



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

**BEATRIZ BEZERRA DE ABREU**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE**  
**NANOCARREADORES LIPOSSOMAIS CONTENDO OXIMA LAPACHONA (UN4)**

**FORTALEZA**

**2019**

**BEATRIZ BEZERRA DE ABREU**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE NANOCARREADORES  
LIPOSSOMAIS CONTENDO OXIMA LAPACHONA (UN4)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.  
Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa.

Coorientadora: Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A145d Abreu, Beatriz Bezerra de.

Desenvolvimento e caracterização in vitro de nanocarreadores lipossomais contendo oxima lapachona (UN4) / Beatriz Bezerra de Abreu. – 2019.  
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira.

1. Quinona. 2. Antitumoral. 3. Nanocarreadores Lipossomais. I. Título.

CDD 661

---

**BEATRIZ BEZERRA DE ABREU**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE NANOCARREADORES  
LIPOSSOMAIS CONTENDO OXIMA LAPACHONA (UN4)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.  
Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 26/11/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe Noélia (*in memorian*) que batalhou muito para me oferecer uma educação de qualidade. Serei eternamente grata pelo incentivo e palavras de apoio. Essa mulher guerreira continua sendo minha maior força na vida. Sua lembrança me inspira e me faz persistir.

Ao meu pai Claudio e minha irmã Raquel que me deram forças para superar todos os momentos difíceis a que eu me deparei ao longo da graduação. O apoio de diversas maneiras nessa etapa tão importante tornou possível a realização desse trabalho. Agradeço imensamente toda a ajuda que recebi para finalizar a minha graduação.

À minha família, que sempre acreditou no meu potencial e me deu incentivos ao longo da graduação.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Claudia do Ó Pessoa, pelo apoio, compreensão e oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço à Fátima de Cássia, que acompanhou minha jornada acadêmica de perto e contribuiu muito com a realização dessa pesquisa. Sou grata pelo apoio e por todas as contribuições dadas durante o processo.

À Francilene e Luciana, que compartilharam seus conhecimentos comigo, meu muito obrigado.

Às minhas amigas Victória e Lygia que estiveram presentes em todos os momentos e me deram muita força durante a faculdade. Obrigada pelos conselhos, palavras de apoio e risadas.

Meu eterno agradecimento a todos os meus amigos do curso de bacharelado em Biotecnologia, que deram uma contribuição valiosa para a minha jornada acadêmica.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Agradeço a Deus, que sempre direcionou minha vida e abençoou o meu caminho.

## RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada por modificações no controle do crescimento e divisão das células causando o descontrole dessas divisões e promovendo a carcinogênese. Diferentes tipos de compostos naturais ou sintéticos podem ser avaliados quanto a sua potencial aplicação como um fármaco quimioterápico. As quinonas são compostos orgânicos com potencial antitumoral e seu núcleo quinônico está presente em alguns compostos que estão sendo utilizados clinicamente como fármacos antitumorais. Contudo, esses compostos quinônicos podem apresentar algumas limitações em seu uso como a solubilidade e toxicidade. Nesses casos, a nanotecnologia pode ser empregada com o objetivo de melhorar algumas dessas características e viabilizar o uso das quinonas. No presente estudo, nanocarreadores lipossomais contendo um derivado quinônico (UN4) foram preparados utilizando o método de hidratação do filme lipídico. As análises de tamanho de partícula, potencial zeta e taxa de encapsulação foram realizadas para determinar e avaliar as características do composto nanoencapsulado. O tamanho médio obtido, utilizando o método de hidratação do filme lipídico, foi de 31,35 nm para LUN4 e de 38,74 nm para LBR. Os valores de potencial zeta foram positivos, sendo +50 mV para LUN4 e +51,4 mV para LBR. Os lipossomas também foram avaliados quanto à citotoxicidade em linhagens tumorais pelo método do ensaio de MTT para verificar a eficiência dos efeitos antitumorais da combinação entre a substância e o lipossoma. A UN4 encapsulada apresentou alta citotoxicidade frente as linhagens tumorais testadas, com  $CI_{50}$  de 0,5763  $\mu\text{g/mL}$  para SW620, 1,255  $\mu\text{g/mL}$  para MCF-7 e 1,363  $\mu\text{g/mL}$  para SNB19. Logo, o nanossistema apresentou resultado promissor frente às linhagens testes e demonstrou menor valor de  $CI_{50}$  frente a linhagem de câncer colorretal, porém a taxa de encapsulação obtida para a formulação escolhida para teste foi de 43%. Portanto, outros estudos de caracterização são necessários para completar o perfil farmacológico e avançar nos estudos clínicos como novo quimioterápico.

**Palavras-chave: Quinona, Antitumoral, Nanocarreadores Lipossomais**

## ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by modifications in the control of cell growth and division causing uncontrolled cell division and inducing carcinogenesis. Different types of natural or synthetic compounds can be evaluated for their potential application as a chemotherapeutic drug. Quinones are organic compounds with antitumor potential and their quinone structure is present in some compounds that are clinically used as antitumor drugs. However, these quinone compounds may have some limitations in their use such as solubility and toxicity. In such cases, nanotechnology may be employed to improve some of these characteristics and make the use of quinones viable. In the present study, liposomal nanocarriers containing a quinone derivative (UN4) were prepared using the lipid film hydration method. Particle size, zeta potential and encapsulation rate analyze were performed to determine and evaluate the characteristics of the nanoencapsulated compound. The average size obtained using the lipid film hydration method was 31.35 nm for LUN4 and 38.74 nm for LBR. The zeta potential values were positive, being +50 mV for LUN4 and +51.4 mV for LBR. Liposomes were also evaluated for cytotoxicity in tumor lineages using the MTT assay method to verify the effectiveness of the antitumor effects of the substance-liposome combination. The encapsulated UN4 showed high cytotoxicity against the tumor lineages tested, with  $IC_{50}$  of 0.5763  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for SW620, 1,255  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for MCF-7 and 1,363  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for SNB19. The nanosystem showed promising results against the tested lineages and showed lower  $IC_{50}$  value compared to the colorectal cancer strain, but the encapsulation rate obtained for the formulation chosen for the test was 43%. Therefore, further characterization studies are needed to complete the pharmacological profile and advance clinical studies as a new chemotherapeutic agent.

**Keywords: Quinone, Antitumor, Liposomal Nanocarrie**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 CÂNCER</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 QUINONAS</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3 LIPOSSOMAS</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 GERAIS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 AMOSTRA E REAGENTES</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3.1 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA</b> ...	<b>20</b>
<b>3.3.2 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.2.1 PREPARAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO DA UN4</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.2.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.3 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.4 IDENTIFICAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.4.1 CULTURA DE CÉLULAS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.4.2 ENSAIO DE MTT</b> .....	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMA</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2.1 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA, POTENCIAL ZETA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2.2 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)</b> .....	<b>27</b>

4.2.3 IDENTIFICAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> .....	28
5. CONCLUSÃO .....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença de incidência elevada, considerado um grande problema de saúde, e uma das principais causas de mortalidade. A exposição a diferentes fatores de risco associados ao desenvolvimento de câncer e o crescimento e envelhecimento da população têm como consequência o aumento do número de novos casos diagnosticados (WHO, 2018; BRAY *et al.*, 2018).

Para 2018, a estimativa mundial, computava a ocorrência de 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de óbitos, sendo o câncer de pulmão o mais comumente diagnosticado, correspondendo a 11,6% do total de casos. Outros casos como o câncer de mama feminino (11,6%), câncer de próstata (7,1%) e câncer colorretal (6,1%) estariam entre os de maior incidência. Com relação a mortalidade, o câncer de pulmão também apresentando os maiores índices, com 18,4% do total de óbitos, seguido por outros casos como câncer colorretal (9,2%), câncer de estômago (8,2%) e câncer de fígado (8,2%) como causadores de mortalidade. Entre os homens os diagnósticos mais frequentes incluem câncer de pulmão, câncer de próstata e câncer colorretal. Para as mulheres, o câncer de mama lidera com maior número de diagnósticos e como a principal causa de mortalidade por câncer (BRAY *et al.*, 2018).

No Brasil, a previsão era para a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer no biênio de 2018-2019. Entre os casos analisados, os maiores em número de diagnósticos incluem câncer de próstata (68 mil) em homens e câncer de mama (60 mil) em mulheres. Outros tipos mais incidentes para os homens incluem o câncer de pulmão (8,7%), de intestino (8,1%), de estômago (6,3%) e de cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, casos como câncer de intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) também estão entre os mais recorrentes (Figura 1) (INCA 2017b).

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2018, exceto pele não melanoma\*.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma\*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

\*Números arredondados para múltiplos de 10. Fonte: INCA 2017b.

A formação de tumores ou neoplasias é ocasionada por modificações no circuito-controle responsável pelo crescimento e divisão das células que adquirem propriedades complementares que permitem o crescimento de tumores e a disseminação por metástase para outros locais. Essa alteração no padrão de crescimento celular normal gera tecidos complexos compostos por tipos celulares diferentes que adquirem características biológicas envolvidas no processo de patogênese tumoral e interagem entre si durante processos celulares, criando um microambiente celular que favorece a tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Como os tecidos normais, os tumores requerem nutrientes e oxigênio, bem como a capacidade de eliminar resíduos metabólicos e dióxido de carbono. A vascularização associada ao tumor, gerada pelo processo de angiogênese, fornece essas necessidades. Assim, durante a progressão do tumor, a angiogênese quase sempre permanece ativada, induzindo vasos sanguíneos normalmente quiescentes a continuamente gerar novos vasos que ajudam a sustentar a expansão e crescimento das células neoplásicas (HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

O processo de invasão e metástase prevê uma sucessão de mudanças biológicas em diferentes etapas, começando com invasão local, seguida pela entrada de células cancerígenas nos vasos sanguíneos e linfáticos, a passagem dessas células através dos sistemas linfáticos e circulatório, até o seu

extravasamento em tecidos distantes, formando nódulos de células cancerígenas, que crescem e se desenvolvem em tumores maiores (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

Essas alterações relacionadas a tumorigênese ocorrem em diferentes etapas do metabolismo, interferindo na interação entre as células e os metabólitos e afetando a atividade metabólica celular. O objetivo dessas modificações é permitir que as células cancerígenas mantenham uma proliferação desregulada e desenvolver um microambiente favorável ao crescimento e migração, através de mecanismos que afetam o influxo de metabólitos e a disponibilidade de nutrientes necessários, utilizando preferencialmente rotas metabólicas que contribuem para as propriedades tumorigênicas (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

O tratamento contra o câncer pode variar dependendo do tipo, estágio e gravidade da doença. Os três principais tipos de tratamento incluem cirurgia, para remoção do tumor, radioterapia, através da exposição à radiação e quimioterapia, que consiste em um tratamento à base de fármacos, que interferem em diferentes processos tais como desenvolvimento, crescimento, disseminação e invasão de células cancerígenas. Esses tratamentos podem ser realizados de forma associada para obter resultados mais eficientes na terapia (MILLER *et al.*, 2016; INCA, 2017a).

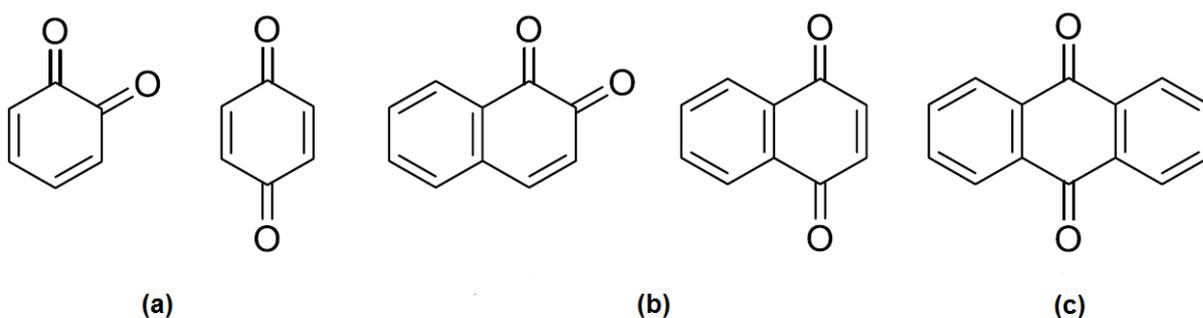
## **1.2 QUINONAS**

Os compostos de origem natural ainda são de grande destaque na descoberta de novos fármacos devido a considerável diversidade química desses produtos (KOEHN; CARTER, 2005). A descoberta de compostos com propriedades farmacológicas contribui para o desenvolvimento de novos medicamentos, funcionando como uma fonte de pesquisa para a geração e síntese de derivados viáveis para uso no tratamento de doenças (THOMFORD *et al.*, 2018).

As quinonas são um grupo de compostos orgânicos caracterizados pela presença de uma estrutura básica comum. A estrutura do núcleo quinóide é formada por um anel aromático contendo dois grupamentos carbonilas que podem estar situados nas posições orto ou para. Esses compostos podem ser classificados pelo tipo de estrutura aromática que contém o anel da quinona, sendo benzoquinonas (Figura 2-a), aquelas que possuem um anel benzênico, naftoquinonas (Figura 2-b),

aquelas que possuem um anel naftalênico e antraquinonas (Figura 2-c), aquelas que possuem um anel antracênico (DA SILVA, FERREIRA, DE SOUZA, 2003; SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Figura 2: Classificação das quinonas nas formas *para*-quinona e *orto*-quinona. (a) Benzoquinonas, (b) Naftoquinonas, (c) Antraquinonas.



Fonte: PEREYRA et al., 2019.

São amplamente encontradas na natureza e podem ser extraídas de plantas, animais e diferentes microrganismos, como fungos e bactérias, e estão envolvidas em numerosos processos químicos e biológicos essenciais para os organismos. As quinonas possuem diferentes atividades biológicas e, portanto, correspondem a uma classe de compostos amplamente estudados (EL-NAJJAR *et al.*, 2011).

Compostos quinônicos e seus derivados sintéticos possuem diferentes propriedades farmacológicas como efeito antitumoral (ASCHE, 2005; DE OLIVEIRA; ALVES, 2002; BEGLEITER, 2000), anti-inflamatório (De ALMEIDA *et al.*, 1990) e antimicrobiano (SOUZA *et al.*, 2013). O potencial citotóxico de muitas quinonas torna esse grupo de substâncias relevante no desenvolvimento de fármacos antineoplásicos. Quinonas com efeitos antitumorais são objeto de pesquisa devido a sua atividade biológica e mecanismos de ação que podem variar dependendo da estrutura química e da presença de outros grupos funcionais (WELLINGTON, 2015; BOLTON *et al.*, 2000; O'BRIEN, 1991).

Com relação à toxicidade, as quinonas apresentam duas propriedades químicas principais que lhe proporcionam reatividade com os componentes químicos dos sistemas biológicos. Elas possuem as características de serem oxidantes e eletrofílicas, o que confere a capacidade de realizar conversões redox reversíveis.

Parte do mecanismo de ação das quinonas está relacionado a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas pela biorredução do núcleo quinóide por enzimas específicas e oxigênio, as quais são tóxicas e induzem apoptose (POWIS, 1989; MONKS *et al.*, 1992; BOLTON; DUNLAP, 2016).

No ambiente celular normalmente existe a condição de homeostase entre espécies oxidantes e antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio favorecendo o ambiente oxidante. Células cancerígenas estão sob considerável estresse oxidativo e essa condição pode levar a uma série de danos celulares. Diante disso, o uso de fármacos geradores de ERO pode elevar os níveis de estresse oxidativo e desencadear respostas como senescência, necrose e apoptose de forma seletiva (GUPTE; MUMPER, 2009).

Outro mecanismo explorado nas quinonas é a capacidade de interagir com topoisomerasas das células tumorais. Elas podem inibir ambos os tipos de topoisomerasas I e II presentes nas células eucarióticas, sendo a topoisomerase II a principal associada à sua atividade citotóxica e alvo para muitos agentes antitumorais. Ambas as enzimas quebram o DNA usando um resíduo de tirosina catalítica e são essenciais para o funcionamento normal da célula. A função catalítica da topoisomerase II é essencial durante replicação, transcrição e recombinação da molécula de DNA. Qualquer alteração no seu equilíbrio é suficiente para induzir apoptose (KAWIAK *et al.*, 2007; PEREYRA *et al.*, 2019).

Quinonas naturais e seus produtos modificados quimicamente são um importante recurso na busca por compostos citotóxicos. Muitas substâncias que possuem uma estrutura quinônica, como dactinomicina, antibióticos antraciclina (daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina e mitoxantrona), bleomicinas e a mitomicina-C, têm sido utilizadas clinicamente em quimioterapia no tratamento de câncer (GEWIRTZ, 1999; GALM *et al.*, 2005; WOLKENBERG; BOGER, 2002; ZHANG *et al.*, 2006).

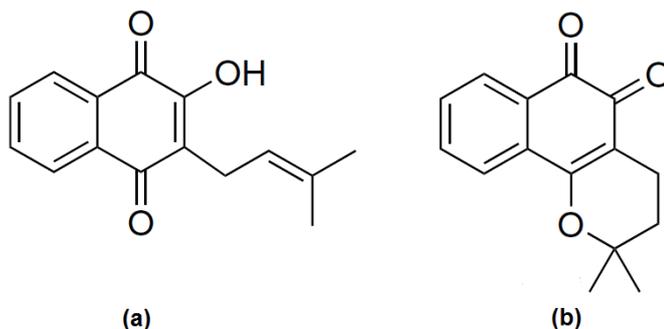
As naftoquinonas, grupo de quinonas que possuem um anel naftalênico em sua estrutura, possuem propriedades citotóxicas que podem ser exploradas no desenvolvimento de novos tratamentos em câncer. O estresse oxidativo e a alquilação nucleofílica são dois mecanismos principais envolvidos nos efeitos gerados pelas naftoquinonas (BOLTON *et al.*, 2000). Dentre as naftoquinonas

naturais destaca-se o lapachol que é um dos principais compostos extraídos de árvores do gênero *Tabebuia* (DA SILVA, FERREIRA, DE SOUZA, 2003).

O lapachol (Figura 3-a) e seus derivados possuem atividade anticâncer com efeitos antiproliferativo e antimetastático tanto em teste *in vivo* como *in vitro* (EPIFANO *et al*, 2014). Além dos efeitos antitumorais o lapachol apresenta outras propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e leishmanicida. Um número significativo de derivados sintéticos relacionados ao lapachol tem mostrado notável atividade citotóxica *in vitro* (HUSSAIN *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2012; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007).

A  $\beta$ -lapachona (Figura 3-b) é um importante derivado do lapachol. Ela possui diferentes propriedades farmacológicas que inclui antibacteriana e antifúngica (GUIRAUD *et al.*, 1994; GOIJMAN; STOPPANI,1985). Além disso, possuem mecanismos que afetam DNA topoisomerases por inibição causando citotoxicidade (LEE *et al.*, 2005).

Figura 3: (a) Estrutura do lapachol e (b) estrutura da  $\beta$ -lapachona



Fonte: PEREYRA *et al.*, 2019.

Vários outros compostos derivados do lapachol são sintetizados com o objetivo de melhorar sua atividade biológica e reduzir a toxicidade que pode afetar de maneira considerável as células saudáveis (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2006). Santos *et al.* (2016) sintetizaram diferentes derivados e avaliaram a atividade citotóxica em linhagens tumorais humanas *in vitro*. Dentre os resultados obtidos, a oxima  $\beta$ -lapachona apresentou melhor atividade citotóxica nas linhagens testadas, demonstrando potencial no desenvolvimento de compostos antitumorais.

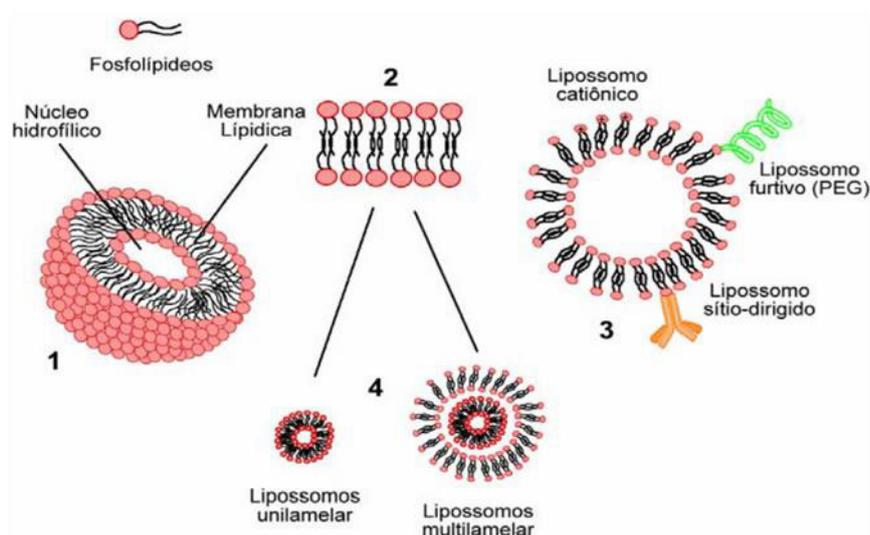
Mesmo com a eficiência citotóxica das naftoquinonas contra diferentes linhagens celulares (KLOTZ, HOU; JACOB, 2014; KLAUS *et al.*, 2010), esses

compostos possuem limitações em sua aplicação devido a sua baixa solubilidade em fluidos biológicos e alta toxicidade (FERREIRA *et al.*, 2016). Apesar da eficiência contra células tumorais *in vitro*, essas complicações podem limitar a administração sistêmica e a aplicação clínica *in vivo* (PRABAGAR *et al.*, 2007). Diversas estratégias, com o auxílio da nanotecnologia podem ser adotadas para melhorar a eficácia das quinonas, evitando alguns dos principais problemas apresentados.

### 1.3 LIPOSSOMAS

Lipossomas consistem em vesículas compostas por bicamadas lipídicas uni ou multilamelares, formando compartimentos hidrofílicos internos separados por bicamadas fosfolipídicas (Figura 4). A composição desses sistemas lipossomais permite o encapsulamento substâncias hidrofílicas que se distribuem nos compartimentos aquosos e de compostos lipofílicos que podem ser inseridos na bicamada lipídica. A estrutura e mecanismo de ação dos lipossomas podem variar dependendo da finalidade de uso, assim, as vesículas lipossomais podem ser desenvolvidas com uma ampla variedade de tamanhos e componentes constituintes da formulação (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

Figura 4: 1-Estrutura dos lipossomas. 2-Bicamada lipídica. 3-Lipossomas com modificações na superfície. 4-Tipos de lipossomos de acordo com o número de camadas.



FONTE: Apolinário *et al.*, 2017

Dessa forma, os lipossomas podem ser classificados de acordo com sua estrutura com base no tamanho e no número de bicamadas. Assim, eles podem ser classificados como vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV). De acordo com a composição e mecanismo de interação intracelular, são classificados como lipossomas convencionais (CL), lipossomas sensíveis ao pH, lipossomas catiônicos, lipossomas de longa circulação (LCL) e imunolipossomas (PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015; PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

Esses sistemas podem ser utilizados com o objetivo de melhorar a ação e a seletividade dos medicamentos (PINTO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012; KHADKA et al., 2014). O uso de formulações permite a alteração de características importantes como a solubilidade de substâncias, a biodisponibilidade e redução da degradação durante a circulação. Também pode ser desenvolvido com o objetivo de aumentar a concentração de fármaco no local desejado, melhorando a eficácia e reduzindo efeitos colaterais indesejados (ADAIR et al., 2010; BOZZUTO; MOLINARI, 2015; BETAGERI; PARSONS, 1992; RIAZ et al., 2018).

Formulações lipossomais possuem propriedades importantes como tamanho de partícula, carga e composição lipídica. Essas características precisam ser avaliadas, pois influenciam a estabilidade dessas formulações *in vitro* e *in vivo*. Essas formulações também podem ser constituídas de fosfolípídeos de origem natural, acrescentando as vantagens de serem biodegradáveis e possuem toxicidade mínima. Compostos biologicamente ativos podem ser encapsulados em lipossomas como uma forma de proteção contra a inativação, degradação e diluição imediata na circulação (SERCOMBE et al., 2015; SPUCH; NAVARRO, 2011).

A estabilidade dos lipossomas pode afetar a eficácia terapêutica e a vida de prateleira do fármaco encapsulado. Estudos de estabilidade são importantes no desenvolvimento de formulações lipossomais para determinar parâmetros envolvendo o processo de fabricação e armazenamento, assegurando a integridade do medicamento. Depois de preparadas, as formulações lipossômicas, precisam manter a estabilidade física e química, que estão relacionadas com a uniformidade de tamanho e eficiência de encapsulação e com a degradação mínima de todos os compostos. Diversas estratégias para otimização de características como tamanho

de partícula, pH, força iônica e adição de antioxidantes e agentes quelantes podem ser utilizadas para promover a estabilidade e minimizar o processo de degradação (YADAV *et al.*, 2011; MAHERANI *et al.*, 2011; BRIUGLIA *et al.*, 2015).

Além da estabilidade e tempo de prateleira, outros obstáculos também precisam ser superados no desenvolvimento de formulações lipossomais. A técnica de esterilização dos lipossomas precisa ser escolhida cuidadosamente, pois lipossomas são sensíveis a temperaturas muito elevadas e a alguns métodos de radiação. O uso de produtos químicos também não é uma opção viável, pois pode afetar a estabilidade e modificar a composição dos lipossomas. Assim, a opção mais viável a ser considerada é a filtração (TOH; CHIU, 2013).

O tempo de circulação sanguínea depende de características físicoquímicas, da composição lipídica escolhida e do tipo de lipossoma. Para a liberação do fármaco no local de ação, as bicamadas lipídicas se fundem com a membrana celular para liberar o conteúdo do lipossoma. Essa incorporação pode ocorrer por meio de endocitose, que consiste na adsorção de lipossomas na superfície da membrana celular seguida de envolvimento e internalização dos lipossomas. Também podem ocorrer por meio da fusão das bicamadas lipídicas dos lipossomas com os lipídios da membrana celular e por troca lipídica entre a membrana lipossômica e a membrana celular. Devido à semelhança, as proteínas de transferência lipídica na membrana celular reconhecem facilmente os lipossomas e causam a troca lipídica (YADAV *et al.*, 2017; DARAEI *et al.*, 2016).

A aplicação terapêutica de lipossomas pode ser útil para modificar formulações convencionais e obter melhor eficácia terapêutica e segurança em comparação a formulações existentes. A formulação em lipossomas pode ajudar a reduzir a toxicidade de um composto em células normais. A determinação de um alvo específico pode ajudar na entrega de uma fração maior do medicamento ao local desejado, reduzindo a exposição das células normais aos fármacos. Como exemplo, na administração sistêmica, imunolipossomas de longa circulação são capazes de reconhecer e se ligar às células-alvo com maior especificidade e possui maior probabilidade de liberar o agente terapêutico no local desejado (ALYANE; BARRATT; LAHOUEL, 2016; ELOY *et al.*, 2017; MERINO; ZALBA; GARRIDO, 2018).

Para alcançar a eficácia terapêutica ideal, é necessária uma concentração plasmática duradoura em níveis adequados. Os lipossomas proporcionam liberação prolongada dos fármacos alvos específicos (EL KECHAI *et al.*, 2016; JOSEPH *et al.*, 2018; KAMINSKI *et al.*, 2016). Formulações lipossomais também podem ser aplicadas em fármacos de ação intracelular. Quando existe a necessidade de atravessar a membrana plasmática e chegar ao citosol, os lipossomas podem ser usados para aumentar a internalização do fármaco pelas células, mantendo os níveis terapêuticos (MARUYAMA, 2011; KONING; KAMPS; SCHERPHOF, 2002; CHATIN *et al.*, 2015).

Diante do exposto, a tecnologia dos lipossomas pode trazer diversas vantagens como tamanho de partícula mais homogêneo, tempo de circulação maiores, melhor estabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade e pode ser utilizada para o encapsulamento de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas (ALLEN; CULLIS 2013; JOHNSTON *et al.*, 2007). O uso desses sistemas pode facilitar a chegada dos agentes quimioterápicos ao local do tumor, liberando de forma controlada o fármaco no local de ação e reduzindo efeitos colaterais prejudiciais. Essas características podem ajudar a reduzir limitações e inconvenientes que podem ocorrer com o uso de algumas formulações convencionais (CUKIERMAN; KHAN, 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GERAL**

Preparar nanosistema lipossomal contendo derivado quinônico (UN4) e realizar as etapas de caracterização necessárias ao melhoramento do perfil farmacológico da quinona UN4 encapsulada, a fim de propiciar o seu avanço na terapêutica anticâncer.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

1. Desenvolver tecnologicamente as formulações nanocarreadoras lipossomais;
2. Avaliar tamanho de partículas e potencial zeta da nanoformulação;
3. Avaliar a atividade dos sistemas nanoencapsulados em testes *in vitro*, utilizando diferentes linhagens de células tumorais e não tumorais.
4. Caracterizar o perfil físicoquímico e cinética do composto nanoencapsulado;
5. Realizar etapas de avaliação necessárias ao melhoramento do perfil farmacológico da quinona UN4 nanoencapsulada.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRA E REAGENTES**

A amostra UN4 foi fornecida pela Profa. Dr. Cleonina Roberta Melo Araújo da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Fosfatidilcolina de soja (PC), colesterol, octadecilamina e Trealose (Sigma-Aldrich) e Clorofórmio e metanol (Merck). Meio RPMI-1640, DMEM, soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina (Gibco, Invitrogen). Acetonitrila (Lichrosolv, Merck). DMSO (Êxodo científica).

#### **3.2 FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMA**

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico proposto por Lira *et al*, 2009. Uma das formulações foi composta somente por lipídios que corresponde ao lipossoma controle (LBR) e à outra formulação foi adicionada a substância UN4 aos fosfolipídeos (LUN4). A composição base dos lipossomas foi fosfatidilcolina de soja, colesterol e octadecilamina. Já para os lipossomas contendo UN4 o total da substância adicionado foi de 5 mg. Os lipídios foram dissolvidos em 40 mL de solução clorofórmio/metanol 3:1 (v/v) (30 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol). Após total solubilização, a solução orgânica foi levada ao rotaevaporador a 37°C e 100 rpm durante 30 minutos, para evaporação total do solvente e obtenção do filme lipídico seco. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado adicionando 10 mL de uma solução de trealose 0,1% como agente crioprotetor, possibilitando armazenar lipossomas a baixas temperaturas. Por último a suspensão lipossomal foi homogeneizada em sonicador durante 120 segundos, amplitude de 60% e ciclos pulsados (ciclo ON de 5 segundos e Ciclo OFF de 2 segundos) para obter vesículas unilamelares pequenas (SUV).

#### **3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS**

##### **3.3.1 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS E POTENCIAL ZETA**

A análise do tamanho das nanopartículas e a medida do potencial zeta foram realizadas em parceria com Dr. Guilherme Julião Zoocolo da Embrapa Agroindústria Tropical do Ceará por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS) e uso do aparelho Zetasizer Nano Ver. 6.20.

### **3.3.2 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

Esse tipo de avaliação visa determinar a porcentagem do composto encapsulado no sistema de liberação. Tal avaliação foi realizada em parceria com o professor Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Através de métodos espectrofotométricos, os valores de concentração de UN4 isolado e UN4 total foram obtidos a partir da equação da reta da curva de concentração.

#### **3.3.2.1 PREPARAÇÃO DA CURVA DE CONCENTRAÇÃO DA UN4**

Uma solução estoque de UN4 foi preparada utilizando um balão volumétrico de 10 mL e 3 mg de substância para obter uma solução com concentração de 600 µg/mL com acetonitrila. A solubilização em acetonitrila foi feita em banho ultrassônico por 10 min e posteriormente a solução foi filtrada em filtro PTFE. A partir da solução estoque foram preparadas soluções com seis concentrações diferentes em triplicatas. A análise das soluções preparadas foi feita em espectrofotometria a 291 nm.

#### **3.3.2.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO EM LIPOSSOMAS**

Para análise da eficiência de encapsulação foram determinadas a quantidade de fármaco na fração total e a quantidade de fármaco na fração lipossômica purificada.

O valor da fração total foi calculado por meio da diferença entre a absorbância total da formulação contendo UN4 e a absorbância total do lipossoma controle sem o composto. As formulações contendo UN4 e lipossomas sem composto, inicialmente, foram agitadas em vórtex. Em triplicata, as soluções foram preparadas utilizando 300 µL de formulação em tubo falcon e 2700 µL de acetonitrila, para romper os lipossomas e solubilizar UN4. Após agitação em vórtex e deixadas em banho ultrassônico por 10 minutos. Por último, foram filtradas em PTFE 0,45 µm, para eliminar qualquer material insolúvel.

A fração purificada foi calculada pela diferença entre a absorbância da formulação UN4 purificada e a absorbância da formulação branco purificada. O preparo das soluções a partir das formulações foi feito, inicialmente, filtrando 1500 µL de lipossoma em PVDF 0,45µm, em tubo de ensaio, para separar a substância

UN4 que não foi encapsulada e precipitou. Em triplicata, o filtrado foi adicionado em tubo falcon e diluído em acetonitrila. Após agitação em vórtex foram deixadas em banho ultrassônico por 10 minutos e novamente filtradas em PTFE 0,45 µm.

A análise das amostras foi feita a 291nm, zerando com acetonitrila. Após calcular os valores de absorvância das frações total e purificada, os valores de concentração foram obtidos a partir da equação da reta da curva de concentração. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada utilizando:

$$EE = \frac{[Fração\ de\ LUN4\ Purificado] \times 100}{[Fração\ de\ LUN4\ Total]}$$

### **3.3.3 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)**

Análises termogravimétricas foram realizadas para amostras das formulações com o objetivo de avaliar possíveis interações químicas. Para esse teste foram utilizadas amostras da droga livre (UN4), encapsulada (LUN4) e do lipossoma sem substância (LBR).

A análise termogravimétrica (TGA) foi executada através do equipamento STA6000 (PerkinElmer precisely), em que a variação de peso foi determinada como uma função da temperatura. A variação de temperatura foi de 25 °C a 400 °C e a taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera em ar sintético com vazão do gás 50 ml/min.

### **3.3.4 IDENTIFICAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL *IN VITRO***

#### **3.3.4.1 CULTURA DE CÉLULAS**

Para avaliar a citotoxicidade do nanossistema foram utilizadas diferentes linhagens celulares tumorais. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células, mantidas com os meios RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C. O crescimento celular foi verificado diariamente com a utilização de microscópio de inversão e o meio trocado sempre que o crescimento celular atingiu uma confluência necessária para renovação de nutrientes.

### 3.3.4.2 ENSAIO DE MTT

O teste do MTT é uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis baseada na conversão do sal de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura. O ensaio foi utilizado para quantificar a citotoxicidade dos compostos frente as linhagens celulares obtendo-se o valor da concentração inibitória capaz de inibir 50% do crescimento celular ( $CI_{50}$ ) (MOSMANN, 1983).

As linhagens foram postas em placas de 96 poços (100  $\mu$ L/poço). Após 24h as células foram tratadas com os compostos nanoencapsulados (LUN4), com o lipossoma sem substância (LBR) e com a substância livre (UN4). Os compostos foram testados em diluições seriadas e em duplicata ou triplicata, sendo a maior concentração testada da substância na placa foi de 5  $\mu$ g/mL.

Tabela 1: Linhagens celulares usadas.

Linhagem	Descrição
SW620	Colorretal
MCF7	Adenocarcinoma de mama
SNB-19	Astrocitoma-Glioblastoma

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o período de 72h de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 100 $\mu$ L da solução de MTT a 1%, e as placas voltaram para a incubadora por 3h em estufa a 37°C e a 5 %  $CO_2$ . Após esse período, as placas foram centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante descartado, e o precipitado diluído em 100  $\mu$ L de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595 nm (MOSMANN *et al.*, 1983). Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa *Graph Prism* versão 5.0 (GraphPad, Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMA

Os lipossomas contendo UN4 foram obtidos utilizando o método de hidratação do filme lipídico. Nas figuras 5a e 5b, observa-se a formação do filme lipídico após a rotaevaporação.

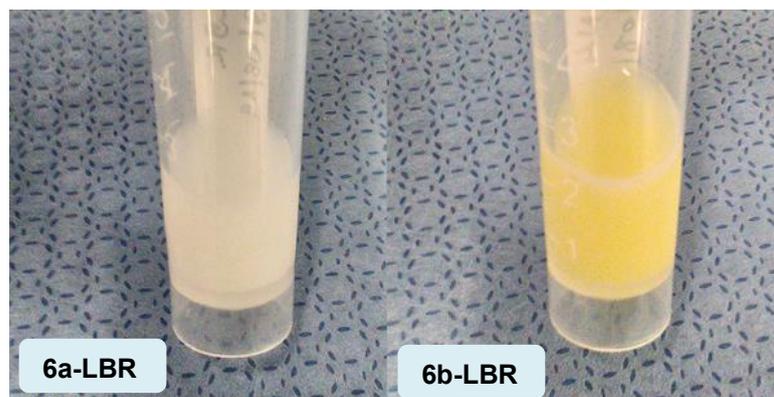
Figura 5: Formação do filme lipídico. 5a - Somente lipossoma (LBR); 5b - Lipossoma contendo UN4 (LUN4).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A formulação apresentou aspecto leitoso e homogêneo, após a reidratação com Trealose 0,1% e sonicação da formulação controle sem UN4 (LBR) e formulação contendo UN4 (LUN4) (Figura 6).

Figura 6: Filme lipídico reidratado com trealose 0,1%. 6a – Lipossoma controle (LBR); 6b - Lipossoma contendo UN4 (LUN4).



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOSSISTEMAS

### 4.2.1 Distribuição do tamanho de partículas, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

O tamanho de partícula, potencial zeta e a taxa de encapsulação podem ser observados na tabela 2. O tamanho médio obtido a partir de dez leituras, utilizando o método de espalhamento de luz dinâmico, foi de 31,35 nm para os lipossomas contendo UN4 (LUN4) e de 38,74 nm para lipossomas controle (LBR).

Tabela 2: Avaliação do tamanho das partículas, Potencial Zeta e taxa de encapsulação das nanoemulsões de UN4 em lipossomas.

Média de 10 leituras			
Substâncias	Potencial Zeta (mV)	Tamanho das Partículas (nm)	Taxa de Encapsulamento
LUN4	+50	31,35	43%
LBR	+51,4	38,74	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a reidratação do filme lipídico partículas de diversos tamanhos e formas se formam e para tentar resolver esse problema técnicas como a sonicação é bastante utilizada para reduzir os tamanhos dos lipossomas, pois as ondas ultrassônicas produzidas conseguem quebrar vesículas lipossomais maiores em lipossomas com um diâmetro menor, transformando vesículas multilamelares em pequenas vesículas de diversos tamanhos. Além disso, essa técnica permite obter vesículas unilamelares que podem variar de tamanho entre aproximadamente 15 nm e 50 nm. Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho e número de bicamadas, sendo divididos em vesículas multilamelares ou unilamelares (DEEPTHI; KAVITHA, 2014; MISHRA *et al.*, 2018; AKBARZADEH *et al.*, 2013).

Os parâmetros de sonicação também são essenciais, pois eles permitem formulações de distribuição de tamanho de partículas homogênea. Os parâmetros

de sonicação escolhidos para homogeneizar a distribuição do tamanho de partículas permitiram a obtenção de partículas com os tamanhos observados. De acordo com a média de tamanho obtida e a classificação dos lipossomas a maiorias das vesículas formadas são pequenas.

O tamanho da partícula do lipossoma pode afetar diversas características como estabilidade, eficiência de encapsulação, perfil de liberação e biodisponibilidade, que são importantes para determinar sua efetividade (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016; DANAELI *et al.*, 2018). O tamanho do nanossistema afeta a farmacocinética, distribuição nos tecidos e liberação. É importante considerar o tamanho da partícula e sua razão superfície volume para obter partículas com melhor solubilidade, biodisponibilidade e controle de liberação. A ocorrência de alguns processos fisiológicos como captação e acumulação hepática, difusão tecidual e excreção renal dependem do tamanho das partículas. Somente nanocarreadores de um determinado tamanho, geralmente  $\leq 150$  nm, são capazes de entrar ou sair de capilares no microambiente tumoral ou endotélio hepático (BERTRAND; LEROUX, 2012; BLASI *et al.*, 2007; ALBANESE; TANG; CHAN; 2012).

O diâmetro do nanossistema é uma propriedade que afeta o tempo de permanência na circulação sanguínea e a capacidade de acumular a substância próxima ou no tumor (PERRAULT *et al.*, 2009; JAIN; STYLIANOPOULOS 2010). Nanopartículas com um tamanho aproximado de 100 nm possuem maior tempo de circulação no sangue e bom efeito acumulativo no tumor, contudo, podem apresentar baixa difusão no tumor e podem liberar e acumular o medicamento nos vasos sanguíneos longe de células mais remotas. Enquanto partículas menores que 20 nm seriam capazes de se difundir mais profundamente e de se distribuir mais uniformemente no tecido do tumor. A desvantagem de vesículas menores é que elas seriam mais rapidamente eliminadas durante a circulação sanguínea (SUN *et al.*, 2017; CHOI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010).

O diâmetro pequeno das vesículas formadas pode ter afetado a taxa de encapsulação, que foi de 43%, uma vez que o compartimento disponível para incorporação da substância se torna menor com a redução do diâmetro. Outros

fatores como a proporção e composição lipídica escolhida e as propriedades químicas da UN4 podem ter afetado a capacidade de incorporação da substância.

Além do tamanho das nanopartículas, a carga superficial também é um fator importante para determinar sua eficiência no organismo. Nanopartículas carregadas positivamente são absorvidas em uma taxa mais rápida pelas células quando comparadas a partículas carregadas negativamente (SLOWING; TREWYN; LIN, 2006; THOREK; TSOURKAS, 2008). Ao avaliar os dados de potencial zeta observamos que os valores apresentados foram positivos, sendo +50 mV para LUN4 e +51,4 mV para LBR.

O potencial zeta é uma propriedade que pode ser utilizada para determinar a estabilidade dos nanolipossomas. A carga de um lipossoma depende de sua composição e pode ser positiva, negativa ou neutra. Um elevado valor de potencial zeta positiva ou negativamente, geralmente em módulo  $> 30$  mV, é importante para manter a estabilidade e evitar agregação das partículas, uma vez que forças repulsivas atuam entre os lipossomas diminuindo a possibilidade de as partículas voltarem a se agregar (HONARY; ZAHIR, 2013; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015; LAOUINI *et al.*, 2012).

Os lipossomas convencionais são compostos de fosfolipídios e colesterol. A carga final das vesículas depende da composição lipídica escolhida. Geralmente outros lipídios com carga são adicionados para atingir um potencial zeta desejado, melhorando a estabilidade dos lipossomas e evitando a agregação. A octadecilamina (estearilamina) é pode ser utilizada para fornecer carga positiva e a fosfatidilserina para adicionar carga negativa (SANTOS *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2007; ANCHIÊTA *et al.*, 2014). O valor positivo de potencial zeta dos lipossomas contendo UN4 se deve a constituição e proporção lipídica das vesículas na formulação escolhida, uma vez que a octadecilamina fornece carga positiva para a formulação.

#### **4.2.2 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)**

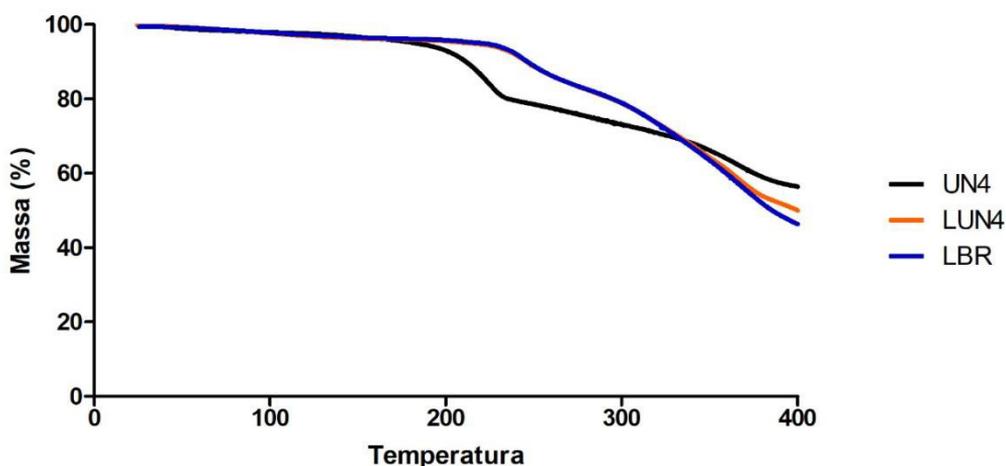
Análise térmica pode ser feita por diferentes técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância ou seus derivados de reação podem ser monitoradas em função do tempo, enquanto a temperatura da amostra é

submetida a uma variação controlada. Existem vários tipos de análise térmica, dentre eles a Análise Termogravimétrica (TGA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A TGA permite determinar as variações de massa de diferentes compostos quando são submetidos a um aumento de temperatura (DENARI; CAVALHEIRO, 2012), enquanto que o DSC é método termo analítico que investiga as interações entre os materiais utilizados nas formulações e o fármaco.

Observa-se para todas as amostras um comportamento semelhante até a temperatura de aproximadamente 200°C. As curvas termogravimétricas das formulações lipossomais apresentaram perfis semelhantes, na presença ou ausência da substância UN4 (Figura 7).

A avaliação termogravimétrica realizada na UN4, LUN4 e LBR, evidenciou que o lipossoma controle e o LUN4 são termicamente estáveis até 250°C, ao passo que a UN4 degradada já em 200°C, segue com maior perda de massa que a sua forma encapsulada, LUN4, que conseguiu preservar essa degradação (Figura 6).

Figura 7: Análise Termogravimétrica (TGA) das amostras UN4, LUN4 e LBR.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.3 Identificação do efeito antitumoral *In Vitro*

Os compostos testados em diluições seriadas, sendo a maior concentração testada da substância na placa foi de 5 ug/mL. Como pode ser observado na tabela 3, a quinona UN4 apresentou alto potencial citotóxico frente às linhagens testadas,

principalmente para as linhagens SW620 e SNB19, apresentando os valores mais baixos de  $CI_{50}$ , sendo eles 0,9463  $\mu\text{g/mL}$  e 2,177  $\mu\text{g/mL}$ . De acordo com os resultados obtidos, a substância encapsulada (LUN4) proporcionou aumento da citotoxicidade da substância com redução da  $CI_{50}$  em todas as linhagens testadas com valores de 0,5763  $\mu\text{g/mL}$  para SW620, 1,255  $\mu\text{g/mL}$  para MCF-7 e 1,363  $\mu\text{g/mL}$  para SNB19.

Tabela 3. Atividade citotóxica em diferentes células de câncer, expressa em  $CI_{50}$  para composto livre (UN4), e encapsulado (LUN4) e somente lipossoma (LBR) após 72h de incubação.

Linhagem	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) Intervalo de confiança		
	LBR	UN4	LUN4
SW620 (Colorretal)	-	0,9463 (0.8678 - 1.032)	0,5763 (0.5423 - 0.6125)
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	-	2,506 (2.330 - 2.696)	1,255 (1.074 - 1.466)
SNB19 (Astrocitoma- Glioblastoma)	-	2,177 (1.930 - 2.455)	1,363 (1.099 - 1.691)

(-) não apresentou atividade na concentração testada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O lipossoma sem substância (LBR), utilizado para comparar os efeitos dos lipossomas sobre as células tumorais e sobre a atividade citotóxica da substância, não apresentou citotoxicidade frente a nenhuma das linhagens testadas, uma vez que a dose necessária para a concentração inibitória capaz de inibir 50% do crescimento celular é maior ou igual a dose utilizada no tratamento contendo lipossoma e composto. Esses resultados sugerem que a composição lipídica tem

baixa citotoxicidade e teve pouca interferência na atividade antiproliferativa do composto UN4. Outros trabalhos também apresentaram resultados semelhantes (CORTESE *et al.*, 1994).

Os resultados mostram que, para a formulação analisada nos testes *in vitro* com células tumorais, a incorporação da UN4 em lipossomas aumentou os efeitos citotóxicos da substância em relação a substância livre. Isso sugere uma possível interferência dos lipossomas, no aumento da solubilidade, da biodisponibilidade da UN4 encapsulada e nos mecanismos de captação pelas células, permitindo uma transferência mais eficaz da substância para dentro da célula. A interação entre lipossomas e células durante a internalização dos fármacos pode ocorrer por diferentes mecanismos como fusão, endocitose, adsorção e transferência lipídica (TORCHILIN, 2005).

## 5. CONCLUSÃO

Utilizando o método de hidratação do filme lipídico foi possível encapsular derivado quinônico (UN4) no sistema lipossomal. Com, relação ao tamanho das vesículas lipossomais a técnica permitiu obter vesículas unilamelares pequenas (SUV), contudo o tamanho dos lipossomas pode ter interferido na taxa de encapsulação. A partir dos resultados observados, outras formulações podem ser desenvolvidas para conseguir uma eficiência de encapsulação maior e consequentemente reduzir o desperdício do composto. A composição lipídica escolhida para a formulação apresentou um potencial zeta satisfatório para evitar a agregação dos lipídios.

Diante do exposto, conclui-se que a quinona UN4 apresentou potencial farmacológico antitumoral e a combinação da quinona UN4 com lipossomas mostrou eficiência citotóxica principalmente contra as linhagens tumorais de câncer colorretal (SW620) e adenocarcinoma de mama (MCF7).

Ao comparar a análise termogravimétrica das amostras LUN4 e LBR com a análise do fármaco puro UN4, observa-se que a substância livre iniciou a degradação em temperatura inferior às temperaturas de degradação das amostras lipossomais, sugerindo uma interação entre a substância UN4 e os lipossomas apresentando uma combinação de maior estabilidade térmica inicialmente quando comparado com a substância isolada.

Assim, outras etapas de caracterização do nanossistema lipossomal, como caracterização morfológica, perfil de liberação das formulações e estudos de estabilidade são necessárias para aperfeiçoar o potencial farmacológico da quinona.

## REFERÊNCIAS

ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva. – 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2017a.108 p.

ADAIR, James H. et al. Nanoparticulate alternatives for drug delivery. *ACS nano*, v. 4, n. 9, p. 4967-4970, 2010.

AKBARZADEH, Abolfazl et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, v. 8, n. 1, p. 102, 2013.

ALBANESE, Alexandre; TANG, Peter S.; CHAN, Warren CW. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, v. 14, p. 1-16, 2012

ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

ALYANE, Mohamed; BARRATT, Gillian; LAHOUEL, Mesbah. Remote loading of doxorubicin into liposomes by transmembrane pH gradient to reduce toxicity toward H9c2 cells. *Saudi pharmaceutical journal*, v. 24, n. 2, p. 165-175, 2016.

ANCHIÊTA JÚNIOR, José Jauro Lopes et al. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.

APOLINÁRIO, Alexsandra Conceição et al. POLIMEROSSOMOS VERSUS LIPOSSOMOS: A EVOLUÇÃO DA “BALA MÁGICA”. *Química Nova*, v. 40, n. 7, p. 810-817, 2017.

ARAÚJO, Melo. Cytotoxicity Activity of Semisynthetic Naphthoquinone-1-oximes against Cancer Cell Lines. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 8, n. 12, p. 202-206, 2016.

ASCHE, C. Antitumour quinones. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 5, n. 5, p. 449-467, 2005.

BAHARI, Leila Azhar Shekoufeh; HAMISHEHKAR, Hamed. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; a comparative literature review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, v. 6, n. 2, p. 143, 2016.

BATISTA, Cinthia Meireles; DE CARVALHO, Cícero Moraes Barros; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BEGLEITER, Asher. Clinical applications of quinone-containing alkylating agents. *Front Biosci*, v. 5, n. 11, p. 153-171, 2000.

BERTRAND, Nicolas; LEROUX, Jean-Christophe. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *Journal of controlled release*, v. 161, n. 2, p. 152-163, 2012.

BETAGERI, G. V.; PARSONS, D. L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *International journal of pharmaceutics*, v. 81, n. 2-3, p. 235-241, 1992.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337-351, 2016.

BHOWMICK, Neil A.; NEILSON, Eric G.; MOSES, Harold L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, v. 432, n. 7015, p. 332, 2004.

BLASI, Paolo et al. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, n. 6, p. 454-477, 2007.

BOLTON, Judy L. et al. Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology*, v. 13, n. 3, p. 135-160, 2000.

BOLTON, Judy L.; DUNLAP, Tareisha. Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. *Chemical research in toxicology*, v. 30, n. 1, p. 13-37, 2016.

BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese. Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, v. 10, p. 975, 2015.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BRIUGLIA, Maria-Lucia et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug delivery and translational research*, v. 5, n. 3, p. 231-242, 2015.

CHANG, Marisol. *Dynamic Light Scattering*. 2010.

CHATIN, Benoît et al. Liposome-based formulation for intracellular delivery of functional proteins. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, v. 4, p. e244, 2015.

CHOI, Chung Hang J. et al. Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 3, p. 1235-1240, 2010.

CORTESI, Rita et al. Liposome-associated retinoids: production, characterization and antiproliferative activity on neoplastic cells. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 2, n. 4, p. 281-291, 1994.

CUKIERMAN, Edna; KHAN, David R. The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, v. 80, n. 5, p. 762-770, 2010.

DA SILVA JÚNIOR, Eufrânio N. et al. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- $\beta$ -lapachone and nor- $\alpha$ -lapachone. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 15, n. 22, p. 7035-7041, 2007.

DA SILVA, Ana Maria Pereira et al. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. *Revista Fitos*, v. 7, n. 04, p. 207-215, 2012.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DARAEI, Hadis et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.

DE ALMEIDA, Edvaldo Rodrigues et al. Antiinflammatory action of lapachol. *J Ethnopharmacol*, v. 29, n. 2, p. 239-41, 1990.

DE OLIVEIRA, Renata Barbosa; ALVES, Ricardo José. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química nova*, v. 25, n. 6/A, p. 976-984, 2002.

DEEPTHI, V.; KAVITHA, A. N. Liposomal drug delivery system-A review. *Rguhs J Pharm Sci*, v. 4, n. 2, p. 47-56, 2014.

DENARI, Gabriela Bueno; CAVALHEIRO, E. T. G. Princípios e aplicações de análise térmica. São Carlos: IQSC, 2012.

EL KECHAI, Naila et al. Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear. *Journal of Controlled Release*, v. 226, p. 248-257, 2016.

EL-NAJJAR, Nahed et al. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, v. 10, n. 3, p. 353, 2011.

ELOY, Josimar O. et al. Immunoliposomes: a review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 159, p. 454-467, 2017.

EPIFANO, Francesco et al. Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. *Phytochemistry reviews*, v. 13, n. 1, p. 37-49, 2014.

ESTEVEZ-SOUZA, A. et al. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 10, p. 1399-1402, 2007.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017b.

FEITELSON, Mark A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2015. p. S25-S54.

FERREIRA, Sabrina B. et al. Synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pyran Naphthoquinones as a New Class of Antitubercular Agents. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, v. 343, n. 2, p. 81-90, 2010.

FERREIRA, Vitor F. et al. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 14, n. 16, p. 5459-5466, 2006.

FRANCISCO FERREIRA, Vitor et al. Strategies for increasing the solubility and bioavailability of anticancer compounds:  $\beta$ -lapachone and other naphthoquinones. *Current pharmaceutical design*, v. 22, n. 39, p. 5899-5914, 2016.

GALM, Ute et al. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. *Chemical reviews*, v. 105, n. 2, p. 739-758, 2005.

GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GEWIRTZ, David A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, v. 57, n. 7, p. 727-741, 1999.

GOIJMAN, Silvia G.; STOPPANI, A. O. M. Effects of  $\beta$ -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 240, n. 1, p. 273-280, 1985.

GUIRAUD, Pascale et al. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and  $\beta$ -lapachone. *Planta Medica*, v. 60, n. 04, p. 373-374, 1994.

GUPTE, Anshul; MUMPER, Russell J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, v. 35, n. 1, p. 32-46, 2009.

HANAHAN, Douglas; FOLKMAN, Judah. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*, v. 86, n. 3, p. 353-364, 1996.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

HUSSAIN, Hidayat et al. Lapachol: an overview. *Arkivoc*, v. 2, p. 145-171, 2007.

JAIN, Rakesh K.; STYLIANOPOULOS, Triantafyllos. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 7, n. 11, p. 653, 2010.

JOHNSTON, Michael JW et al. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1768, n. 5, p. 1121-1127, 2007.

JOSEPH, Joshny et al. Experimental optimization of Lornoxicam liposomes for sustained topical delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, p. 38-51, 2018.

KAMINSKI, Gabriel AT et al. Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery of epidermal growth factor. *Carbohydrate polymers*, v. 140, p. 129-135, 2016.

KAWIAK, Anna et al. Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 223, n. 3, p. 267-276, 2007.

KHADKA, Prakash et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, v. 9, n. 6, p. 304-316, 2014.

KLAUS, Viola et al. 1, 4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 496, n. 2, p. 93-100, 2010.

KLOTZ, Lars-Oliver; HOU, Xiaoqing; JACOB, Claus. 1, 4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules*, v. 19, n. 9, p. 14902-14918, 2014.

KOEHN, Frank E.; CARTER, Guy T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*, v. 4, n. 3, p. 206, 2005.

KONING, Gerben A.; KAMPS, Jan AAM; SCHERPHOF, Gerrit L. Efficient intracellular delivery of 5-fluorodeoxyuridine into colon cancer cells by targeted immunoliposomes. *Cancer detection and prevention*, v. 26, n. 4, p. 299-307, 2002.

KRIEGER, Michaela L. et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *International journal of pharmaceutics*, v. 389, n. 1-2, p. 10-17, 2010

LAOUINI, Abdallah et al. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of colloid Science and Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 147-168, 2012.

LEE, Helen et al. The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, v. 7, n. 4, p. 1195-1208, 2010.

LEE, Jae Hun et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by  $\beta$ -lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacological research*, v. 51, n. 6, p. 553-560, 2005.

LEVINE, Rodney L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 32, n. 9, p. 790-796, 2002.

LIRA, M. C. B. et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *Journal of Liposome Research* 2009; 19: 49-58.

LOIRA-PASTORIZA, Cristina; TODOROFF, Julie; VANBEVER, Rita. Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Advanced drug delivery reviews*, v. 75, p. 81-91, 2014.

MAHERANI, Behnoush et al. Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Current nanoscience*, v. 7, n. 3, p. 436-452, 2011.

MARUYAMA, Kazuo. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Advanced drug delivery reviews*, v. 63, n. 3, p. 161-169, 2011.

MATÉS, José M.; PÉREZ-GÓMEZ, Cristina; DE CASTRO, Ignacio Núñez. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MEHLEN, Patrick; PUISIEUX, Alain. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 6, p. 449, 2006.

MERINO, María; ZALBA, Sara; GARRIDO, María J. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. *Journal of Controlled Release*, v. 275, p. 162-176, 2018.

MILLER, Kimberly D. et al. *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. CA: a cancer journal for clinicians, v. 66, n. 4, p. 271-289, 2016.

MISHRA, Harshita et al. A comprehensive review on Liposomes: a novel drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 8, n. 6, p. 400-404, 2018.

MONKS, Terrence J. et al. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 112, n. 1, p. 2-16, 1992.

MONTEIRO, Lidiane M. et al. Development and characterization of a new oral dapsona nanoemulsion system: permeability and in silico bioavailability studies. *International journal of nanomedicine*, v. 7, p. 5175, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55–63, 1983.

NKANGA, Christian Isalomboto et al. General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. In: Liposomes-Advances and Perspectives. IntechOpen, 2019.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-biological interactions*, v. 80, n. 1, p. 1-41, 1991.

PANDEY, Himanshu; RANI, Radha; AGARWAL, Vishnu. Liposome and their applications in cancer therapy. *Brazilian archives of biology and technology*, v. 59, 2016.

PASZKO, E.; SENGE, M. O. Immunoliposomes. *Current medicinal chemistry*, v. 19, n. 31, p. 5239-5277, 2012.

PATTNI, Bhushan S.; CHUPIN, Vladimir V.; TORCHILIN, Vladimir P. New developments in liposomal drug delivery. *Chemical reviews*, v. 115, n. 19, p. 10938-10966, 2015.

PAVLOVA, Natalya N.; THOMPSON, Craig B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell metabolism*, v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016.

PEREYRA, Carolina Escardó et al. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer cell international*, v. 19, n. 1, p. 1-20, 2019.

PERRAULT, Steven D. et al. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano letters*, v. 9, n. 5, p. 1909-1915, 2009.

PINTO, Eduardo Costa et al. Influence of the efavirenz micronization on tableting and dissolution. *Pharmaceutics*, v. 4, n. 3, p. 430-441, 2012.

POWIS, Garth. Free radical formation by antitumor quinones. *Free radical biology and medicine*, v. 6, n. 1, p. 63-101, 1989.

PRABAGAR, Balakrishnan et al. Enhanced bioavailability of poorly water-soluble clotrimazole by inclusion with  $\beta$ -cyclodextrin. *Archives of pharmacal research*, v. 30, n. 2, p. 249-254, 2007.

RIAZ, Muhammad Kashif et al. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 1, p. 195, 2018.

SANTOS, Hercília Maria Lins Rolim et al. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes. *Drug development research*, v. 67, n. 5, p. 430-437, 2006.

SARTOR, Marta. *Dynamic light scattering*. University of California: San Diego, CA, USA, p. 2-21, 2003.

SERCOMBE, Lisa et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology*, v. 6, p. 286, 2015.

SIMIC, Michael G.; BERGTOLD, David S.; KARAM, Lisa R. Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 214, n. 1, p. 3-12, 1989.

SLOWING, Igor; TREWYN, Brian G.; LIN, Victor S.-Y. Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 46, p. 14792-14793, 2006.

SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; ANDRADE, Jailson B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Química Nova*, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SOUZA, Marina Azevêdo et al. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 342-351, 2013.

SPUCH, Carlos; NAVARRO, Carmen. Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). *Journal of drug delivery*, v. 2011, 2011.

STEEG, Patricia S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine*, v. 12, n. 8, p. 895, 2006.

SUN, Qihang et al. Rational design of cancer nanomedicine: nanoproperty integration and synchronization. *Advanced Materials*, v. 29, n. 14, p. 1606628, 2017.

TACAR, Oktay; SRIAMORNSAK, Pornsak; DASS, Crispin R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.

TALMADGE, James E.; FIDLER, Isaiah J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.

THOMFORD, Nicholas Ekow et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

THOREK, Daniel LJ; TSOURKAS, Andrew. Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials*, v. 29, n. 26, p. 3583-3590, 2008.

TOH, Ming-Ren; CHIU, Gigi NC. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 88-95, 2013.

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

VALASTYAN, Scott; WEINBERG, Robert A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VESKOUKIS, Aristidis S.; TSATSAKIS, Aristidis M.; KOURETAS, Dimitrios. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, v. 17, n. 1, p. 11-21, 2012.

WELLINGTON, Kevin W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones—a review. *RSC Advances*, v. 5, n. 26, p. 20309-20338, 2015.

WISEMAN, Helen; KAUR, Harparkash; HALLIWELL, Barry. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer letters*, v. 93, n. 1, p. 113-120, 1995.

WOLKENBERG, Scott E.; BOGER, Dale L. Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. *Chemical reviews*, v. 102, n. 7, p. 2477-2496, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 2018.

YADAV, A. M. M. S. et al. Stability aspects of liposomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 45, n. 4, p. 402-413, 2011.

YADAV, D. et al. Liposomes for drug delivery. *J. Biotechnol. Biomater*, v. 7, p. 276, 2017.

ZHANG, Guisheng et al. Syntheses and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. *Journal of medicinal chemistry*, v. 49, n. 5, p. 1792-1799, 2006.