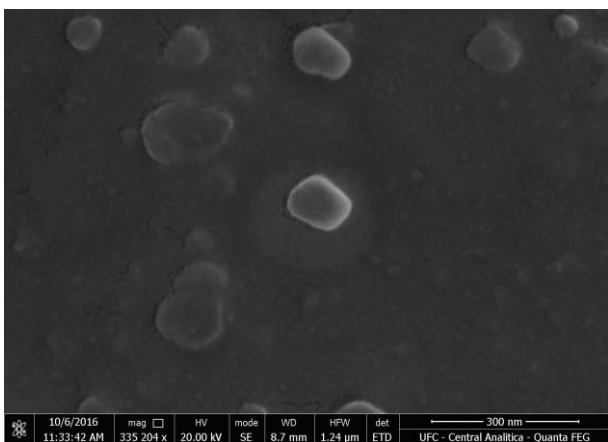


Figura 18. Análise da superfície de lipossoma da amostra, mostrando deformidades moderadas em sua superfície.

4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Na Microscopia Eletrônica de Varredura, os lipossomas apresentaram estrutura típica de sistemas afim, estrutura esférica e ligeiramente achatada, e tamanho médio semelhante à análise do potencial zeta (≤ 200 nm), endossando o resultado obtido previamente (Figura 19).

Geralmente, os lipossomas podem sofrer perturbações estruturais como resultado das condições de alto vácuo e do processo de coloração requerido por algumas técnicas de microscopia eletrônica. Portanto, a microscopia eletrônica de varredura (Scanning Electronic Microscopic - SEM) é uma técnica de imagem menos frequentemente usada porque a análise exige que a amostra seja seca ou fixada antes da imagem.



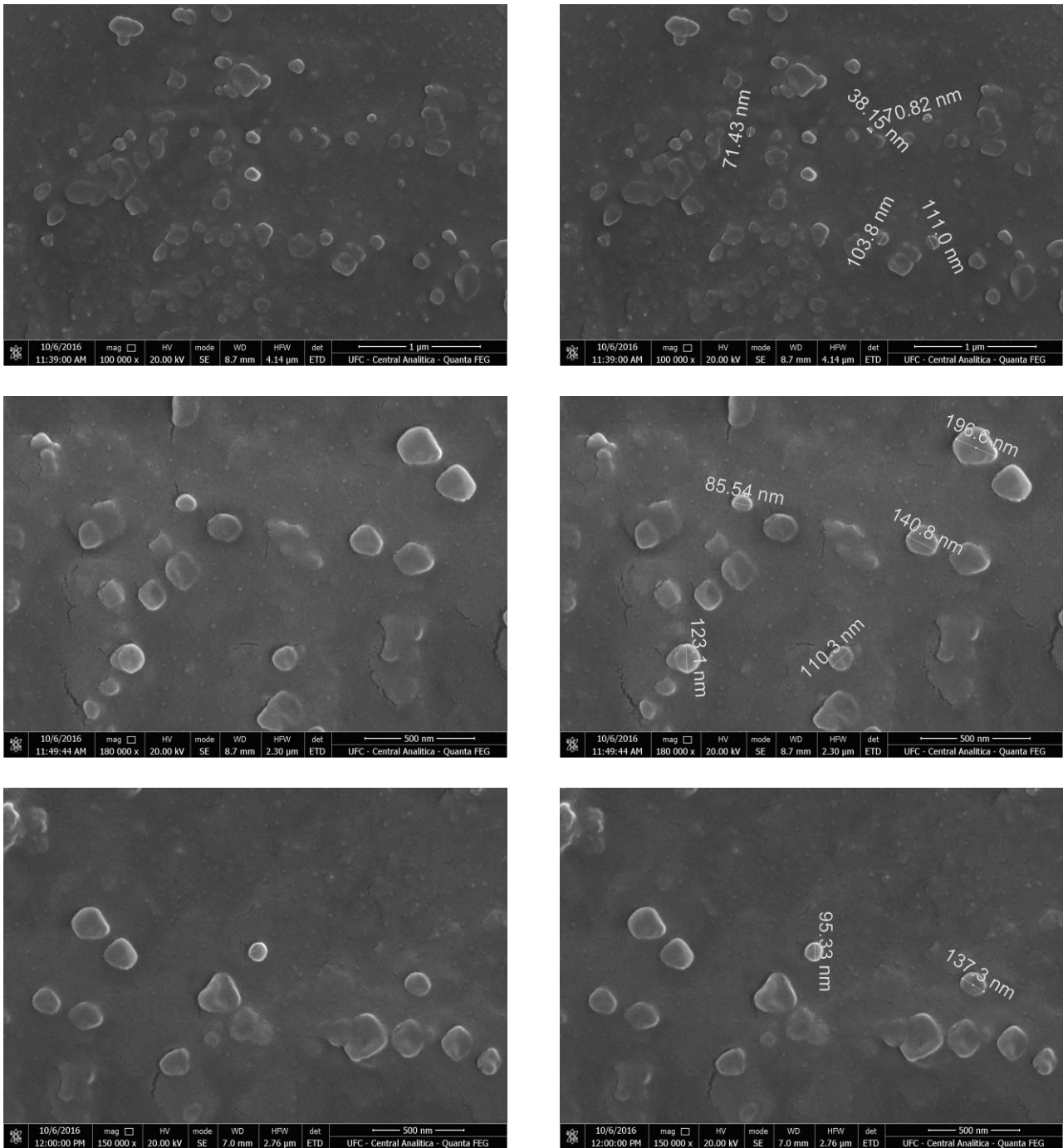


Figura 19. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando lipossomas esféricos, em diferentes magnificações.

4.6. Curva de calibração e taxa de encapsulamento de PJOV56 por CLUE

A curva analítica de PJOV56 em plasma foi construída na faixa de concentração de 100 a 1000 ng.ml⁻¹, e apresentou coeficiente de correlação de 0,9986 (Gráfico 17). A curva analítica foi analisada pelo método de regressão dos mínimos quadrados para verificar sua linearidade e o coeficiente de correlação. A equação da reta obtida foi $y = 0,0417x - 0,04636$.

A equação da reta foi utilizada para quantificação do fármaco no sobrenadante da amostra que teve a droga encapsulada.

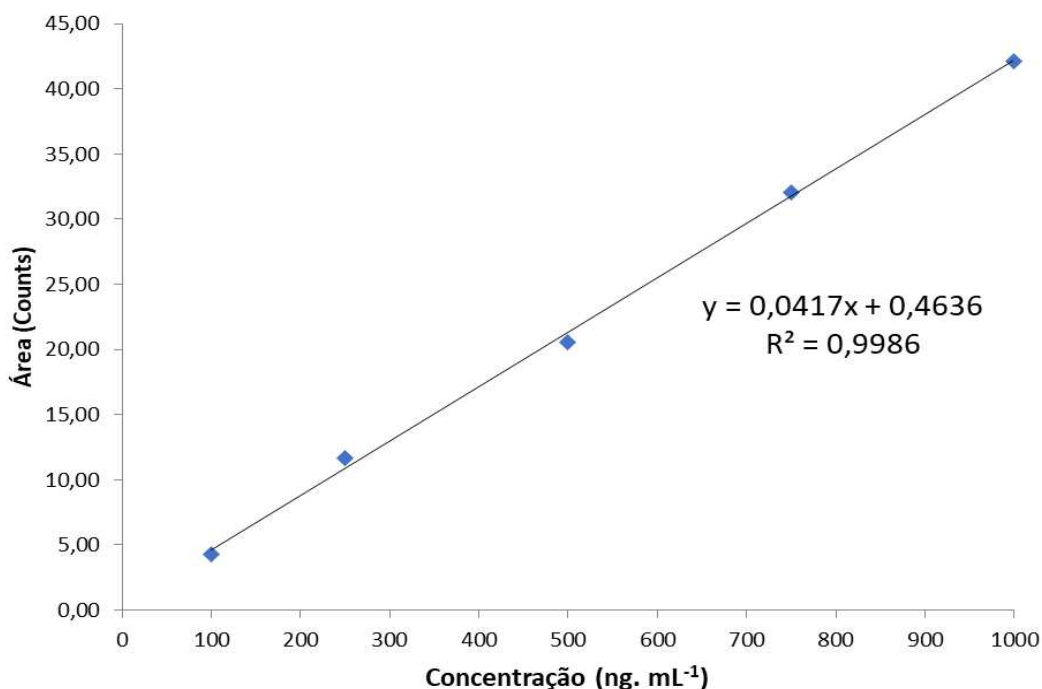


Gráfico 16. Curva analítica de PJOV56 em plasma obtida para a faixa de concentração de 100 a 1000 ng/ml.

Os resultados obtidos no estudo de precisão e exatidão estão descritos na Tabela 11, e apresentaram valores adequados de CV (precisão) demonstrando repetibilidade e reprodutibilidade satisfatória para a aplicação do método no estudo em farmacocinética, uma vez que os valores de CV% foram inferiores a 15%.

Concentração (ng. mL ⁻¹)	DP	CV (%)
100	0,033	0,77
250	0,176	1,51
500	0,574	2,79
750	0,385	1,20
1000	1,162	2,76

Tabela 11. Precisão e exatidão no ensaio do método analítico de PJOV56.

Na Tabela 12 e no Gráfico 18 estão apresentados os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação da PJOV56 na matriz biológica através da aplicação do método analítico desenvolvido neste estudo. O limite de quantificação obtido (100 ng/ml) foi considerado satisfatório para a aplicação do método em um futuro protocolo experimental para estudo em farmacocinética.

Composto	Equação da reta	R2	Intervalo linear (ng. mL ⁻¹)	LD (ng. mL ⁻¹)	LQ
PJOV 56	$y = 0,417x + 0,4636$	0,9986	100 – 1000	50	100

Tabela 12. Limites de detecção e quantificação do método de análise de PJOV56

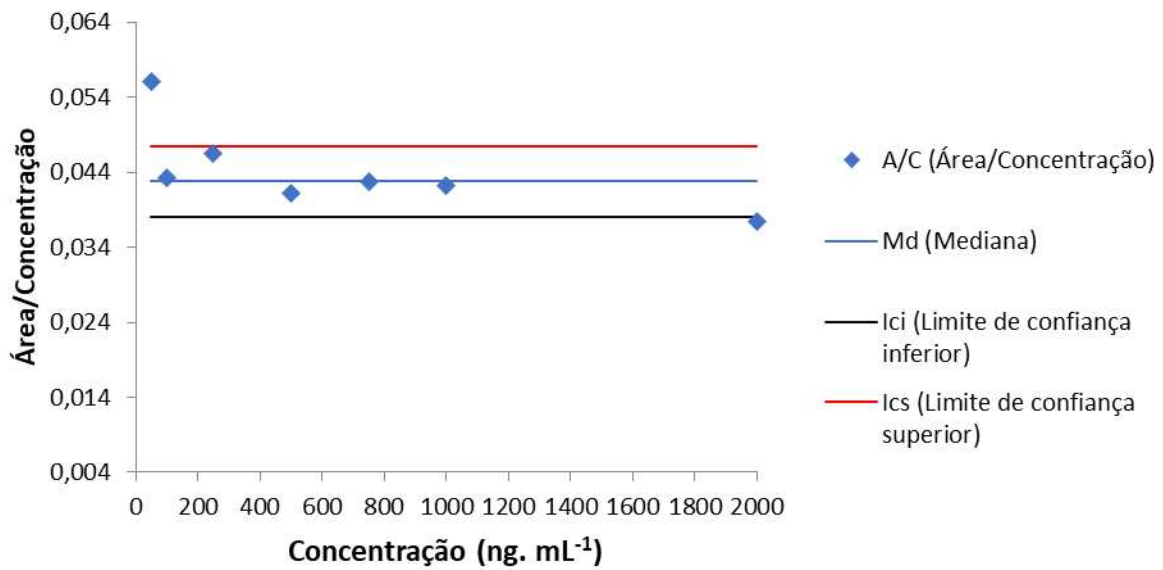
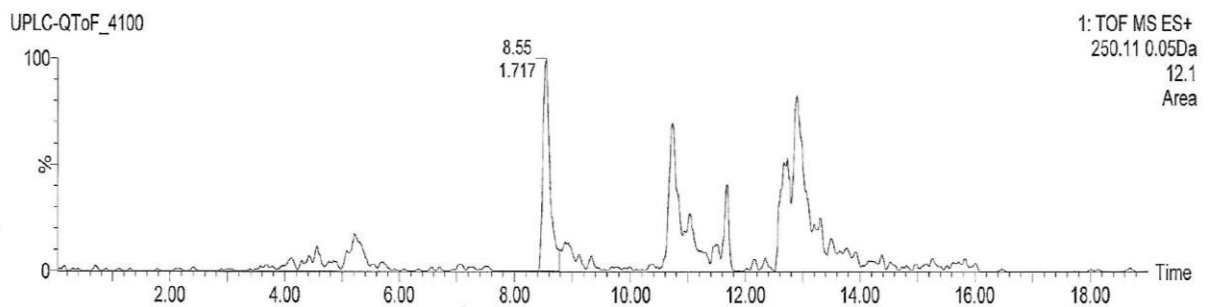


Gráfico 18. Limite de detecção (LD) e Limite inferior de quantificação (LIQ) de PJOV56

A partir dos estudos de linearidade da curva de calibração mostrados anteriormente, pode-se então quantificar o material encapsulado, neste caso, PJOV56. Para tal, fez-se uso do valor de absorbância obtidos durante a cromatografia (Figura 20) e substitui-se na equação da reta da curva de calibração (Gráfico 16).



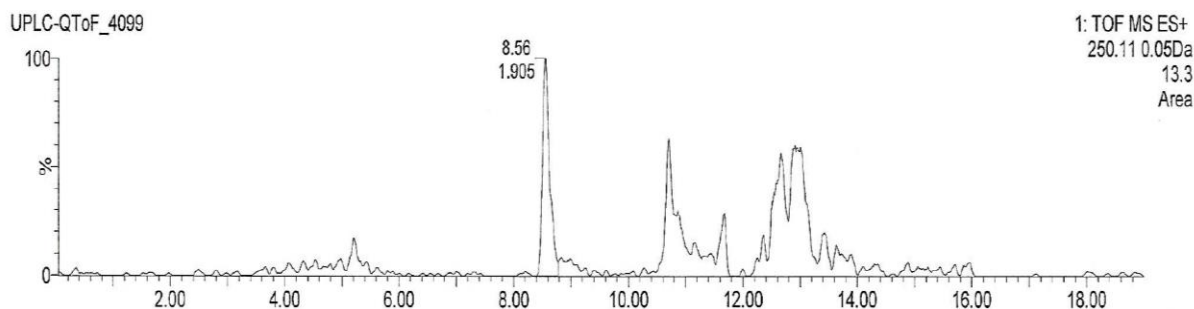


Figura 20. Cromatograma representando pico de absorvância de PJOV56 (8.55 minutos) detectado no sobrenadante das vesículas lipossomais.

Para encontrar a concentração de droga no sobrenadante foi necessário relacionar o pico de absorvância com a equação da reta da curva de calibração. Todavia, somou-se o pico de absorvância do sobrenadante e do precipitado para alcançar um resultado verossímil.

$$\begin{aligned}
 3622 &= 0.0417x - 0.4636 \\
 3622.4636 &= 0.0417x \\
 x &= 86,869.6307 \\
 x &= 87 \text{ ng/mL}
 \end{aligned}$$

Visto que não foi utilizado o volume integral de 1 mL, ou 1000 μL , para realizar o ensaio, mas sim, uma alíquota deste, 400 μL , foi necessário fazer a correlação para encontrar a concentração.

$$\begin{aligned}
 400 \mu\text{l} & \text{ --- } 2\text{mg} \\
 1000 \mu\text{l} & \rightarrow 5 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Uma vez encontrada a concentração de lipossoma, foi preciso fazer também a correlação para encontrar a concentração da droga em ng/mL, para 1 mL, ou 1000 μL .

$$5 \text{ mM da droga de PJOV56 (M.M. } 249,27 \text{ g/mol)} = 1.246 \text{ ng/mL}$$

Vale ressaltar que para a construção do lipossoma foi utilizado 200 μL de PJOV 56 a ser encapsulada. Logo, é preciso fazer uma correlação entre os volumes.

$$\begin{aligned}
 1000 \mu\text{L} & \text{ --- } 1246 \text{ ng/mL} \\
 200 \mu\text{L} & \rightarrow 249.2 \text{ ng/mL}
 \end{aligned}$$

Em 400 μL , a concentração de droga detectada é de 87 ng. Entretanto, é preciso relacionar o volume de droga detectada e o volume utilizado de solvente para construir os lipossomas que foi de 1 mL, ou 1000 μL .

$$\begin{aligned} 400 \mu\text{L} & \text{ --- } 87 \text{ ng/mL} \\ 1000 \mu\text{L} & \rightarrow 217.5 \text{ ng/mL} \end{aligned}$$

Por fim, é necessário relacionar o volume total da droga com o que foi detectado para calcular a taxa de encapsulamento da droga em lipossoma.

$$\begin{aligned} 249.2 \text{ ng/mL} & \text{ --- } 100 \% \\ 217.5 \text{ ng/mL} & \rightarrow 87,29\% \end{aligned}$$

A taxa de encapsulamento da PJOV56 em lipossoma foi satisfatória, já que alcançou cerca de 87,29% de encapsulamento da droga colocada em solução para o preparo das vesículas lipossomais. Logo, isso atesta a eficácia do método empregado.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que apesar da utilização de lipossomas como veículos para entrega controlada de moléculas terapêuticas ser uma área de pesquisa em ascensão, não há depósitos nesta área no Brasil, que sofre de problemas sistemáticos relacionado à produção de patentes.

É preciso contornar obstáculos, tais como: a falta de diálogo entre a universidade e as empresas, para que, de fato, a patente possa virar um produto à serviço da população; o processo burocrático e demorado desde o depósito da patente até a concessão; a falta de incentivos aos pesquisadores para o desenvolvimento das patentes, além de um retorno insatisfatório da patente, que muitas vezes está vinculada à Universidade, caso esta vire produto. Faz-se necessário que o Brasil sobrepuje tais dificuldades para desenvolver patentes, em geral, e possa figurar em uma posição mais relevante em proteção intelectual.

Por outro lado, existe um grande esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de projetos de pesquisas, publicações e pedidos de patentes utilizando tecnologias associadas à utilização de lipossomas. Espera-se que, devido à grande demanda mundial por tratamentos mais assertivos, que causem menos efeitos colaterais tanto quanto possível, a tendência é que esse número de depósitos aumente ao longo dos anos, gerando benefícios à saúde humana.

É possível constatar também que os Estados Unidos e a China figuram como líderes mundiais no número de patentes associadas a lipossomas, segundo nossa pesquisa, corroborando para sua manutenção na vanguarda da proteção intelectual. Por outro lado, o Brasil não possui resultado substancial para tal, figurando com nenhuma patente depositada.

Tendo em conta estas considerações e as grandes vantagens da utilização de lipossomas como veículos terapêuticos, é preciso que o Brasil trace estratégias político-científicas que fomentem o desenvolvimento dessa tecnologia, a fim de sanar a necessidade de se buscar tratamentos mais efetivos e eficazes, e que em breve, as formulações contendo lipossomas possam chegar ao mercado para atender à população.

Os resultados obtidos a partir do método estabelecido para a produção dos sistemas nanoestruturados apresentaram ótima reprodutibilidade. A natureza lipofílica, o tamanho dos lipossomas e a taxa de encapsulamento do fármaco obtidos são indicativos para avanços na utilização destas formulações como veículos de *drug delivery* para estratégias passivas e ativas de seletividade, podendo aumentar a concentração intracelular de drogas no interior de células-alvo e, ao mesmo tempo, evitando a toxicidade para células saudáveis, diminuindo assim os efeitos colaterais sistêmicos das drogas utilizadas atualmente no tratamento do câncer, ao passo que, aumenta a qualidade de vida do paciente durante o tratamento.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliação do efeito antitumoral in vitro

Avaliar a citotoxicidade dos derivados de quinoxalinas nanoencapsulados ou livres em solução serão utilizadas diferentes linhagens celulares tumorais humanas e normais. As células serão cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 ml), e mantidas com os meios RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células serão mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente, acompanhar-se-á o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio será trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. O teste colorimétrico empregando reagente “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide” (MTT, Sigma Aldrich) será utilizado para quantificar a citotoxicidade dos compostos sobre diversas linhagens celulares, obtendo-se o valor da concentração inibitória média (IC50 - concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular). As células serão distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de 0,1-0,3 x 10⁶ células/ml, para células em suspensão, e 0,5 x 10⁵ células/ml, para células aderidas. Após 24 h, os compostos nanoencapsulados e livres serão adicionados aos poços, utilizando o sistema automatizado HTS (high-throughput screening), e as placas, incubadas por 48 e 72h. O quimioterápico doxorrubicina (DOX) será utilizado como controle positivo e o controle negativo receberá a mesma quantidade de células. Após o período de incubação, as placas serão centrifugadas (1500rpm/15min) e o sobrenadante será descartado. Cada poço receberá 200µl da solução de MTT (0,5 mg/ml) e as placas serão reincubadas por 4h em estufa a 37°C e a 5 % CO₂. Após esse período, as placas serão novamente centrifugadas (3000rpm/10min), o sobrenadante será desprezado, e o precipitado será ressuspensão em 150 µl de DMSO. Para a quantificação do sal de formazan reduzido nas células vivas, as absorbâncias serão lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN et al., 1983).

- Dinâmica molecular do lipossoma

Realizar simulações computacionais sobre o comportamento do lipossoma em situações ideais e fazer modulações do mesmo com ligantes de superfície.

- Estudos acerca da estabilidade das formulações

Modular as condições para a construção dos lipossomas – temperatura, pH, ressuspensão com água, troca dos fosfolipídios que a compõem os lipossomas, tratamento prévio dos lipossomas com glutaraldeído ou liofilização, etc.

- Expandir a busca de patentes e artigos para mais bancos de dados.

Utilizar outros bancos de dados para expandir os resultados acerca da produção de tecnologia em lipossomas nacional e internacionalmente.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, T.R.; GRÜTTER, P.; HORNE, D.; RUGARD, D. Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. **J Appl. Phys.**, v. 69, p 668–673, 1991.
- ALDAKOV, D.; PALACIOS, M. A.; ANZENBACHER, P. Benzothiadiazoles and Dipyrrolyl Quinoxalines with Extended Conjugated Chromophores– Fluorophores and Anion Sensors. **Chemistry of materials**, v. 17, n. 21, p. 5238-5241, 2005.
- ALLEN, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 750-763, 2002.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.
- Apply nanotech to up industrial, agri output Archived 2012-04-26 at the Wayback Machine., The Daily Star (Bangladesh), 17 April 2012.
- BAGATTOLI, L. A.; GRATTON, E. A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study. **Biophys. J.**, v. 79, p. 434, 2000.
- BAILEY, A. L.; MONCK, M. A.; CULLIS, P. R. pH-induced destabilization of lipid bilayers by a lipopeptide derived from influenza hemagglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1324, n. 2, p. 232-244, 1997.
- BALAZS, D. A.; GODBEY, W. T. Liposomes for use in gene delivery. **Journal of drug delivery**, 2011.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 238-271, 1965.
- BARANI, H.; MONTAZER, M. A review on applications of liposomes in textile processing. **Journal of liposome research**, v. 18, n. 3, p. 249-262, 2008.
- BARENHOLZ, Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nanodrug: lessons learned. **Journal of controlled release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.
- BARROS, N.; MIGLIACCIO, V.; FACUNDO, V.A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G.; NICOLETE, R.; SILVA-JARDIM, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 337–343, 2013.
- BARTOLI, M. H. et al. In vitro and in vivo antitumoral activity of free, and encapsulated taxol. **Journal of microencapsulation**, v. 7, n. 2, p. 191-197, 1990.
- BATEMAN, K. P. et al. MSE with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 9, p. 1485-1496,

2007.

BELKIN, A. et., al. Self-Assembled Wiggling Nano-Structures and the Principle of Maximum Entropy Production. **Sci. Rep.**, 2015.

BERTRAND, N. et al. Transmembrane pH-gradient liposomes to treat cardiovascular drug intoxication. 2010.

BIBI, S. et al. Trigger release liposome systems: local and remote controlled delivery? **Journal of microencapsulation**, v. 29, n. 3, p. 262-276, 2012.

BOHLE, S. A Four Part Series on Open Notebook Science (Part 4). **Nature**, 2014.

BOLOTIN, E. M. et al. Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligando liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 4, n. 1, p. 455-479, 1994.

BHUSHAN, B. Springer Handbook of Nanotechnology. **Ed. Springer**, p.361, 2004.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**. v. 2 n. 4 p.17-71, 2007.

CABANES, A. et al. Comparative in vivo studies with paclitaxel and liposome-encapsulated paclitaxel. **International journal of oncology**, v. 12, n. 5, p. 1035-1075, 1998.

CASTRO-PEREZ, J. M. Current and future trends in the application of HPLC-MS to metabolite-identification studies. **Drug discovery today**, v. 12, n. 5, p. 249-256, 2007.

CHANG, H. I.; YEH, M. K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 49, 2012.

CHANG, D. W. et al. Multifunctional quinoxaline containing small molecules with multiple electron-donating moieties: Solvatochromic and optoelectronic properties. **Synthetic Metals**, v. 162, n. 13, p. 1169-1176, 2012.

CHARROIS, G. JR; ALLEN, T. M. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1663, n. 1, p. 167-177, 2004.

CHEESEMAN, C. W. H. Recent advances in quinoxaline chemistry. **Advances in heterocyclic chemistry**, v. 2, p. 203-244, 1963.

CULLIS, P. R.; HOPE, M. J. The bilayer stabilizing role of sphingomyelin in the presence of cholesterol. A ³¹P NMR study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 597, n. 3, p. 533-542, 1980.

DEAMER, D. W.; PRINCE, R. C.; CROFTS, A. R. The response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 274, n. 2, p. 323-335, 1972.

DESHPANDE, P.P.; BISWAS, S.; TORCHILIN, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. **Nanomedicine**, v. 8, n. 9, p. 1509-1528, 2013.

DHANARAJ, C. J. e JOHNSON, J. Metal complexes of quinoxaline derivatives: review (Part-I). **Research Journal of Chemical Sciences** v. 2231, p. 606, 2014

DREXLER, K. E. Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology. **Doubleday**, 1986.

DRUMMOND, D. C. et al. Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy. **Cancer research**, v. 66, n. 6, p. 3271-3277, 2006.

FEINGOLD, K. R. Permeability barrier homeostasis: its biochemical basis and regulation. **Cosmetics and toiletries**, v. 112, n. 7, p. 49-59, 1997.

GABIZON, A. et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. **Cancer research**, v. 54, n. 4, p. 987-992, 1994.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. **Biochemical Journal**, v. 124, n. 5, p. 58, 1971.

HUANG, T.-H. et al. Dibenzothiophene/Oxide and Quinoxaline/Pyrazine Derivatives Serving as Electron-Transport Materials. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 11, p. 1449-1456, 2006.

HUBLER, A. Digital quantum batteries: Energy and information storage in nanovacuum tube arrays. **Complexity**, 2010.

HUSAIN, A. & MADHESIA, D. Recent advances in pharmacological activities of quinoxaline derivatives. **J. Pharm. Res**, v. 4, n. 3, p. 924-929, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade de câncer no Brasil. 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp>>

JASS, J.; TJÄRNHAGE, T.; PUU, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: An atomic force microscopy study. **Biophys. J.**, v. 79, p. 3153-3163, 2000.

JOHNSTON, M. J. W. et al. Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 1, p. 55-64, 2006.

JOHNSTON, M. JW et al. Influence of drug-to-lipid ratio on drug release properties and liposome integrity in liposomal doxorubicin formulations. **Journal of liposome research**, v. 18, n. 2, p. 145-157, 2008.

JULIANO, R. L.; STAMP, D. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated anti-tumor drugs: studies with vinblastine, actinomycin D, cytosine arabinoside, and daunomycin. **Biochemical pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 21-27, 1978.

JULIANO, R. L.; STAMP, D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 63, n. 3, p. 651-658, 1975.

KALYANKAR, T.M., KHAN, M., RANGARI, N.T. Novel possibilities of development and therapeutic applications of Liposomes. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 8, p. 1880–1884, 2010.

KAZAKOV, S.; LEVON, K. Liposome-nanogel structures for future pharmaceutical applications. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 36, p. 4713-4728, 2006.

KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S. A. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. **Journal of drug delivery**, v. 2011, 2010.

KIMELBERG, H. K. et al. The effect of entrapment in liposomes on the in vivo distribution of 3H-methotrexate in a primate. **Cancer research**, v. 36, n. 8, p. 2949-2957, 1976.

KOOP-MARSAUDON, S.; LECLÈRE, P.H.; DUBOURG, F.; LAZZARONI, R.; AIMÉ, J.P. Quantitative measurement of the mechanical contribution to tapping-mode atomic force microscopy images of soft materials. **Langmuir**, v. 16 p. 8432–8437, 2000.

KOZYREV, A. N. et. al. Syntheses and spectroscopic studies of novel chlorins with fused quinoxaline or benzimidazole ring systems and the related dimers with extended conjugation. **Tetrahedron**, v. 56, n. 21, p. 3353-3364, 2000.

KULKARNI, P. R. et. al. Liposomes: a novel drug delivery system. **Int. J. Curr. Pharm. Res.**, v. 3, n. 2, p. 10-18, 2011.

KURASAWA, Y.; TAKADA, A. Recent progress in the quinoxaline chemistry: utility of 3-alkoxy-carbonylmethylene-2-oxo-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoxalines as starting materials. **Heterocycles**, v. 23, n. 8, p. 2083-2119, 1985.

LAGINHA, K. M. et al. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 19, p. 6944-6949, 2005.

LAMBERT, N. Internet patent information in the 21st century: A comparison of Delphion, Micropatent, and QPAT. In: **Proceedings of the 2004 International Chemical Information Conference**. 2004.

LANKES, R. D. Digital reference. **Encyclopedia of library and information science**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2004.

LASIC, D. D.; NEEDHAM, D.; The “stealth” liposome: a prototypical biomaterial. **Chem. Rev.** v. 95, p. 2601, 1995.

LASIC, D.D. Liposomes: from physics to applications. 1^a ed. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers B. V.**, cap. 3, p. 63-90, 1998.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes: preparation, characterization, and preservation. **Methods Biochem Anal.** v. 33 p. 337–462, 1988.

LYON, David; et., al. Gap size dependence of the dielectric strength in nano vacuum gaps. **IEEE**, 2013

MADDEN, T. D. et al. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. **Chemistry and physics of lipids**, v. 53, n. 1, p. 37-46, 1990.

MAEDA, M.; MURAKAMI, M.; TAKEGAMI, T.; OTA, T. Promotion or supression of experimental metastasis of b16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 229, p. 232-238, 2008.

MALHI, S. et al. Expedition of liposomes to intracellular targets in solid tumors after intravenous administration. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, n. 2, p. 75-87, 2013.

MAURER, N. et al. Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a 1 H-NMR study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1374, n. 1, p. 9-20, 1998.

MAYER, L. D.; BALLY, M. B.; CULLIS, P. R. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 857, n. 1, p. 123-126, 1986.

MAYER, Lawrence D. et. al. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1025, n. 2, p. 143-151, 1990.

MCINTOSH, Thomas J. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 513, n. 1, p. 43-58, 1978.

MEURE, Louise A. et al. The depressurization of an expanded solution into aqueous media for the bulk production of liposomes. **Langmuir**, v. 25, n. 1, p. 326-337, 2008.

MIGHANI, H.; GHAEMY, M. Synthesis and characterization of organosoluble polyamides from quinoxaline based diamine. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 28, n. 2, p. 147-155, 2010.

MORTISHIRE-SMITH, R. J. et al. Accelerated throughput metabolic route screening in early drug discovery using high-resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated data analysis. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 19, n. 18, p. 2659-2670, 2005.

MORTISHIRE-SMITH, R. J. et. al. Generic dealkylation: a tool for increasing the hit-rate of metabolite rationalization, and automatic customization of mass defect filters. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 7, p. 939-948, 2009.

NICOLETE, R., LIMA, K. M., RODRIGUES Jr., J. M., BARUFFI, M. D., MEDEIROS, A. I., BENTLEY, M. V. L. B., SILVA, C. L., FACCIOLI, L. H. In vitro e in vivo activities of leukotrienes B4-loaded biodegradable microspheres. **Prostaglandins e Other Lipid Mediators**, v. 83, p. 121-129, 2007.

OZAWA, M.; ASANO, A. The preparation of cell fusion-inducing proteoliposomes from purified glycoproteins of HVJ (Sendai virus) and chemically defined lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 12, p. 5954-5956, 1981.

PARENTE, R. A.; NIR, S.; SZOKA, F. C. pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 10, p. 4724-4730, 1988.

PERCHE, Federico; TORCHILIN, Vladimir P. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. **Journal of drug delivery**, v. 2013, 2013.

PEREIRA, J. A. et al. Quinoxaline, its derivatives and applications: A State of the Art review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 664-672, 2015.

POLETTI, F. S.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. Chapter 3. In: BECK, R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. (eds.). **Nanocosmetics and Nanomedicines. New approaches for skin care**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 380 p.

POHLMANN, A. (eds.). **Nanocosmetics and Nanomedicines. New approaches for skin care**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 380 p.

POSTE, G. et al. Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. **Cancer research**, v. 42, n. 4, p. 1412-1422, 1982.

POSTE, G.; PAPAHADJOPOULOS, D. Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: influence of vesicle lipid composition on mechanism (s) of vesicle incorporation into cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 5, p. 1603-1607, 1976.

PRATA, P. R. A Transição Epidemiológica no Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 8 (2):168-175, abril/junho, 1992.

QUONIAM, L.; KNISS, C. T.; MAZIERI, M. R. A patente como objeto de pesquisa em Ciências da Informação e Comunicação. **Encontros Bibli: revista eletrônica de biblioteconomia e ciência da informação**, v. 19, n. 39, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M.A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 25, p. 81-89. 2005.

RUOZI, B; TOSI, G; LEO, E; VANDELLI, M.A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. *Talanta*, v. 73, p. 12–22. 2007.

SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. (2010). Nanotechnology: The Future Medicine. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**. v. 3 n. 1 p. 32–33, 2010

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M.A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1181-1185, 2002.

SHARMA, N. K.; KUMAR, V. Liposomal paclitaxel: Recent trends and future perspectives. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 31, n. 1, p. 205-11, 2015.

SHINN, E. Nuclear energy conversion with stacks of graphene nanocapacitors. **Complexity**, 2012.

SHOJI, Yoko; NAKASHIMA, Hideki. Nutraceuticals and delivery systems. **Journal of drug targeting**, v. 12, n. 6, p. 385-391, 2004.

SILVERMAN, J. A.; DEITCHER, S. R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 555-564, 2013.

STORM, G. et al. Influence of lipid composition on the antitumor activity exerted by doxorubicin-containing liposomes in a rat solid tumor model. **Cancer research**, v. 47, n. 13, p. 3366-3372, 1987.

SZOKA JR. J.R., F.; PAPAHAJDOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). **Annual review of biophysics and bioengineering**, v. 9, n. 1, p. 467-508, 1980.

TAHOVER, E.; PATIL, Y. P.; GABIZON, A. A. Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index: focus on liposomes. **Anti-cancer drugs**, v. 26, n. 3, p. 241-258, 2015.

THAKURIA, H.; DAS, G. One-pot efficient green synthesis of 1, 4-dihydro-quinoxaline-2, 3-dione derivatives. **Journal of Chemical Sciences**, v. 118, n. 5, p. 425-428, 2006.

THIRUMURUGAN, P.; MURALIDHARAN, D.; PERUMAL, P. T. The synthesis and photophysical studies of quinoxaline and pyridopyrazine derivatives. **Dyes and Pigments**, v. 81, n. 3, p. 245-253, 2009.

TILLER, P. R. et al. High-throughput, accurate mass liquid chromatography/tandem mass spectrometry on a quadrupole time-of-flight system as a ‘first-line’ approach for metabolite identification studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 7, p. 1053-1061, 2008.

TOLONEN, A.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. Liquid chromatography–mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. **Drug discovery today**, v. 14, n. 3, p. 120-133, 2009.

TORCHILIN, V. P. et al. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 15, p. 8786-8791, 2001.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 145-160, 2005.

TOSHIMA, K.; OZAWA, T.; KIMUER, T.; MATSUMURA, S. The significant effect of the carbohydrate structures on the DNA photocleavage of the quinoxaline- carbohydrate hybrids. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p 2777– 2779, 2014.

TYRRELL, D. A.; HEATH, T. D.; COLLEY, C. M.; RYMAN, B.E. New aspects of liposomes **Biochim. Biophys. Acta** v. 457 (3-4), p. 259-302, 1976.

USPTO 2014-2018 Strategic Plan. **United States Patent and Trademark Office**, 2014.

VIEIRA, M.; PEREIRA, J. A.; PESSOA, A. M.; CORDEIRO, N. D. S.; FERNANDES, R.; PRUDÊNCIO, C.; NORONHA, J. P. Quinoxaline, its derivatives and applications: A State of the art review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p 1-9, 2014.

VOGEL A.I., **Vogel's text book of practical organic chemistry**, 5th ed. 1190, 1989.

WEISSMANN, G; COHEN, C.; HOFFSTEIN, S. Introduction of missing enzymes into the cytoplasm of cultured mammalian cells by means of fusion-prone liposomes. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 89, p. 171-183, 1976.

WHITE, M. J. esp@ cenet: Europe's Network of Patent Databases. 2006.

WOODLE, M. C.; PAPAHAJIOPOULOS, D. Liposome preparation and size characterization. **Methods in enzymology**, v. 171, p. 193-217, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Globocan 2012 – Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Internet]. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en>>

WRONA, M. et al. 'All-in-One' analysis for metabolite identification using liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry with collision energy switching. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 19, n. 18, p. 2597-2602, 2005.

WU, P.; SU, Y.; LIU, X.; YANG, B.; HE, Q.; HU, Y. Discovery of novel 2- piperidinol-3-(arylsulfonyl) quinoxalines as phosphoinositide 3-kinase a (PI3Ka) inhibitors. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 20, p 2837–2844, 2012.

ZARRANZ, B. et al. Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethyl-quinoxaline 1, 4-di-N-oxide derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 13, p. 3711-3721, 2004.

ZARROUK, A. et al. Comparative study of new quinoxaline derivatives towards corrosion of copper in nitric acid. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 6, p. 4939-4952, 2011.

ZHAO, G.; RODRIGUEZ, B. L. Molecular targeting of liposomal nanoparticles to tumor microenvironment. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 61, 2013.

ZHIGALTSEV, I. V. et al. Development of a weak-base docetaxel derivative that can be loaded into lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 144, n. 3, p. 332-340, 2010.

ZHONG, Q.; INNIS, D.; KJOLLER, K.; ELINGS, V.B. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. **Surface Sci Lett**. v. 290, p. 688–692, 1993.

ZHU, M. et al. Detection and Structural Characterization of Glutathione-Trapped Reactive Metabolites Using Liquid Chromatography– High-Resolution Mass Spectrometry and Mass Defect Filtering. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 21, p. 8333-8341, 2007.

ZMUJDZIN A. Chemiczna Spoldzielnia Pracy “Synteza”, **Chem Abstr**, v. 81, n. 77966, 1974.