

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de farmácia**

**Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas**

Sued Eustáquio Mendes Miranda

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE, EM MODELO  
EXPERIMENTAL, DO LAPACHOL E DO L-FUCOSÍDEO PERACETILADO DO  
LAPACHOL (F-LapA) ENCAPSULADOS EM NANOEMULSÕES O/A**

Belo Horizonte

2023

Sued Eustáquio Mendes Miranda

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE, EM MODELO  
EXPERIMENTAL, DO LAP E DO FUCOSÍDEO PERACETILADO DO LAPACHOL  
(F-LapA) ENCAPSULADOS EM NANOEMULSÕES O/A**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Coorientadores: Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira

Prof. Dr. Ricardo José Alves

Belo Horizonte

2023

M672a Miranda, Sued Eustáquio Mendes.  
Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade, em modelo experimental, do lapachol e do L-fucosídeo peracetilado do lapachol (F-LapA) encapsulados em nanoemulsões O/A [recurso eletrônico] / Sued Eustáquio Mendes Miranda. – 2023.

1 recurso eletrônico (164 f. : il.) : pdf

Orientador: André Luís Branco de Barros.

Coorientadores: Lucas Antônio Miranda Ferreira.  
Ricardo José Alves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Naftoquinona – Teses. 2. Câncer de mama – Teses. 3. Emulsões – Teses. 4. Toxicidade – Teses. I. Barros, André Luís Branco de. II. Ferreira, Lucas Antônio Miranda. III. Alves, Ricardo José. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.99449



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

*“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE, EM MODELO EXPERIMENTAL, DO  
LAPACHOL E DO L-FUCOSÍDEO PERACETILADO DO LAPACHOL (F-LapA) ENCAPSULADOS EM  
NANOEMULSÕES O/A”*

**SUED EUSTÁQUIO MENDES MIRANDA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares  
Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Dr. Tiago Hilário Ferreira  
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN

Profa. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira  
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Prof. Dr. Eduardo Burgarelli Lages  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. André Luís Branco de Barros - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Ricardo José Alves - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 28 de abril de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Anna Eliza Maciel De Faria Mota Oliveira**, Usuário





**Externo**, em 28/04/2023, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Burgarelli Lages, Usuário Externo**, em 28/04/2023, às 18:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Branco de Barros, Professor do Magistério Superior**, em 28/04/2023, às 20:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cristian Ferreira Soares, Usuário Externo**, em 02/05/2023, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Antonio Miranda Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 09:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Hilário Ferreira, Usuário Externo**, em 09/05/2023, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2258458** e o código CRC **8AE838ED**.

## **Colaboradores**

Prof. Geovanni Dantas Cassali – Laboratório de Patologia Comparada – Departamento de Patologia – Instituto de Ciências Biológicas – UFMG;

Pós-doutorando Flaviano Melo Ottoni – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Faculdade de Farmácia – UFMG;

Pós-doutoranda Juliana de Oliveira Silva - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN);

Pós-doutoranda Renata Salgado Fernandes – Centro de Tecnologia de Vacinas – UFMG;

Doutoranda Caroline Dohanik da Silva - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Faculdade de Farmácia – UFMG

Doutoranda Janaína de Alcântara Lemos - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Faculdade de Farmácia – UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro a Deus por me dar forças para vencer mais esta batalha, muito obrigado por tudo o que me proporcionou nesta jornada.

Agradeço à minha família por todo o auxílio fornecido durante este momento. À minha mãe e meu pai que estão no céu me olhando, cuidando, e aproveitando esse momento. Essa vitória eu dedico a vocês que sempre me apoiaram e se esforçaram para que seu filho chegasse neste local.

Ao meu orientador, Professor André Luís por toda orientação, auxílio, e companheirismo, este trabalho é em grande parte seu por todo o apoio e dedicação comigo. Você foi, é e sempre será um exemplo de profissional e pessoa, um verdadeiro exemplo de sucesso a seguir.

Aos meus coorientadores, Professor Lucas Ferreira e Ricardo José, pela confiança em meu trabalho, atenção, disponibilidade, contribuições e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Obrigado aos professores do laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela recepção, e disponibilidade sempre que necessitei. Obrigado aos colegas do LTF (não irei citar nomes para não esquecer ninguém), muito agradecido pelas conversas, momentos de acolhimento e trocas de conhecimento. Aos TAE's Nazaré e Ernane pelo apoio e auxílio para a realização do trabalho.

Um obrigado especial ao grupo do boteco Anna Eliza, Diego, Fernanda, Nara, Fernanda, Juliana, Paula, Renata, Shirleide e Tiago. Obrigado ao Vanderli, pela atenção, disponibilidade, auxílio em todos os experimentos, preparo de materiais e

lanches. Obrigado ao Batista e Adelaide do biotério da Faculdade de Farmácia pelo auxílio com os experimentos em animais.

Obrigado especial a Tâmara, amiga para a vida toda que sempre me apoiou, se divertiu e sofreu comigo em toda essa jornada, a Talita, amiga da biomedicina para sempre. Obrigado por ouvirem minhas reclamações, dramas, ciúmes, chatices (sei que são muitas) pelo apoio, que de fato tornaram essa caminhada muito mais leve.

A Janaína que se tornou mais que uma amiga, me auxiliou em todos os momentos, nos experimentos, nos bate-papos, nas gordices, nas alegrias e nos sofrimentos. Nem tenho palavras para agradecer o quanto você representa para mim.

Agradeço a todos meus tios e primos por todo apoio neste caminho, principalmente aos primos diretoria pela grande amizade, encontros, reuniões, lanches e companheirismo, muito obrigado por tudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigado a todos que foram importantes e se tornaram parte desta longa jornada.

Se você só fizer o que sabe, não vai ser nada além do que já é.

(Mestre Shifu)

Você nunca sabe o quanto é forte até que ser forte é a única

escolha que tem. (Bob Marley)

## RESUMO

O câncer de mama é o câncer de maior incidência entre as mulheres, sendo responsável por cerca de 30% de novos casos no Brasil. Devido a sua grande incidência e letalidade, a busca por novas moléculas para um tratamento eficiente se torna cada vez mais importante. Nesse contexto, o lapachol apresenta atividade antitumoral já relatada, porém limitada devido a problemas de baixa solubilidade e efeitos adversos. Dentre as alternativas para superar esses desafios, podemos citar a busca por análogos sintéticos do lapachol e o emprego de nanossistemas que possam viabilizar sua administração. Assim, esse trabalho teve como objetivo realizar a avaliação da atividade antitumoral do lapachol e seu derivado L-fucosídico encapsulados em nanoemulsões em modelo animal de câncer de mama. As nanoemulsões foram preparadas utilizando óleo de soja (4,0%), polissorbato 80 (1,4%), glicerol (2,24%) e água (qsp 100%) contendo o lapachol ou seu derivado. As formulações foram caracterizadas físico-quimicamente e morfologicamente, realizados ainda estudos *in vitro* de liberação, hemólise, viabilidade celular e estudos *in vivo*. Para o derivado L-fucosídico, também foi realizado a validação analítica para doseamento utilizando as normas da RDC 166/2017. As nanoemulsões de lapachol apresentaram tamanho 170 nm, índice de polidispersão menor que 0,3, potencial zeta em torno de -20mV, alto teor de encapsulação com estabilidade físico-química de pelo menos 30 dias. A formulação apresentou morfologia esférica, estabilidade coloidal em meios biológicos por até 24 horas, atividade citotóxica contra células tumorais de câncer de mama, sem atividade hemolítica importante. A radiomarcagem da nanoemulsão apresentou pureza superior a 95%, com aumento no tempo de meia vida, alta captação na região tumoral e atividade antitumoral em modelo experimental sem sinais de toxicidade. A validação analítica apresentou linearidade entre 2 e 500 µg com R<sup>2</sup> superior a 0,99, precisão com desvio padrão relativo inferior a 5%, limite de detecção de 0,72 µg e quantificação de 2,41 µg com robustez avaliada por alteração dos fornecedores de solventes e equipamentos. A nanoemulsão contendo o derivado L-fucosídico apresentou tamanho de 180 e 190 nm, avaliado por análise por rastreamento de partículas e espalhamento dinâmico da luz, respectivamente, índice de polidispersão menor que 0,2, potencial zeta em cerca de -20 mV e encapsulação próxima de 100% quando a concentração do derivado foi de 1,5 e 2,0 mg/mL. A estabilidade físico-química da nanoemulsão também foi avaliada por

microscopia de luz polarizada (presença de cristais), foi até 6 e 3 meses, respectivamente. Obtivemos também uma formulação estável em meios biológicos, capaz de proteger o derivado de degradação, com diminuição da concentração inibitória média em aproximadamente três vezes em linhagens de câncer de mama e seletividade de quatro vezes comparada a linhagem saudável, ainda tivemos aumento de cinco vezes na captação do derivado L-fucosídico encapsulado em comparação com derivado livre. Foi evidenciado nos estudos com camundongos saudáveis baixa toxicidade, enquanto em animais portadores de tumor de mama induzido houve eficácia antitumoral melhorada. Em conjunto, os resultados demonstraram que as nanoemulsões carregadas com lapachol ou derivado apresentaram potencial como plataforma de tratamento mais seletivo para o câncer de mama com redução de efeitos adversos.

Palavras-chave: naftoquinona; câncer de mama; emulsões; toxicidade.

## ABSTRACT

Breast cancer is the cancer with the highest incidence among women, accounting for about 30% of new cases in Brazil. Due to its high incidence and lethality, the search for new molecules for an efficient treatment becomes increasingly important. In this context, LAP presents antitumor activity already reported, but limited due to problems of low solubility and adverse effects. Among the alternatives to overcome these challenges, we can mention the search for synthetic analogues of lapachol and the use of nanosystems that can enable its administration. Thus, this work aimed to evaluate the antitumor activity of lapachol and its fucoside derivative encapsulated in nanoemulsions in an animal model of breast cancer. Nanoemulsions were prepared using soybean oil (4.0%), polysorbate 80 (1.4%), glycerol (2.24%) and water (qsp 100%) containing lapachol or its derivative. The formulations were characterized physicochemically and morphologically, and *in vitro* release, hemolysis, cell viability and *in vivo* studies were performed. For the fucoside derivative, analytical validation for dosing was also performed using the standards of RDC 166/2017. The LAP nanoemulsions showed 170 nm size, polydispersity index less than 0.3, zeta potential around -20mV, high encapsulation content with physicochemical stability of at least 30 days. The formulation showed spherical morphology, colloidal stability in biological media for up to 24 hours, cytotoxic activity against breast cancer tumor cells, without significant hemolytic activity. The nanoemulsion radiolabeling showed purity higher than 95%, with increased half-life, high uptake in the tumor region and antitumor activity in an experimental model without signs of toxicity. The analytical validation showed linearity between 2 and 500  $\mu\text{g}$  with  $R^2$  greater than 0.99, precision with relative standard deviation less than 5%, detection limit of 0.72  $\mu\text{g}$  and quantification of 2.41  $\mu\text{g}$  with robustness evaluated by changing the suppliers of solvents and equipment. The nanoemulsion containing the fucoside derivative showed size of 180 and 190 nm, evaluated by particle tracking and dynamic light scattering analysis, respectively, polydispersity index less than 0.2, zeta potential at about -20 mV and encapsulation close to 100% when the derivative concentration was 1.5 and 2.0 mg/mL. The physicochemical stability of the nanoemulsion was also evaluated by polarized light microscopy (presence of crystals), was up to 6 and 3 months, respectively. We also obtained a stable formulation in biological media, capable of protecting the derivative from degradation, with approximately three-fold decrease in



the mean inhibitory concentration in breast cancer strains and four-fold selectivity compared to healthy strains, and a five-fold increase in the uptake of the encapsulated fucoside derivative compared to the free derivative. Low toxicity was evidenced in the healthy mice studies, while in animal with induced breast tumor there was enhanced antitumor efficacy. Taken together, the results demonstrated that nanoemulsions loaded with lapachol or derivative showed great potential as a more selective treatment platform for breast cancer with reduced adverse effects.

Keywords: naphthoquinone; breast cancer; emulsions; toxicity.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do LAP.....	26
Figura 2 – Estrutura química do derivado L-fucosídico do LAP.....	29
Figura 3 – Diferenças entre tumor benigno e maligno.....	30
Figura 4 – Seis fatores da carcinogênese .....	31
Figura 5 – Esquema representativo de alguns sistemas de entrega de fármacos ....	34
Figura 6 – Ilustração do Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada, direcionamento ativo e passivo. ....	36
Figura 7 – Esquema representativo de emulsões. a) emulsão A/O; b) emulsão O/A; c) emulsão múltipla O/A/O; d) emulsão múltipla (A/O/A).....	37
Figura 8 – Esquema representativo do preparo das NE à quente com calibração por ultrassom.....	45
Figura 9 – Criomicroscopia eletrônica de transmissão de NE-LAP. Escala em 100 nanômetros. ....	56
Figura 10 – Gráficos de estabilidade físico-química por até 30 dias de NE-LAP 0,5 mg/mL armazenadas a 4°C. A) Tamanho médio (nm); B) Índice de Polidispersão (PDI); C) Potencial Zeta e D) Teor de Encapsulação (%). ....	57
Figura 11 – Gráficos de estabilidade coloidal de NE-LAP em diversos meios biológicos diluídos quatro vezes. A) NE-LAP 0,5 mg/mL; NE-LAP 0,5 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%); NE-LAP 0,5 mg/mL em solução fosfato tamponada (PBS pH 7,4). B) NE-LAP 0,5 mg/mL em Soro Fetal Bovino (SFB); NE-LAP 0,5 mg/mL em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-LAP 0,5 mg/mL em plasma murino. ....	58
Figura 12 – Gráfico de estudo de hemólise in vitro da nanoemulsão NE-LAP 0,5 mg/mL em diversas concentrações avaliadas. Dados expressos como média ± desvio (n=5). ....	60
Figura 13 – Curva de depuração sanguínea após administração intravenosa do complexo <sup>99m</sup> Tc-NE-LAP em animais BALB/c sadios. Dados expressos como porcentagem da média ± desvio padrão da média (n=7).....	61
Figura 14 – Biodistribuição do <sup>99m</sup> Tc-NE-LAP após administração intravenosa em animais portadores de tumor de mama murino 4T1 (n=7) ( <i>Insert</i> : captação em tumor e músculo 1, 4, 8 e 24 horas após administração intravenosa). Dados expressos como	

média da dose injetada de <sup>99m</sup> Tc-NE-LAP por grama de tecido ± desvio padrão. (* p<0,05).....	63
Figura 15 – Relação alvo/não alvo em análises de dose injetada por grama de tecido obtido de ensaio de biodistribuição em animais com tumor de mama (* indica diferença estatística entre os tempos testados).....	65
Figura 16 – Gráfico de atividade antitumoral no crescimento de camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1. Cada tratamento foi realizado por via intravenosa administrado cinco vezes, de dois em dois dias, a uma dose de 5 mg/kg/dia. Os dados são expressos pela média ± desvio padrão da média. As curvas de crescimento foram analisadas por ANOVA unidireccional, seguida do teste de Tukey. * Representa a diferença estatística (P < 0,05) entre os tratamentos LAP e NE-LAP. *** Representa a diferença estatística (P < 0,001) entre os tratamentos NE-LAP e do grupo controle.	66
Figura 17 – Variação do peso corporal de camundongos portadores de tumor 4T1 após administração intravenosa de PBS-Tween 80 2% (grupo de controle); solução tamponada de LAP, e NE-LAP.....	68
Figura 18 – Secções histológicas de fígado e rim de camundongos BALB/C fêmeas portadores de tumor mamário tratados com PBS + 2 %Tween (controle), LAP e NE-LAP obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle, fígado; B) LAP, fígado; C) NE-LAP, fígado; D) controle, rim; E) LAP, rim e F) NE-LAP, rim. Amplificação de 40x.....	69
Figura 19 – Estrutura química do derivado L-fucosídico peracetilado do LAP (F-LapA) .....	84
Figura 20 – Esquema representativo do preparo das NE à quente com calibração por ultrassom .....	88
Figura 21 – Gráfico de dispersão de tamanho das NE pela técnica de NTA .....	101
Figura 22 – Gráfico de estabilidade físico-químicas das NE NE-F-LapA em diversas concentrações por até 180 dias, armazenadas a 4°C A) Tamanho médio (nm); B) Índice de Polidispersão (Pdl); C) Potencial Zeta e D) Teor de Encapsulação (%). .	102
Figura 23 - Microscopia de luz polarizada mostrando presença ou ausência de cristais em amostras de NE-F-LapA após 4 meses de armazenamento. A) NE-F-LapA 1,0 mg/mL; B) NE-F-LapA 1,5 mg/mL.....	103
Figura 24 – Gráfico de estabilidade coloidal de NE-F-LapA em diversos meios biológicos diluídos quatro vezes. A) Avaliação de tamanho de NE-F-LAP 0,5 mg/mL; NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em	

solução fosfato tamponada (PBS pH 7,4). B) Avaliação de tamanho de NE-F-LAP 0,5 mg/mL em Soro Fetal Bovino (SFB); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em plasma murino. C) Avaliação do Índice de polidispersão (Pdl) de NE-F-LAP 0,5 mg/mL; NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução fosfato tamponada (PBS pH 7,4). D) Avaliação do Índice de polidispersão (Pdl) de NE-F-LAP 0,5 mg/mL em Soro Fetal Bovino (SFB); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em plasma murino. .....	104
Figura 25 – Figura apresentando os cromatogramas indicando degradação do derivado em contato com meio diluente. (A )cromatograma do derivado puro; (B) cromatograma do derivado livre em meio diluente (diluição 10x) após 24 horas; (C) cromatograma do derivado encapsulado em meio diluente (diluição 10x) após 24 horas.....	106
Figura 26 – Gráfico de degradação do derivado L-fucosídico livre e encapsulado em NE. A Gráfico representando a degradação em meio diluente; B Gráfico representando a degradação em meio de cultura.....	107
Figura 27 – Gráfico de captação celular do derivado L-fucosídico livre e encapsulado em NE em células da linhagem 4T1.....	110
Figura 28 – Gráfico da variação do peso corporal em camundongos saudios após administração intravenosa de PBS-Tween 80 + 1% + 10% de PEG400 (grupo controle); solução tamponada de F-LapA e NE-LAP (5, 10 e 20 mg/Kg de F-LapA). .....	111
Figura 29 – Gráfico de atividade antitumoral no crescimento de camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1. Cada tratamento foi realizado por via intravenosa administrado cinco vezes, de dois em dois dias, a uma dose de 10 mg/kg/dia. Os dados são expressos pela média ± desvio padrão da média. As curvas de crescimento foram analisadas por ANOVA unidireccional, seguida do teste de Tukey. a - Representa a diferença estatística (P < 0,05) entre os tratamentos e Grupo controle. b - Representa a diferença estatística (P < 0,05) em comparação com os grupos LAP e F-LapA.....	116
Figura 30 – Variação do peso corporal de ratos portadores de tumor 4T1 após administração intravenosa de Salina, Diluente (PBS; 1% de Tween 80 e 10% de PEG 400); solução tamponada de LAP, Solução tamponada de F-LapA e NE-F-LapA.	

Insert: Alteração de peso corporal dos camundongos comparando o último dia com o primeiro dia do tratamento.....	118
Figura 31 – Secções histológicas de tumor de camundongos BALB/C femininos portadores de tumor mamário tratados com Salina (controle), LAP, F-LapA e NE-F-LapA obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle; B) LAP; C) F-LapA; D) NE-F-LapA. Amplificação de 40x.....	120
Figura 32 – Secções histológicas de pulmão de camundongos BALB/C femininos portadores de tumor mamário tratados com Salina (controle), LAP, F-LapA e NE-F-LapA obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle; B) LAP; C) F-LapA; D) NE-F-LapA. Amplificação de 2x. Asteriscos indicam presença de metástases. .	122
Figura 33 – Gráfico contendo o número de metástases contadas para cada grupo. (* Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ); *** Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p<0,001$ ). .....	123
Figura 34 – Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/C femininos portadores de tumor mamário tratados com Salina (controle), LAP, F-LapA e NE-F-LapA obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle; B) LAP; C) F-LapA; D) NE-F-LapA. Amplificação de 20x. Cabeças de seta indicam presença de metástases.....	124

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das NE contendo LAP (0,5 mg/mL) .....	45
Tabela 2 – Caracterização físico-química das NE contendo LAP (0,5 mg/mL) .....	55
Tabela 3 – Concentração Inibitória média (CI <sub>50</sub> ) para LAP e NE-LAP contra células tumorais 4T1 e MDA-MB-231. ....	59
Tabela 4 – Volume Tumoral Relativo (VTR) e Inibição do Crescimento (IC) após administração de LAP e NE-LAP. ....	67
Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de camundongos portadores de tumor de mama murino 4T1 após administração intravenosa de PBS + 2% de Tween 80 (controle), solução tamponada de LAP e NE-LAP. ....	68
Tabela 6 – Tabela contendo os parâmetros de linearidade avaliados para validação analítica. ....	78
Tabela 7 – Tabela contendo os dados de área obtidos em análises de reprodutibilidade e precisão. ....	79
Tabela 8 – Tabela contendo os dados de Limite de detecção e quantificação obtidos por validação analítica. ....	79
Tabela 9 – Tabela contendo os dados encontrados de robustez para análise de validação analítica. ....	80
Tabela 10 – Composição das NE de F-LapA (1/1,5 gm/mL).....	87
Tabela 11 – Tamanho de partícula, concentração, Pdl, potencial zeta e Eficiência de Encapsulação (EE) de NE- branco e NE-F-LapA em duas concentrações diferentes de F-LapA (1,0 e 1,5 mg/mL). ....	98
Tabela 12 – Parâmetros físico-químicos obtidos por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	100
Tabela 13 – Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) de F-LapA livre e encapsulado em NE contra diversas linhagens celulares. ....	108
Tabela 14 – Parâmetros hematológicos de camundongos saudáveis após administração intravenosa de PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (controle); F-LapA e NE-F-LapA em diversas concentrações.....	113
Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos de camundongos saudáveis após administração intravenosa de PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (controle); F-LapA e NE-F-LapA em diversas concentrações. ....	115

Tabela 16 – Volume Tumoral Relativo (VTR) e Inibição do Crescimento (IC) após administração de Salina (controle), PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (diluyente); LAP; F-LapA e NE-F-LapA.....	117
Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos de camundongos portadores de tumor de mama 4T1 após administração intravenosa de salina (controle); PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (diluyente); F-LapA e NE-F-LapA em diversas concentrações.....	119

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® - Marca registrada

μ – Micro

°C - Graus Celsius

%ID/g - Percentual de dose injetada por grama

<sup>99m</sup>Tc -Tecnécio-99m

<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> -Tecnécio Livre

<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> -Tecnécio Hidrolisado

<sup>99m</sup>Tc-NE-LAP - Nanoemulsão contendo lapachol radiomarcada com tecnécio-99-  
metaestável

A/O - Nanoemulsão água em óleo

A/O/A - Nanoemulsão múltipla água em óleo em água

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - Aspartato aminotransferase

CCNSC - *Cancer Chemotherapy National Service Center*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



DLS - *Dynamic Light Scattering*/Espalhamento Dinâmico de Luz

DM - Diâmetro Médio

DMEN - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EE - Eficiência de encapsulação

EPR - *Enhanced Permeability and Retention*/Efeito de permeabilidade e retenção aumentada

eV - Elétrons-volt

FA - Fase aquosa

F-LapA – Derivado L-fucosídico do lapachol peracetilado

FO - Fase oleosa

PdI – *Polydispersity Index*/Índice de polidispersão

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LAP – Lapachol

mV - milivolts

MeOH – Metanol

NE – Nanoemulsão

nm – Nanômetros

O/A - Nanoemulsão óleo em água

O/A/O - Nanoemulsão múltipla óleo em água em óleo

OMS - Organização Mundial da Saúde

NE – Nanoemulsão

NE-F-LapA – Nanoemulsão contendo o derivado L-fucosídico do lapachol peracetilado

NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*/Análise por rastreamento de partículas

PBS – *Phosphate buffered saline*/Tampão fosfato salina

R - Coeficiente de Correlação

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

RPM - Rotações Por Minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

sd - *Standard deviation*/Desvio padrão

SFB - Soro Fetal Bovino

SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - Cloreto Estanoso Dihidratado

Tp – tempo de protrombina

TTPA – tempo de tromboplastina parcialmente ativado

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

USP - *United States Pharmacopeia*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>26</b>
2.1	<i>Lapachol .....</i>	26
2.2	<i>Derivados glicosídicos do LAP.....</i>	28
2.3	<i>Câncer.....</i>	29
2.4	<i>Tumor de mama .....</i>	31
2.5	<i>Tratamento do câncer.....</i>	32
2.6	<i>Modelos de entrega de fármacos .....</i>	33
2.7	<i>Nanoemulsões.....</i>	36
2.8	<i>Toxicidade .....</i>	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
3.1	<i>Objetivo geral .....</i>	39
3.2	<i>Objetivos específicos .....</i>	39
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>40</b>
4.1	<i>Introdução.....</i>	41
4.2	<i>Objetivo geral .....</i>	43
4.2.1	<i>Objetivos específicos.....</i>	43
4.3	<i>Materiais e métodos .....</i>	44
4.3.1	<i>Materiais .....</i>	44
4.3.2	<i>Métodos .....</i>	45

4.3.2.13 Avaliação bioquímica dos animais tratados .....	53
4.4 <i>Resultados e discussão</i> .....	55
4.4.1 Caracterização físico-química das NE .....	55
4.4.1 <i>Estabilidade físico-química</i> .....	57
4.4.2 <i>Estabilidade coloidal</i> .....	58
4.4.3 <i>Estudo de citotoxicidade</i> .....	58
4.4.4 <i>Estudo de hemólise</i> .....	59
4.4.5 <i>Radiomarcagem e Pureza radioquímica</i> .....	60
4.4.6 <i>Avaliação de depuração sanguínea</i> .....	61
4.4.7 <i>Avaliação da biodistribuição e da relação tumor-músculo</i> .....	62
4.4.8 <i>Estudo de atividade antitumoral</i> .....	65
4.4.9 <i>Investigação da toxicidade do tratamento antitumoral</i> .....	67
4.5 <i>Conclusão</i> .....	70
<b>5 CAPÍTULO 2</b> .....	<b>71</b>
5.1 <i>Introdução</i> .....	72
5.2 <i>Objetivo geral</i> .....	74
5.2.1 <i>Objetivos Específicos</i> .....	74
5.3 <i>Materiais e métodos</i> .....	75
5.3.1 <i>Materiais</i> .....	75
5.3.2 <i>Metodologia</i> .....	75
5.3.2.1 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	75
5.3.2.2 <i>Parâmetros de validação</i> .....	76

5.4 Resultados e discussão .....	78
5.4.1 Linearidade .....	78
5.4.2 Precisão .....	79
5.4.3 Limite de Detecção e Quantificação .....	79
5.4.4 Robustez .....	80
5.5 Conclusão.....	81
<b>6 CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>82</b>
6.1 Introdução.....	83
6.2 Objetivo geral .....	85
6.2.1 Objetivos específicos.....	85
6.3 Materiais e métodos .....	86
6.3.1 Materiais .....	86
6.3.2 Métodos .....	87
6.3.2.1 Preparo das NE.....	87
6.3.2.2 Caracterização das Formulações .....	88
6.3.2.3 Estabilidade físico-química .....	90
6.3.2.4 Microscopia de luz polarizada .....	90
6.3.3.5 Estabilidade coloidal.....	90
6.3.3.6 Ensaio de degradação do derivado encapsulado .....	90
6.3.3.7 Avaliação da viabilidade celular .....	91
6.3.3.8 Captação celular.....	92
6.3.3.9 Estudos de toxicidade aguda <i>in vivo</i> .....	93
6.3.3.10 Realização do modelo tumoral em camundongos.....	94
6.3.3.11 Atividade antitumoral .....	95
6.3.3.12 Avaliação bioquímica.....	95

6.3.3.13 Avaliação histopatológica.....	96
6.3.3.14 Análise estatística.....	97
6.4 Resultados e discussão .....	98
6.4.1 Caracterização .....	98
6.4.2 Estudo de estabilidade.....	101
6.4.3 Microscopia de Luz Polarizada.....	103
6.4.4. Estabilidade em meios biológicos.....	103
6.4.5 Degradação.....	105
6.4.6 Viabilidade celular.....	108
6.4.7 Captação .....	109
6.4.8 Toxicidade Aguda .....	110
6.4.9 Atividade Antitumoral.....	116
6.4.10 Avaliação histopatológica.....	120
6.4.10.1 Histologia tumoral.....	120
6.4.10.2 Avaliação histológica de pulmão e fígado.....	121
<b>6.5 Conclusão .....</b>	<b>125</b>
<b>7 Conclusão geral.....</b>	<b>126</b>
<b>8 Perspectivas .....</b>	<b>128</b>
<b>Referências.....</b>	<b>129</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>151</b>
<b>Apêndice .....</b>	<b>153</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos globais sinalizam um número cada vez maior de pessoas acometidas por câncer. Segundo o Instituto Nacional do Câncer são estimados mais de 700 mil novos casos de cânceres no Brasil para o triênio de 2023-2025, sendo o câncer de mama o segundo mais frequente (BRASIL; INCA, 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

O Lapachol (LAP), uma quinona da classe das naftoquinonas. É isolada da casca e cerne da *Tabebuia avellanedae*, com atividades biológicas relatadas para diversas doenças, incluindo o câncer (BALASSIANO et al., 2005; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; HUSSAIN et al., 2007; RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968). Devido à sua baixa biodisponibilidade, seu potencial como agente antitumoral tem sido limitado. Na literatura, uma alternativa encontrada para contornar esse problema de baixa hidrofiliabilidade, é a síntese de análogos e/ou derivados com grupos químicos hidrofílicos e/ou lipofílicos que permitem atingir um balanço hidro/lipofílico mais favorável.

Outra possível solução é a utilização de nanossistemas, como as nanoemulsões (NE), que permitem viabilizar a administração de fármacos pouco solúveis, contribuindo para maior entrega de fármacos a sítios tumorais. NE são dispersões de dois líquidos imiscíveis em que o tamanho dos glóbulos está em escala nanométrica, com faixa de diâmetro compreendida entre 20-200 nm. A formulação possui certa estabilidade devido ao tamanho reduzido e a presença de tensoativos posicionados entre as duas fases da emulsão - água e óleo (DEKIĆ; PRIMORAC, 2017; JUNIOR et al., 2013; KOURNIATIS et al., 2010).

Apesar de já ter um histórico de utilização no tratamento do câncer, hoje poucos trabalhos avaliam a atividade antitumoral e/ou toxicidade do LAP em modelos animais, nenhum de forma endovenosa (GUERRA et al., [s.d.]; MORRISON et al., 1970b; SÁ; GUERRA, 2007). Encontramos apenas um trabalho que analisa a atividade antitumoral em células do LAP, porém sem apresentar estudos em animais ou indicando possíveis efeitos de toxicidade do tratamento (CHEN et al., 2020). Estudos anteriores de derivatização química mostram que alguns derivados apresentaram atividade antitumoral, sendo o mais promissor, o derivado glicosídico peracetilado em modelo de leucemia linfocítica P-388 (DA LINARDI; DE OLIVEIRA; SAMPAIO, 1975; EYONG et al., 2008; FIORITO et al., 2014)

Dado o potencial do Lapachol e o número reduzido de trabalhos disponíveis na literatura, no presente trabalho, objetivou-se preparar NE contendo LAP ou seu derivado L-fucosídico para avaliação da atividade antitumoral, em camundongos portadores de tumor de mama murino da linhagem 4T1, bem como investigar a toxicidade sistêmica aguda em camundongos saudáveis.

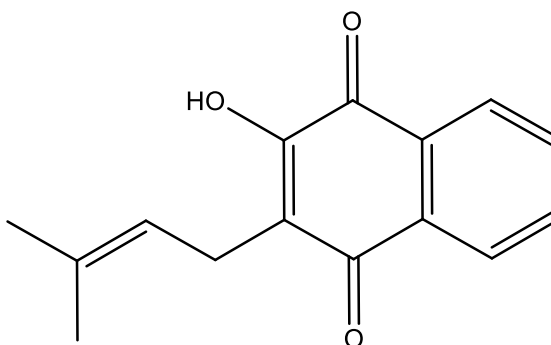


## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lapachol

O Lapachol (LAP), uma hidroxinaftoquinona substituída, 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (figura 1), foi primeiramente isolado por E. Paterno, em 1882, a partir da casca e cerne de árvores do gênero *Tabebuia avellanedae* (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; EPIFANO et al., 2014; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003).

Figura 1 – Estrutura química do LAP



Fonte: Adaptado de RAO, MCBRIDE; OLESON, 1968.

O LAP pode ser obtido por várias formas de extração, a partir de sua alta solubilidade em solventes orgânicos gerando soluções amarelas (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003). Já em água sua solubilidade é dependente da temperatura, sendo insolúvel em água fria e ligeiramente solúvel em água em ebulição, e do pH, apresentando solubilidade de 1,5 µg/mL em pH 4 e até 5 mg/mL em pH 10. Na presença de hidróxido de sódio forma um sal sódico que confere coloração vermelho brilhante, extremamente ativa como corante (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; LUI et al., 1985).

Muito utilizado desde o Império Inca, no século XIII, na forma de chá para o tratamento de diversas enfermidades, o LAP apresenta comprovada atividade antimicrobiana,

antifúngica, antiplasmódica, antitripanossômica, antiinflamatória, antiparasitária, leishmanicida, moluscicida, antimalárica, antiedêmico, pesticida, schistosomicida, analgésica, atividade antipsoríase, antimetastático e antitumoral (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; BALASSIANO et al., 2005; DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; HUSSAIN; GREEN, 2017; MAEDA et al., 2008; VENTURA PINTO; LISBOA DE CASTRO, 2009).

Na década de 70, destacou-se pela atividade antineoplásica com um índice terapêutico (IT) melhor quando comparado com outros fármacos antitumorais. Testes clínicos foram aprovados e realizados pela CCNSC (Cancer Chemotherapy National Service Center) em pacientes portadores de sarcoma de Yoshida e carcinoma de Walker 256, observando regressão definitiva das neoplasias em aproximadamente 30% dos pacientes. Porém, o tratamento gerou efeitos tóxicos indesejados como anemia, diminuição do tempo de protrombina, vômitos, náuseas, além da baixa biodisponibilidade que culminaram no término dos ensaios clínicos (HUSSAIN et al., 2007; RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968).

Estudos com lapachol contra células tumorais mostraram efeitos potentes na indução da morte celular (LUI et al., 1985; OTTONI et al., 2021; SUNASSEE et al., 2013). Ainda não se conhecem exatamente todos os mecanismos responsáveis pela atividade antitumoral, mas os mais aceites baseiam-se no seu envolvimento em processos oxidativos, reações de transferência de elétrons e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) (HUSSAIN; GREEN, 2017; RAMOS-PERALTA et al., 2015). As ERO's atuam na oxidação de lipídios, proteínas, bases nitrogenadas, quebras de fita de DNA, alquilação de proteínas e DNA, ativação de vias de sinalização, além da geração de adutos de DNA, depleção da glutatona redutase

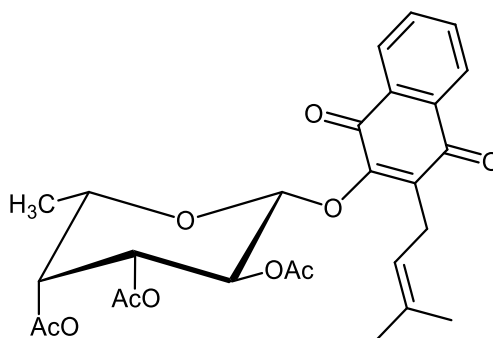
gerando glutathiona oxidada culminando em falha na desintoxicação celular (GOULART et al., 2003; SRINIVAS et al., 2019).

## 2.2 Derivados glicosídicos do LAP

Devido à baixa biodisponibilidade do LAP, para se obter efetividade no tratamento seria necessário o aumento da dose utilizada (HUSSAIN et al., 2007). Vários derivados do LAP já foram descritos, com várias atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral (COSTA, 2012; ESTEVES-SOUZA et al., 2008; OTTONI, 2014; PERES et al., 2017; SUNASSEE et al., 2013).

Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade do LAP, uma alternativa seria a síntese de derivados contendo grupos hidrofílicos e/ou lipofílicos com o propósito de melhorar sua farmacocinética (OTTONI, 2014). Por exemplo, Linardi em 1975 desenvolveu um derivado tetra-acetilado do  $\beta$ -glicosídeo do LAP com caráter lipofílico permitindo que o composto penetre facilmente pela membrana das células (DA LINARDI; DE OLIVEIRA; SAMPAIO, 1975). A glicosilação é amplamente utilizada para derivatização química, alterando vários fatores como a lipofilicidade e afinidade por transporte ativo, enquanto a peracetilação aumenta a permeabilidade à membrana (GRYNKIEWICZ; SZEJA; BORYSKI, 2008; OGAWA et al., 2003).

Análogos do  $\beta$ -glicosídeo tetra-acetilado do LAP foram sintetizados com grupos de carboidratos que modulem as características físico-químicas e grupos acetilas que fornecem propriedades lipofílicas. O derivado L-fucosídico (F-LapA), figura 2, objeto de estudo dessa tese, foi avaliado anteriormente para várias linhagens de tumores, apresentando resultados significantes frente a linhagem de tumor de mama MDA-MB-231 ( $CI_{50}=14,5 \pm 4,6 \mu M$ ) (MARQUES et al., 2020).

**Figura 2 – Estrutura química do derivado L-fucosídico do LAP**

Fonte: MARQUES et al., 2020.

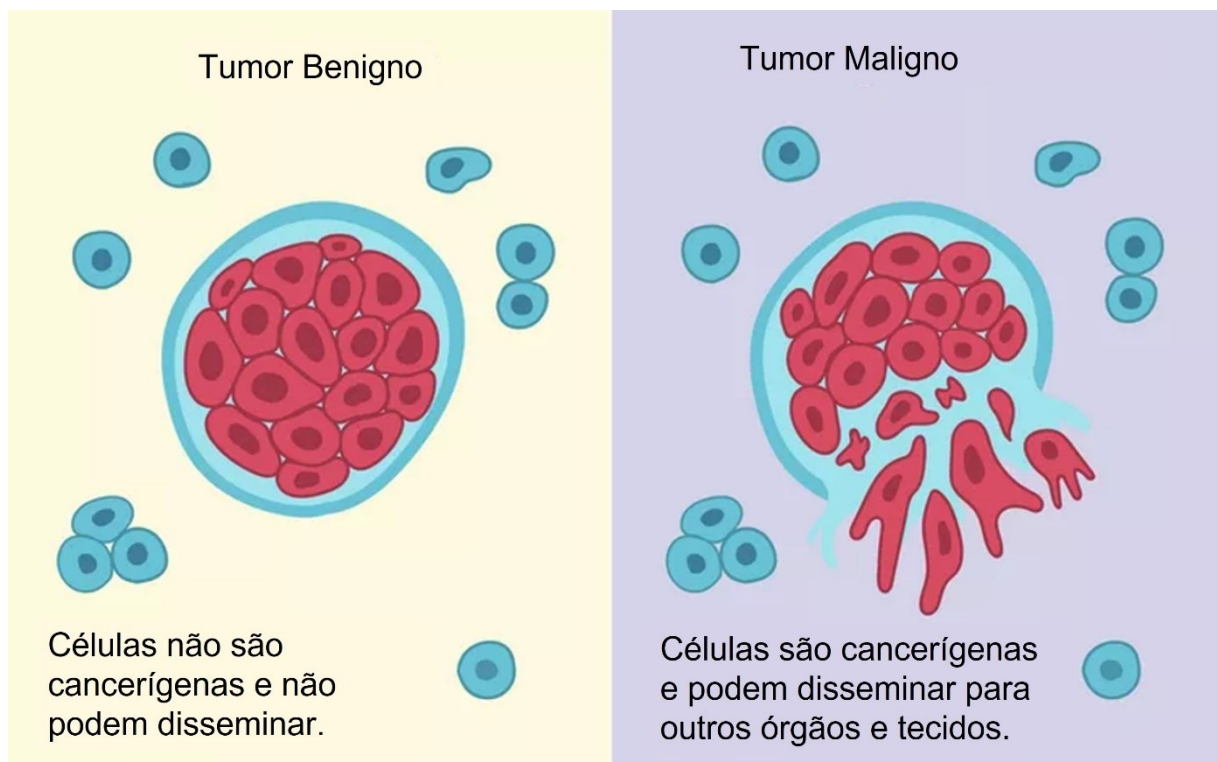
### 2.3 Câncer

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países e esse número pode aumentar ainda mais pela menor taxa de diagnósticos e interrupção do tratamento ocasionado pela pandemia de COVID-19 (BRASIL, 2012; BRASIL; INCA, 2022; SIEGEL et al., 2023). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se, para o triênio 2023-2025, a ocorrência de 704 mil novos casos de câncer por ano. Dentre esses, o câncer de pele não melanoma apresenta maior incidência (220 mil novos casos) seguido pelos cânceres de próstata em homens, e mama em mulheres, com aproximadamente 72 mil e 74 mil novos casos, respectivamente (BRASIL; INCA, 2022).

Neoplasias ou tumores, como são usualmente conhecidas, denominam o processo no qual a célula perde a capacidade de diferenciação, com proliferação acentuada, que pode ultrapassar os limites dos tecidos normais adjacentes. Os tumores são classificados em dois tipos principais, benignos ou malignos, devido suas características morfológicas, crescimento celular e comportamento biológico (BRASILEIRO-FILHO, 2006).

As neoplasias benignas apresentam crescimento lento, expansivo, bem delimitado, mantendo as características do tecido originário e com formação de uma pseudocápsula fibrosa ao redor do tecido tumoral. Enquanto isso, nas neoplasias malignas, o crescimento é rápido e desordenado, com delimitação imprecisa. Possui características diferentes do tecido de origem, são altamente invasivos, capazes de disseminar por meio de metástases (PATEL, 2020; SINHA, 2018). A figura 3 ilustra as principais diferenças entre os dois tipos de tumor.

**Figura 3 – Diferenças entre tumor benigno e maligno**

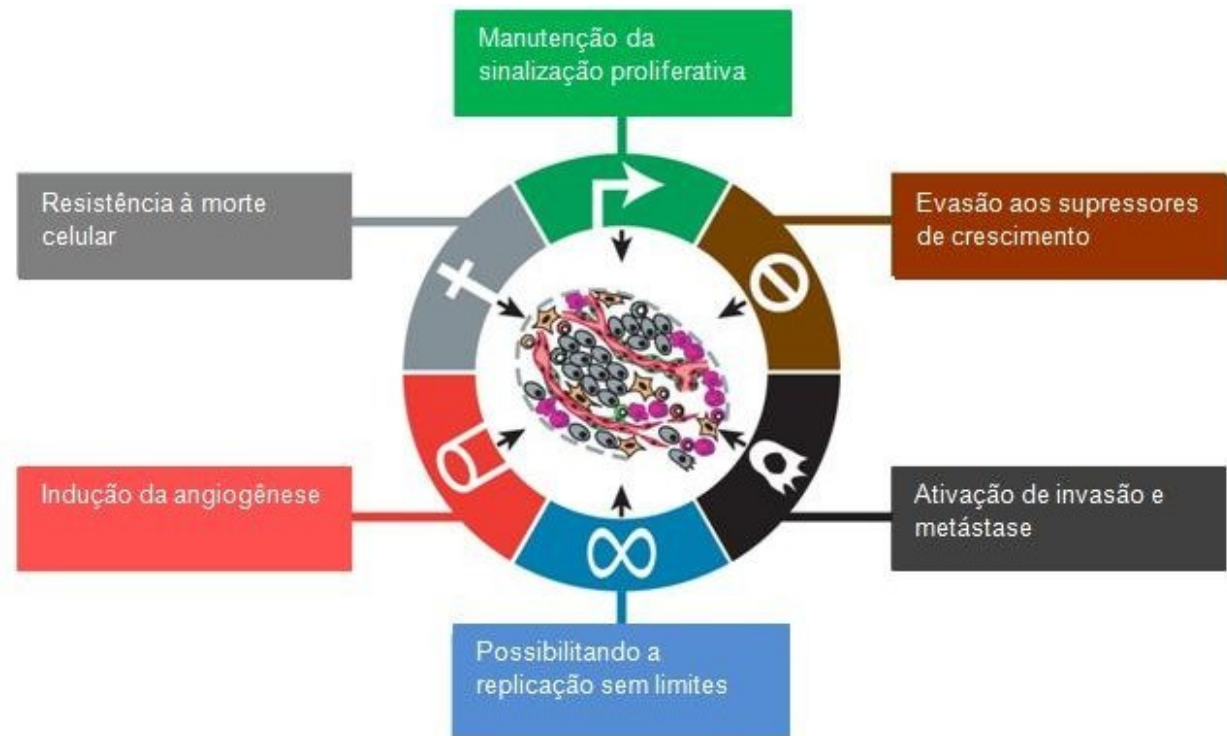


**Fonte:** Adaptado de Splane e Doru, 2022. (SPLANE; DORU, 2022)

A carcinogênese em humanos é desencadeada por diversos fatores interligados que irão fomentar a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Células normais evoluem progressivamente para o câncer adquirindo características únicas que permitem o crescimento do tumor como a disseminação metastática e resistência a morte. Essas

características, ilustradas na figura 4, demonstram o processo em que as células se tornam tumorigênicas e, posteriormente, malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 4 – Seis fatores da carcinogênese**



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

#### 2.4 Tumor de mama

Câncer de Mama é o tipo de câncer mais comum entre mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma, representando cerca de 30% dos novos casos a cada ano (FERLAY et al., 2020; SIEGEL et al., 2023). Ele é a neoplasia maligna mais comum em todo o mundo, além de ser a primeira em número de mortes (KATSURA et al., 2022).

O câncer de mama possui etiologia multifatorial com alguns fatores de risco bem elucidados incluindo fatores genéticos, endócrinos e reprodutivos. Além disso, fatores ambientais como o consumo de álcool, primeira gestação após os 30 anos, terapia de reposição hormonal, exposição às radiações X e  $\gamma$ , dietas calóricas e sedentarismo

também contribuem para o aparecimento do câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos de idade, sendo um fator preponderante no surgimento da doença (BARZAMAN et al., 2020; KATSURA et al., 2022; MANOUCHEHRI et al., 2022). Para escolha do tratamento, são utilizadas informações como a extensão do tumor, a disseminação para linfonodos e a presença ou ausência de metástases (HOWLADER et al., 2014; PLICHTA et al., 2020).

## 2.5 Tratamento do câncer

Existem quatro tipos principais de tratamento para o câncer, em especial para o câncer de mama: cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal, sendo normalmente utilizado mais de um tipo de tratamento (ALMEIDA et al., 2005; WINTERS et al., 2017). Os tratamentos locais (cirurgia e radioterapia) são, muitas das vezes, eficazes quando o tumor ainda não disseminou, sendo responsáveis pela cura de um terço dos pacientes (FURRUKH; QURESHI, 2018; WAKS; WINER, 2019). No entanto, aproximadamente 60-70% dos casos se desenvolvem para micrometástases, o que indica a necessidade de abordagem sistêmica (AL-MAHMOOD et al., 2018; MANOUCHEHRI et al., 2022).

A quimioterapia atua destruindo as células neoplásicas sendo amplamente utilizada no combate de tumores metastáticos e de leucemias (LIU; AUGUSTE, 2015; PLICHTA et al., 2020). Entretanto, atua de forma não-específica atingindo células malignas e normais, o que explica a maior parte dos efeitos adversos (DE JONG; BORM, 2008; HORNBERG et al., 2014). A terapia hormonal é indicada para os casos nos quais as células neoplásicas apresentam positividade para receptores hormonais (ALMEIDA et al., 2005; HOWLADER et al., 2014). No entanto, os tumores de mama mais agressivos e de pior prognóstico, em sua maioria, são negativos para esses tipos de receptores

indicando a necessidade de outras abordagens terapêuticas (CHAVEZ; GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2010; WINTERS et al., 2017).

Os fármacos quimioterápicos possuem como alvo as células neoplásicas, em especial, pela inibição de etapas específicas do processo de replicação do DNA (MELLOR; CALLAGHAN, 2008). A maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não seletiva, lesando células malignas e normais, principalmente as células de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e do sistema imunológico, gerando a maior parte dos efeitos adversos (ALMEIDA et al., 2005; HALEY; FRENKEL, 2008).

A principal dificuldade na utilização de fármacos quimioterápicos consiste na incapacidade de identificar produtos capazes de matar as células neoplásicas em concentração que não cause danos significativo ao paciente (HORNBERG et al., 2014). Os quimioterápicos que agem em células saudáveis podem causar toxicidade, e, em alguns casos, antagonizar os efeitos biológicos. Além da baixa seletividade podem ocorrer ainda baixa especificidade, alta toxicidade e desenvolvimento de resistência ao tratamento pelas células tumorais (KAELIN, 2005; WONG et al., 2007). Na busca por minimizar os efeitos dos quimioterápicos fora das células alvos, diversos modelos de sistemas nanoestruturados para entrega de fármacos tem sido desenvolvido e estudos têm sido conduzido na tentativa de tornar a terapia antitumoral mais seletiva (AHMED; REHMAN; TABISH, 2022).

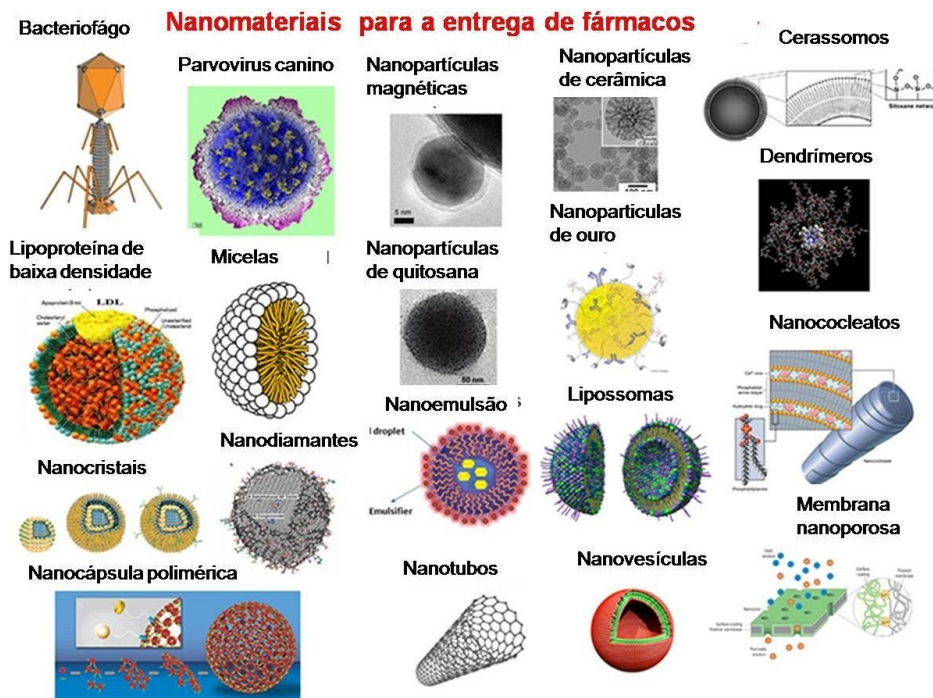
## 2.6 Modelos de entrega de fármacos

A entrega de moléculas bioativas é uma área em constante evolução englobando vários desafios como tecidos inacessíveis ou diferentes perfis de liberação (DETSI et al., 2020; GODSEY; SURYAPRAKASH; LEONG, 2013; HARSHITA et al., 2020;



PRASAD et al., 2018). Nesse contexto, vários nanocarreadores têm sido estudados para a entrega de moléculas bioativas a tumores (Figura 5) (FRANCO et al., 2017). O grande número de produtos aprovados e em fase pré-clínica torna a entrega de agentes terapêuticos um dos ramos com maior desenvolvimento na área de nanotecnologia, com um crescimento exponencial desde o início dos anos 2000 (BLAKNEY; IP; GEALL, 2021; CORBETT et al., 2020; FRAGUAS-SÁNCHEZ; LOZZA; TORRES-SUÁREZ, 2022; JAHANGIRIAN et al., 2017; VENTOLA, 2017).

**Figura 5 – Esquema representativo de alguns sistemas de entrega de fármacos**



Fonte: adaptado de Franco et al., 2017

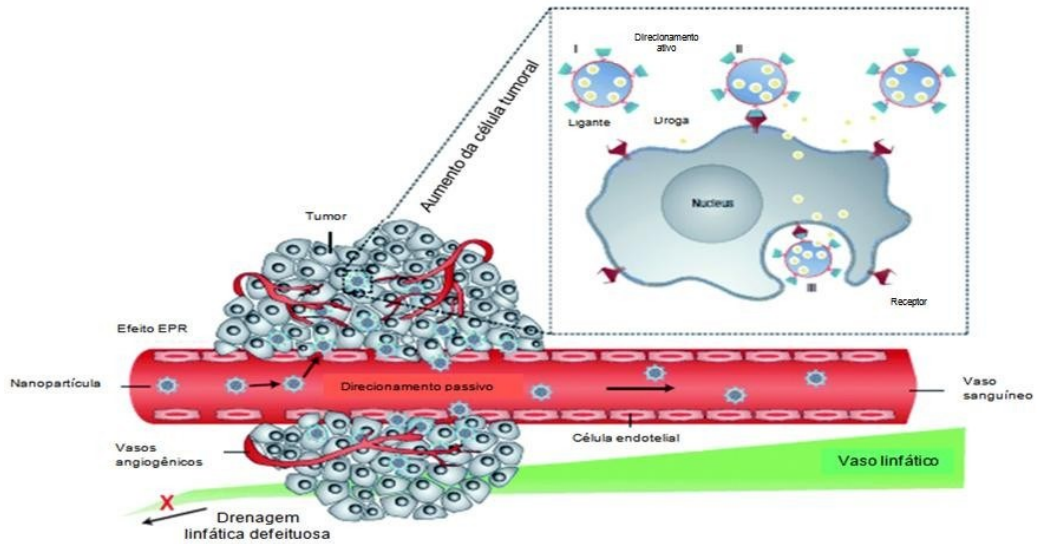
Com o objetivo de diagnosticar, tratar e/ou monitorar processos físicos e patológicos, estruturas de tamanho nanométrico apresentam grande potencial biológico para a encapsulação de substâncias pouco hidrossolúveis (DETSI et al., 2020; HARSHITA et al., 2020). Podendo ainda conferir características atrativas, como a proteção de moléculas bioativas contra ação enzimática, modificação da farmacocinética, diminuição de resistência a fármacos e o direcionamento para locais de interesse

(BAO; MITRAGOTRI; TONG, 2013a; BERTRAND et al., 2014; KOPECKOVA et al., 2019).

As células tumorais possuem um crescimento rápido e promovem o recrutamento de novos vasos (neovascularização) (BERTRAND et al., 2014). O desequilíbrio dos fatores angiogênicos faz com que os vasos sejam altamente desorganizados e dilatados, com fenestrações variando de 200 a 2000 nm, dependendo do tipo do tumor, da localização e do seu ambiente (CHO et al., 2008; HALEY; FRENKEL, 2008; SHUBIK, 1982; YING; CHEN; LU, 2015).

Além da alta permeabilidade, a função linfática dos tumores é comprometida, resultando em uma drenagem mínima do fluido intersticial (BERTRAND et al., 2014; RAEMDONCK et al., 2014). Este conceito de Efeito de Permeação e Retenção aumentada (EPR) (figura 6) foi introduzido em 1986 por Jain e Maeda em estudos independentes, que justificaram os benefícios alcançados com o uso de nanopartículas na terapêutica do câncer (MATSUMURA; MAEDA, 1986; STYLIANOPOULOS; JAIN, 2015).

**Figura 6 – Ilustração do Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada, direcionamento ativo e passivo.**



Fonte: Adaptado de RAEMDONCK et al., 2014.

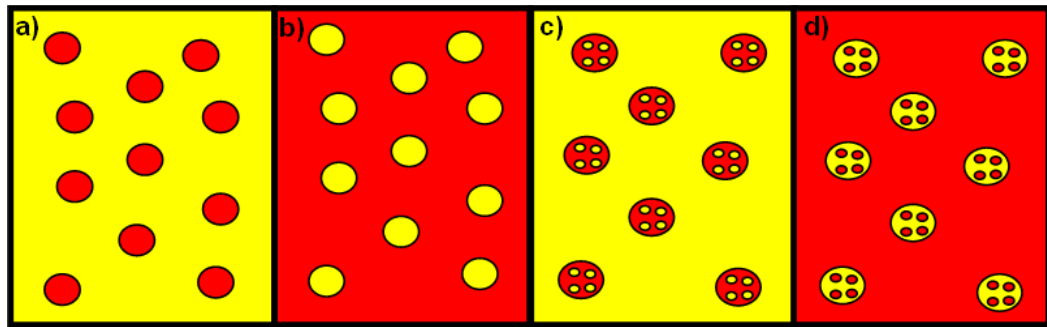
## 2.7 Nanoemulsões

As NE são sistemas termodinamicamente instáveis de dois líquidos não miscíveis, tipicamente água e óleo (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Normalmente, as emulsões contêm surfactantes responsáveis por formar um filme monomolecular na interface água/óleo. As NE possuem gotículas esféricas na faixa de 20-200 nm, sendo também encontrado na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas e emulsões submicrométricas (DEKIĆ; PRIMORAC, 2017; KUMAR et al., 2019).

O óleo e a fase aquosa geram uma emulsão grosseira, podendo se transformar em escala nanométrica de forma espontânea ou aplicando alta energia (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). Baseado em seus componentes, elas podem ser classificadas em óleo em água (O/A), onde as gotículas de óleo estão dispersas em água, água em óleo (A/O), onde as gotículas de água estão dispersas em fase oleosa e emulsão

múltipla, onde se encontra gotículas dispersas em gotas maiores no sistema (figura 7).

**Figura 7 – Esquema representativo de emulsões. a) emulsão A/O; b) emulsão O/A; c) emulsão múltipla O/A/O; d) emulsão múltipla (A/O/A)**



Fonte: próprio autor.

NE são de grande interesse devido sua gama de aplicações na indústria farmacêutica, alimentar, cosmética e química (SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). As NE apresentam características relevantes para o uso por via parenteral, incluindo capacidade de solubilizar grandes quantidades de moléculas hidrofóbicas, utilização de quantidades mínimas de solvente orgânico na preparação, capacidade de proteger os fármacos de hidrólise e degradação enzimática (BRUSCHI, 2015; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). Desta forma, sistemas nanoemulsionados constituem estratégias importantes para modificar o fornecimento de fármacos, com entrega segura e eficaz de agentes de baixa biodisponibilidade (BRUSCHI, 2015; RAI et al., 2018).

## 2.8 Toxicidade

Os estudos de toxicidade são uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de novos fármacos, pois nos ensaios pré-clínicos é possível obter indícios de efeitos adversos e riscos do novo fármaco (HORNBERG et al., 2014). Os estudos de toxicidade devem estar de acordo com protocolos de boas práticas de laboratório e

normas de agências regulamentadoras de testes de medicamentos em humanos e animais (EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA), 2008; MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009).

O estudo de toxicidade tem como objetivo investigar a segurança e tolerabilidade da molécula, sendo a principal causa do insucesso na busca por novos fármacos. Sutter e colaboradores classificaram a fase de estudos de toxicidade como o principal fator de insucessos da fase pré-clínica (SUTER; BABISS; WHEELDON, 2004).

A avaliação de toxicidade não pode ser realizada diretamente em humanos, para isso são utilizadas outras espécies, a escolha depende principalmente das vantagens/desvantagens de cada espécie e semelhança entre a espécie e os humanos, em termos de morfologia, fisiologia e bioquímica (MORTON, 1998). As espécies mais utilizadas são: roedores (ratos/camundongos), cães (raça beagle), macacos, porcos e coelhos. Para testes de substâncias cancerígenas, toxinas reprodutivas e neurotoxinas, os roedores são as principais espécies utilizadas (MORTON, 1998; SUTER; BABISS; WHEELDON, 2004).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos incluem estudos de avaliação de toxicidade por dose única, dose repetida, genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, toxicidade sobre a função reprodutora, além de toxicidade local (dependendo da via de administração e/ou efeito) (NUGENT; DUNCAN; COLAGIOVANNI, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade de NE contendo LAP ou derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA)

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Validar e padronizar o método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para o doseamento do derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA);
- ✓ Preparar e caracterizar NE contendo LAP ou derivado F-LapA, além de estudar a estabilidade das formulações ao longo do tempo;
- ✓ Avaliar a estabilidade coloidal das NE com as substâncias de interesse encapsuladas em relação a diferentes meios biológicos;
- ✓ Realizar estudos de citotoxicidade das NE frente a diferentes linhagens de células tumorais;
- ✓ Avaliar a eficácia antitumoral e toxicidade dos tratamentos com NE de LAP e derivado F-LapA em animais com tumor de mama induzido;
- ✓ Realizar estudos de toxicidade aguda em animais sadios tratados com nanoemulsão contendo derivado F-LapA.

#### 4 CAPÍTULO 1

### AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NE CONTENDO LAP

(MIRANDA, S. E. M. et al. Enhanced antitumor efficacy of LAP-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110936, jan. 2021)

#### 4.1 Introdução

O LAP é uma naftoquinona de ocorrência natural isolado pela primeira vez em 1882 por E. Paterno do cerne e casca de *Tabebuia avellanedae*, e é um dos compostos mais versáteis com atividades antibiótica, analgésica, antiulcerogênica, antiplasmódicas, antioxidante, antiviral, tripanocida, antineoplásica, imunossupressora para artrite autoimune, ação moluscida, cercaricida e antimalárica (EPIFANO et al., 2014; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; HUSSAIN et al., 2007; HUSSAIN; GREEN, 2017).

Rao (1968) realizou investigações de atividade antitumoral em carcinoma de Walker 256 e Sarcoma de Yoshida. Essas investigações culminaram em liberação para pesquisas clínicas de fase 2 pelo CCNSC. Mesmo apresentando dados de 30% de 49 regressão definitiva das doenças testadas o ensaio foi cancelado devido aos efeitos adversos, como problemas gastrointestinais, anemia e aumento do tempo de coagulação. Esses efeitos estão relacionados com a similaridade da estrutura do LAP com a vitamina K (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; BLOCK et al., 1974; HUSSAIN et al., 2007; RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968).

NE (NE) são sistemas nanoestruturados com grande aplicabilidade por possuírem características que permitem a dissolução de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos. Além disso, são preparados com baixos níveis de solvente orgânico e apresentam a capacidade de proteger o conteúdo encapsulado da ação enzimática, permitindo maior entrega do fármaco. NE são compostas de dois líquidos não miscíveis, tipicamente água e óleo, podendo apresentar tamanho entre 20-200 nanômetros, que possibilita sua aplicação em nanomedicina (BRUSCHI, 2015; DEKIĆ; PRIMORAC, 2017; PATRAVALE; DANDEKAR; JAIN, 2012; RAI et al., 2018).



A nanomedicina surgiu como uma nova área com grande potencial clínico, que além das vantagens características do uso das nanoestruturas, pode ainda ser utilizada para gerar imagens cintilográficas, sem limite de penetração tecidual e geração de imagens quantitativas. Nesse sentido, o emprego de nanossistemas radiomarcados tem ganhado interesse por possibilitar o acesso a uma plataforma teranóstica, capaz de carrear um fármaco potencialmente ativo e gerar imagens que fornecerão informações como localização e extensão do tumor, efetividade do regime terapêutico, e ajuste de dose para cada paciente individualmente (BAO; MITRAGOTRI; TONG, 2013b; JAIN, 2011; KRAFT et al., 2014).

O radionuclídeo mais utilizado para diagnóstico na medicina nuclear, é o  $^{99m}\text{Tc}$ , devido às suas características ideais, como meia vida física de seis horas, emissão de radiação gama de 140 keV, fácil obtenção por meio de gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001).

Diante do exposto, objetivou-se neste capítulo preparar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de uma NE contendo LAP.

## 4.2 Objetivo geral

Preparo e caracterização físico-química de NE contendo LAP. Além da avaliação do comportamento *in vivo* e atividade antitumoral das formulações em animais portadores de tumor de mama murino.

### 4.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a morfologia das NE contendo LAP por crio-microscopia;
- ✓ Análise da estabilidade coloidal das NE em relação a diversos meios biológicos;
- ✓ Determinação da taxa de hemólise do LAP livre e encapsulado em NE;
- ✓ Realizar estudo de radiomarcagem e pureza radioquímica das NE contendo LAP;
- ✓ Estudo da depuração do LAP livre e encapsulado em NE;
- ✓ Análise do perfil de biodistribuição da NE-LAP radiomarcada em animais portadores de tumor de mama murino
- ✓ Avaliação da relação tumor/músculo em modelos animais portadores de tumor de mama;
- ✓ Avaliação da atividade antitumoral do LAP, livre e encapsulado, em modelo animal portador de mama murino;
- ✓ Estudo de toxicidade do tratamento antitumoral em animais portadores de câncer de mama murino.

### 4.3 Materiais e métodos

#### 4.3.1 Materiais

O álcool metílico grau HPLC foi adquirido da empresa Tedia Company (Ohio, EUA). A água utilizada foi purificada utilizando o equipamento Milli-Q® (Millipore, USA). Utilizou-se Monooleato de sorbitano etoxilado (*Super Refined™ Polysorbate™ 80; Tween 80™*), LAP, cloreto estanoso, óleo de soja foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os meios de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), e Roswell Park Memorial Institute (RPMI), soro fetal bovino (SFB), gentamicina, penicilina e estreptomicina comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil). As demais substâncias utilizadas apresentavam grau reagente, sem purificação adicional.

Os Camundongos BALB/c, com massa corpórea média de 20 g, foram adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos sem restrição de água e ração, em ciclo escuro de 12:12 horas, na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os experimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 06/2018 (ANEXO).

As células MDA-MB-231 foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. A linhagem tumoral de câncer de mama murino 4T1 foi mantida em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino.

### 4.3.2 Métodos

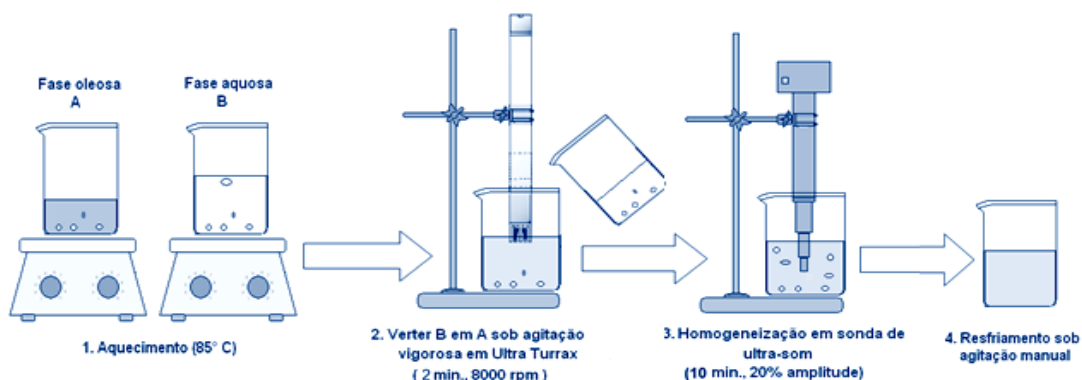
#### 4.3.2.1 Preparo das NE

As NE foram preparadas por método de homogeneização a quente, utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 e ultrassom com sonda de titânio de alta potência (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, EUA). A composição da formulação está representada na **Tabela 1**. Para NE contendo o LAP, o ativo foi pesado e acrescentado à fase oleosa. A fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas e aquecidas, separadamente, a 85°C. A FA lentamente vertida sobre a FO, sob agitação, em Ultra Turrax T-25, a 8.000 RPM, por dois minutos. Posteriormente, os nanoglóbulos foram calibrados, em relação ao diâmetro, em ultrassom, por 10 minutos (**Figura 8**) (MIRANDA et al., 2021).

**Tabela 1 – Composição das NE contendo LAP (0,5 mg/mL)**

Fase Oleosa (FO)	Peso	Fase Aquosa (FA)	Peso
Óleo de soja	200 mg (4%)	Glicerol	112 mg (2,24%)
Tween 80	75 mg (1,5%)	Água purificada q.s.p	5 mL(100%)
LAP	2,5 mg (0,05%)		

**Figura 8 – Esquema representativo do preparo das NE à quente com calibração por ultrassom**



Fonte: Sávia Caldeira, 2011.

#### 4.3.2.2 Caracterização das Formulações

##### 4.3.2.2.1 Avaliação do diâmetro médio (DM), Índice de Polidispersão (Pdl) e potencial zeta

O DM e Pdl foram determinados por espalhamento dinâmico da luz (DLS), a 25°C e ângulo de incidência do laser de 90°. O potencial zeta foi avaliado pela mesma técnica associado à mobilidade eletroforética, à temperatura de 25°C e ângulo de incidência do laser de 90°.

Para realização das medidas de DM, Pdl e potencial zeta foi utilizado equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra) com as amostras diluídas em 100 vezes em água MiliQ® (MIRANDA et al., 2021).

##### 4.3.2.2.2 Avaliação da eficiência de encapsulação de LAP

O teor de LAP encapsulado foi dosado por CLAE (n = 3) com as seguintes condições cromatográficas: sistema eluente constituído de metanol:ácido acético 5%, na proporção 80:20 (v/v), coluna de fase reversa Innoval, C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agela Technologies, Tianjin, China); fluxo de 1,0 mL/min; detecção em 278 nm, volume de injeção de 20 µL e forno da coluna a 40°C. A curva para quantificação foi obtida a partir de três curvas diferentes, contendo sete pontos, coeficiente de variação superior a 0,99. O equipamento utilizado consiste em dois módulos de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA), injetor automático Waters 717 plus (Milford, EUA) e detector UV-Dual λ 2487 Waters (Milford, EUA). A formulação foi centrifugada por cinco minutos a 5000 x g para a remoção do LAP não encapsulado que devido sua baixa solubilidade em meio aquoso precipita e forma um pellet. Após essa etapa, 200 µL do sobrenadante (NE-LAP) foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 4 mL de tetra-hidrofurano (THF), para solubilização dos lípides da

matriz. O volume foi completado com metanol (MeOH) e o sobrenadante analisado por CLAE, avaliando a absorvância em comprimento de onda  $\lambda = 278$  nm (FONSECA et al., 2004).

#### 4.3.2.2.3 Análise morfológica

A crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-TEM) (Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV) foi utilizada para estudar a morfologia do NE-LAP. As amostras de NE contendo 0,5 mg/mL de LAP foram preparadas pela técnica de congelamento por mergulho, espalhando a amostra em uma película fina através de uma tela de cobre com filme *lacey carbon*, com volume da amostra de 3  $\mu$ L/tela e depois submergindo-a rapidamente em etano líquido. O DM foi determinado pela análise de 100 nanoestruturas, utilizando o software Image J. As microscopias foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG.

#### 4.3.2.3 Estabilidade físico-química

Para avaliação da estabilidade das NE parâmetros como DM, Pdl, potencial zeta e teor de encapsulação (TE) foram investigados utilizando os métodos descritos nos itens anteriores. As amostras de NE-LAP na concentração 0,5 mg/mL foram preparadas, armazenadas em geladeira (4°C) e analisadas por até 30 dias após o preparo.

#### 4.3.2.4 Estabilidade coloidal

A estabilidade do NE-LAP foi investigada em diferentes fluidos biológicos para prever o comportamento *in vivo* do sistema. A NE-LAP foi diluída 4 vezes em NaCl (0,9% p/v), tampão PBS (pH 7,4), *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM), Soro Fetal Bovino (SFB) ou plasma murino. A solução resultante foi mantida a 37 °C sob agitação

de 150 RPM, por 24 h. Em pontos pré-determinados de tempo foram coletadas alíquotas de cada solução e o DM foi medido por DLS (MALCOLM et al., 2018).

#### 4.3.2.5 Avaliação da citotoxicidade

O efeito antiproliferativo dos tratamentos foi avaliado por ensaio da sulforodamina B (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Os grupos avaliados foram: solução de diluição (PBS + 2% Tween 80), LAP em solução de PBS com 2% de Tween 80, NE branca, NE-LAP nas linhagens tumorais de mama (4T1 e MDA-MB-231). Para isso, foram semeadas 5000 células por poço de uma placa de 96 poços em meio de cultura e incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Após esse período, os tratamentos preparados em meio de cultura foram adicionados à placa.

As placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 48 h. Após este período, sem remover o sobrenadante, 100 µL de ácido tricloroacético 10,0% (v/v) foram adicionados em cada poço e as placas incubadas a 4°C durante 60 minutos para a fixação das células. Em seguida, as placas foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura por quatro vezes consecutivas e, após secagem completa à temperatura ambiente, 100 µL de solução de sulforodamina B a 0,057% (p/v) adicionados em cada cavidade e as placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 30 minutos. A seguir, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com ácido acético 1,0% (v/v) e novamente mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 100 µL de solução Tris Base a 10 mM e pH 10,5.

A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas (Versamax Genius®, MA-EUA) a 510 nm e a porcentagem da inibição do crescimento celular

calculada em relação à absorção das células mantidas somente em meio de cultura (sem nenhum tratamento).

Os dados foram expressos como a porcentagem de proliferação celular para três experimentos independentes em quadruplicata, sendo representados como média  $\pm$  desvio padrão. Posteriormente, foi determinada a concentração do LAP necessária para promover 50% de inibição da viabilidade celular (CI<sub>50</sub>).

#### 4.3.2.6 Avaliação de atividade hemolítica

No estudo de atividade hemolítica foram avaliados a dispersão de LAP livre em PBS com 2% de Tween 80 e as NE nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , além da NE branca (n = 5). A avaliação foi realizada no sangue de camundongos fêmeas *Swiss*, com aproximadamente oito semanas de idade. Os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg), por via intraperitoneal e, em seguida, o sangue foi coletado por punção do plexo axilar em tubo tipo *ependorf*, contendo EDTA (2%). Para a obtenção do *pellet* de hemácias, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos em temperatura ambiente (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge, Alemanha).

O sobrenadante foi descartado e, o *pellet* de hemácias, então, foi lavado com 1 mL de NaCl 0,9% (p/v), por três vezes e, posteriormente, diluído na mesma solução obtendo-se uma concentração final de 4% (p/p). Foram adicionados os diferentes tratamentos à suspensão de hemácias 4%, mantendo sempre a proporção volumétrica de 1:1, em quintuplicata.

Para o controle negativo (CN), adicionou-se à suspensão de hemácias o mesmo volume de NaCl 0,9% (p/v) e, para o controle positivo (CP), 100% de hemólise,



adicionou-se água deionizada. As amostras foram incubadas a 37 °C, durante 1 hora, sob agitação a 500 rpm (Banho Metabólico Dubnoff MA-95/CF Marconi, Brasil).

Logo após a incubação, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos para a formação do *pellet* de hemácias íntegras restantes. A quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante resultante desse processo foi coletada e analisada por espectrometria UV-visível (Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer Thermo Scientific, Estados Unidos) a 540 nm. A porcentagem de hemólise foi determinada pela equação:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{\text{Absorvância amostra} - \text{Absorvância CN}}{\text{Absorvância CP} - \text{Absorvância CN}} \times 100$$

#### 4.3.2.7 Formação do complexo $^{99m}\text{Tc-NE-LAP}$

As NE foram radiomarcadas utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ , por método direto e emprego de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , como agente redutor. Em um frasco de penicilina, contendo 1 mL da formulação, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em  $\text{HCl}$  0,25M (10 mg/ml). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de  $\text{NaOH}$  0,1M. O frasco foi lacrado e foi realizado vácuo. Em seguida, 0,5 mL de solução de  $\text{NaCl}$  0,9% (p/v) contendo 37 MBq de  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$  pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco, e mantido em temperatura ambiente, por 15 minutos (MIRANDA et al., 2019b).

#### 4.3.2.8 Pureza radioquímica e purificação do complexo $^{99m}\text{Tc-NE-LAP}$

A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia de camada delgada (TLC-SG, Merck, Darmstadt, Alemanha), utilizando papel whatman como fase estacionária e acetona como fase móvel para quantificar  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  livre, e o  $^{99m}\text{TcO}_2$  foi quantificado e removido da preparação utilizando um filtro 0,45  $\mu\text{m}$ , onde o tecnécio coloidal

( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) fica retido no filtro e quantificado em um contador gama, conforme descrito anteriormente por Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2016). O rendimento de marcação foi obtido por meio da fórmula:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\% \text{ TcO}_4^- + \% \text{ TcO}_2)$$

#### 4.3.2.9 Determinação do tempo de meia-vida biológica em camundongos

Alíquotas de 0,1 mL do complexo  $^{99m}\text{Tc-NE-LAP}$  foram injetadas, por via intravascular, na cauda de camundongos BALB/c sadios ( $n = 7$ ). Uma incisão foi realizada na cauda dos animais e o sangue coletado, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 e 1440 minutos, após a administração do complexo  $^{99m}\text{Tc-LAP}$ . Os tubos com sangue foram pesados e levados a um contador de radiação  $\gamma$  para determinação da radioatividade. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (% ID/g). Estes dados foram utilizados para traçar uma curva de depuração sanguínea onde foi possível determinar os tempos de meia-vida de distribuição e de depuração (MIRANDA et al., 2019b).

#### 4.3.2.10 Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos

O tumor mamário 4T1 foi desenvolvido em camundongos BALB/c fêmeas, com 7-8 semanas de vida. As células 4T1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), em câmara com 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de umidade e  $37^\circ\text{C}$ . Após 3-5 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com o Azul de Trypan. A concentração da suspensão de 4T1 foi ajustada para  $1,0 \times 10^6$  células em 100  $\mu\text{L}$  e injetada via subcutânea (SC) na coxa direita dos animais. As células tumorais

foram deixadas crescer *in vivo* durante 07 dias até os tumores atingirem, aproximadamente, 100 mm<sup>3</sup>.

#### 4.3.2.11 Estudo de biodistribuição ex vivo

Alíquotas de 0,1 mL do complexo <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP (3,7 MBq) foram injetadas, por via intravenosa, na cauda de camundongos BALB/c com tumor de mama. Após períodos de 1, 4, 8 e 24 horas, cada animal (n = 7) foi anestesiado, por via intraperitoneal, com uma solução de ketamina e xilazina, na dose de 80 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente. Após os intervalos de tempo determinados, os órgãos baço, coração, estômago, fígado, intestino delgado, intestino grosso, músculo, pulmões, rins, sangue e o tumor foram coletados, secos sobre papel filtro e pesados em balança analítica. A determinação da atividade radioativa presente em cada órgão foi determinada por um contador  $\gamma$ . O percentual de radiação nos tecidos (% ID/g) foi obtido a partir da relação entre a radioatividade do tecido e a radioatividade do padrão de dose, alíquota semelhante à injetada no camundongo, utilizada para considerar o decaimento radioativo do radionuclídeo <sup>99m</sup>Tc e considerado como 100%. Os resultados foram expressos como porcentagem de dose injetada por grama de tecido, além disso, foi avaliado a relação tumor músculo, com o intuito de avaliar um possível acúmulo do nanossistema radiomarcado na região tumoral (MIRANDA et al., 2019b).

#### 4.3.2.12 Atividade antitumoral

Após o desenvolvimento do tumor, conforme descrito no subitem 3.2.10, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de tratamento (n = 7 para cada grupo): solução PBS + 2% de Tween 80 (grupo controle); LAP livre (PBS + 2% de Tween 80) e NE-LAP. A dose total de LAP em todos os grupos de tratamento foi de 25 mg/kg, dividida em 5 administrações (5 mg/kg), a cada 2 dias. Ao longo do estudo, os camundongos foram pesados e os tumores foram medidos com paquímetro

a cada 2 dias, até o final do experimento (Dia 10) quando os camundongos foram sacrificados. Os volumes tumorais foram calculados a partir da fórmula:

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0,5$$

Onde  $d_1$  e  $d_2$ , representam o menor e o maior diâmetro, respectivamente (LEITE et al., 2012). A razão de inibição de crescimento (IC) foi calculada no dia 10 ( $D_{10}$ ), como se segue:

$$IR = 1 - (VTR \text{ médio do grupo tratado} / VTR \text{ médio do grupo controle}) \times 100$$

Onde,  $VTR = \text{Volume tumoral } D_{10} / \text{Volume tumoral } D_0$

#### 4.3.2.13 Avaliação bioquímica dos animais tratados

A avaliação da toxicidade bioquímica foi realizada em todos os grupos, controle, LAP livre e NE-LAP. Os animais foram anestesiados, e o sangue total coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo solução de EDTA (anticoagulante) na proporção 2%. O sangue total coletado foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 min. O plasma obtido foi utilizado para a quantificação dos parâmetros hepáticos e renais. Para a determinação da função hepática foram realizadas dosagens de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A possível nefrotoxicidade foi determinada mediante medidas da concentração de uréia e creatinina. Todos os testes bioquímicos foram realizados mediante análise espectrofotométrica, em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) segundo o indicado nas bulas dos kits de diagnóstico (SILVA et al., 2018).

#### 4.3.2.14 Avaliação histopatológica

Foram realizadas investigações histopatológicas para avaliar a toxicidade do tratamento com o LAP livre e NE-LAP a partir da identificação de alterações a nível celulares e teciduais. Assim, após o tratamento, os animais do experimento de atividade antitumoral foram eutanasiados e o fígado e rins foram coletados, lavados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e fixados em formol tamponado a 10% (v/v) por um período de 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram fragmentados e incluídos em blocos de parafina, seccionados em corte de 5  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas no microscópio óptico conectado a câmara digital Spot Insight Color adaptado a um microscópio Olympus BX-40 e o software de captura SPOT® versão 3.4.5.

#### 4.3.2.15 Análise estatística

Os valores médios e os desvios-padrão (SD) foram calculados para todos os experimentos. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey, ou teste T quando o número de grupos foi igual a dois. Os dados foram previamente testados para homoscedasticidade e distribuição normal. Um nível de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4.4 Resultados e discussão

### 4.4.1 Caracterização físico-química das NE

Os valores encontrados para a caracterização físico-química estão dispostos na Tabela 2. Os dados de DM, Pdl, potencial zeta e encapsulação estão em consonância com o preconizado para administração intravascular. Além disso, a encapsulação do fármaco não alterou as principais características da formulação.

**Tabela 2 – Caracterização físico-química das NE contendo LAP (0,5 mg/mL)**

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão (Pdl)	Potencial zeta (mV)	EE%
<b>NE</b>	176 ± 8	0,20 ± 0,06	-25,4 ± 8,25	—
<b>NE-LAP</b>	178 ± 2	0,17 ± 0,02	-21,6 ± 2,36	100,32 ± 1,46

Nota: mV – milivolts; %EE – Porcentagem de Eficiência de Encapsulação.

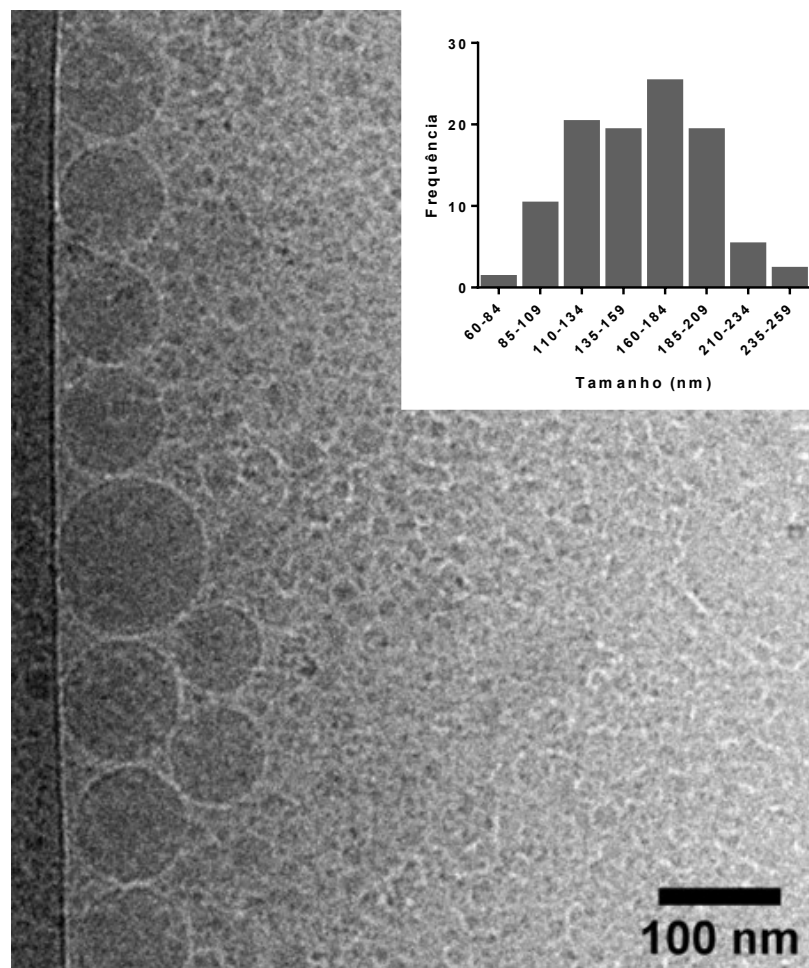
As formulações, branca e com LAP, apresentaram DM de ~ 175 nm, com baixos valores de Pdl ( $\leq 0,2$ ), indicando uma distribuição de tamanho homogênea. Estes valores estão de acordo com o que é recomendado para a administração intravenosa (LITZINGER et al., 1994). Além disso, os nanosistemas com tamanho inferior a 200 nm são vantajosos, pois podem reduzir a opsonização e, conseqüentemente, a absorção pelas células do sistema mononuclear fagocitário (DAVIS, 1974; LIU; AUGUSTE, 2015).

O potencial zeta próximo de -20 milivolts é indicativo de estabilidade, gerada por repulsão das cargas presente na superfície das gotículas, o que diminui a possibilidade de maturação de Ostwald (FRÖHLICH, 2012). Outros estudos relataram que gotículas de óleo revestidas com agentes surfactantes não iônicos como o Tween 80® apresentaram carga negativa, possivelmente devido a presença de ácidos graxos livres do surfactante, ou ainda, à adsorção de íons hidroxila aniônicos da água na

superfície das gotículas oleosas (CHANG; MCCLEMENTS, 2016; LUO et al., 2017; STACHURSKI; MICHALEK, 1996). A eficiência de encapsulação foi de 100%, como esperado para a NE que é sabidamente uma estratégia interessante para viabilizar entrega de drogas pouco hidrossolúveis (LI et al., 2012; TUBTIMSRI et al., 2018).

Analizamos ainda a morfologia dos glóbulos das NE, por crio-microscopia eletrônica de transmissão (cryo-MET). Foi possível visualizar glóbulos esféricos com superfície lisa e tamanho médio aproximado ao encontrado pela técnica de DLS após contagem utilizando o software ImageJ (Figura 9).

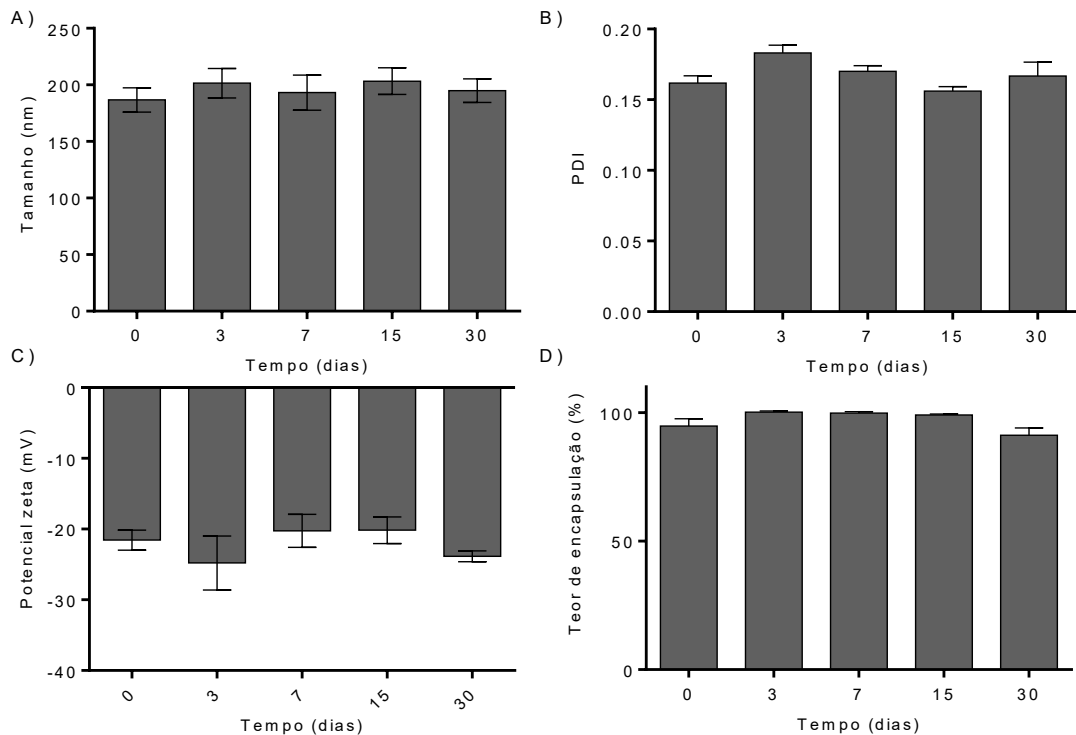
**Figura 9 – Criomicroscopia eletrônica de transmissão de NE-LAP. Escala em 100 nanômetros.**



#### 4.4.1 Estabilidade físico-química

Avaliando as características físico-químicas, foi possível constatar que não houve alterações significativas no DM, Pdl, e potencial zeta por pelos menos 30 dias, tempo máximo avaliado. Os valores se mantiveram próximos do encontrado no primeiro dia durante os trinta dias avaliados (Figura 10).

**Figura 10 – Gráficos de estabilidade físico-química por até 30 dias de NE-LAP 0,5 mg/mL armazenadas a 4°C. A) Tamanho médio (nm); B) Índice de Polidispersão (PDI); C) Potencial Zeta e D) Teor de Encapsulação (%).**



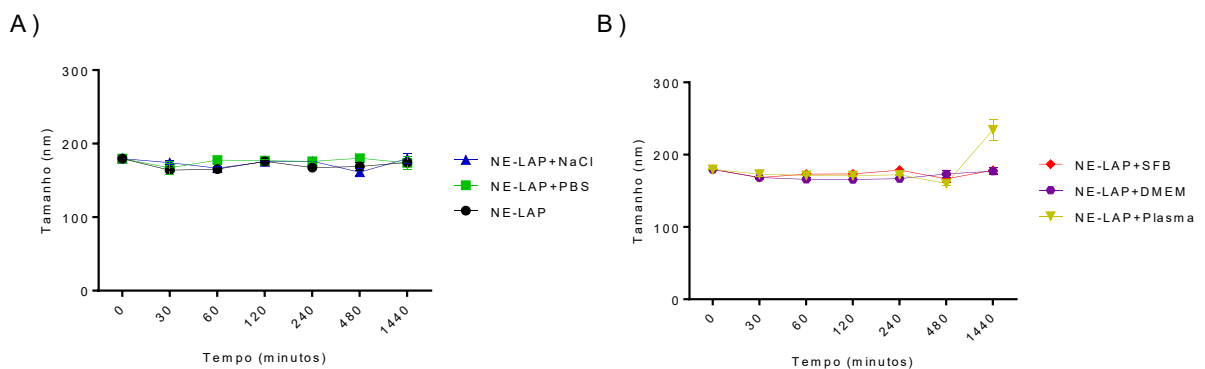
Um ponto importante a se observar é que o DM permaneceu próximo a 200 nm, o que é compatível com a administração intravenosa, e o Pdl apresentou valores sempre inferiores a 0,3 indicando nanoestruturas homogeneamente distribuídas (PETROS; DESIMONE, 2010). Além disso, um valor potencial zeta negativo (-20 mV) foi alcançado durante todo o experimento. O teor de encapsulação do LAP em NE se mostrou estável, com valores superiores a 90% após 30 dias.



#### 4.4.2 Estabilidade coloidal

Para avaliar de forma mais concreta a estabilidade da NE, foi realizado estudo do comportamento do tamanho dos nanoglóbulos frente a diversos meios biológicos. O comportamento das NE está demonstrado na Figura 11.

**Figura 11 – Gráficos de estabilidade coloidal de NE-LAP em diversos meios biológicos diluídos quatro vezes. A) NE-LAP 0,5 mg/mL; NE-LAP 0,5 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%); NE-LAP 0,5 mg/mL em solução fosfato tamponada (PBS pH 7,4). B) NE-LAP 0,5 mg/mL em Soro Fetal Bovino (SFB); NE-LAP 0,5 mg/mL em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-LAP 0,5 mg/mL em plasma murino.**



Os resultados demonstram que a NE não teve seu tamanho alterado de forma significativa mesmo na presença de meio complexos, como plasma, indicando excelente estabilidade do sistema formado. O aumento ocorreu após 24 horas chegando a 234 nm, tamanho que ainda permite a administração intravascular (LITZINGER et al., 1994).

#### 4.4.3 Estudo de citotoxicidade

Conhecendo o potencial antitumoral do LAP, já bem descrito na literatura, foi avaliado o perfil de citotoxicidade do composto livre e encapsulado em NE e os valores encontrados para a taxa de inibição do crescimento de 50% das células (CI<sub>50</sub>) estão

exibidos na Tabela 3. Os valores encontrados mostram que o LAP apresentou citotoxicidade frente duas das principais linhagens de câncer de mama utilizados na literatura, 4T1 e MDA-MB-231, e a sua encapsulação nas NE não alterou a citotoxicidade. A NE branca também foi avaliada, porém não apresentou alteração na viabilidade celular, por isso não foi possível calcular seu valor de  $CI_{50}$ .

**Tabela 3 – Concentração Inibitória média ( $CI_{50}$ ) para LAP e NE-LAP contra células tumorais 4T1 e MDA-MB-231.**

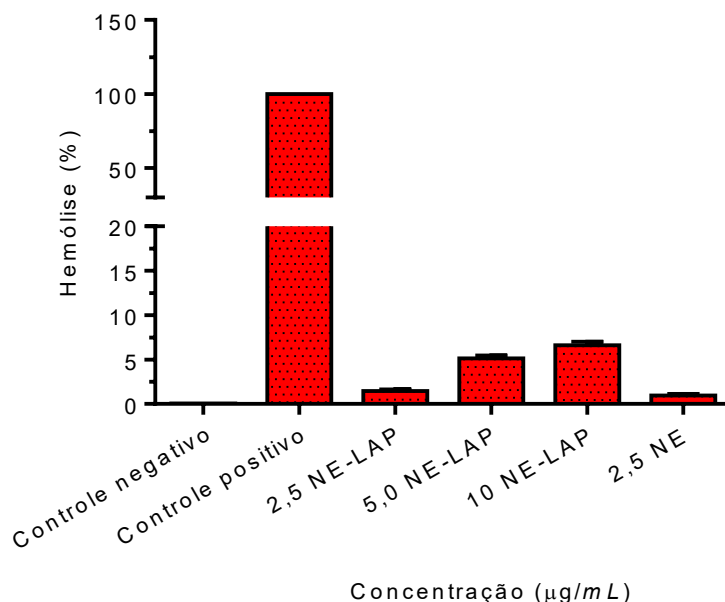
<b>Substâncias</b>	<b>4T1 (<math>\mu</math>M)</b>	<b>MDA-MB-231 (<math>\mu</math>M)</b>
LAP	8,29 $\pm$ 3,07	6,60 $\pm$ 3,1
NE-LAP	8,15 $\pm$ 1,12	6,21 $\pm$ 3,15

A citotoxicidade apresentada pelo LAP na forma livre ou encapsulada se mostrou promissora especialmente considerando as linhagens tumorais testadas. Os tumores triplo negativos apresentam maior agressividade e invasividade, levando a piores prognósticos (CHAVEZ; GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2010; KAU et al., 2012). A atividade antitumoral do LAP é amplamente associada com a elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), podendo aumentar os níveis intracelulares de ERO e levar a célula a um processo apoptótico (LECOEUR et al., 2008; LECOEUR; PRÉVOST; GOUGEON, 2001).

#### 4.4.4 Estudo de hemólise

Outro método utilizado para avaliação da segurança da NE foi a avaliação da hemocompatibilidade da formulação proposta. Na Figura 12 estão demonstrados os resultados do estudo de hemocompatibilidade. Podemos observar um baixo potencial hemolítico, em todas as concentrações de NE testadas, contendo ou não LAP.

**Figura 12 – Gráfico de estudo de hemólise in vitro da nanoemulsão NE-LAP 0,5 mg/mL em diversas concentrações avaliadas. Dados expressos como média  $\pm$  desvio (n=5).**



Cabe destacar que mesmo na maior concentração testada, a NE-LAP apresentou percentual de hemólise igual a 7,5%, não sendo considerada hemolítica. Formulações com taxa de hemólise inferior a 10% são consideradas como não-hemolíticas, e podem ser consideradas hemocompatíveis e seguras para administração intravenosa (AMIN; DANNENFELSER, 2006).

#### 4.4.5 Radiomarcagem e Pureza radioquímica

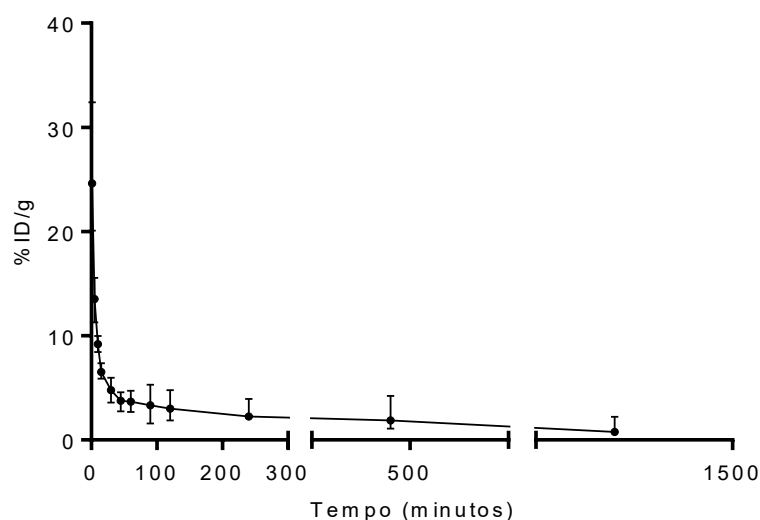
A formação do complexo  $^{99\text{m}}\text{Tc-NE-LAP}$  mostrou altos rendimentos de radiomarcagem,  $96,0 \pm 1,9\%$  sendo  $1,6 \pm 1,9\%$  de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  e  $2,5 \pm 2\%$  de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ . A preparação foi, ainda, purificada pela remoção do percentual de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ . Essa impureza coloidal radioativa pode ser eficientemente removida pela filtração do produto radiomarcado em filtros  $0,22 \mu\text{m}$  (FERNANDES et al., 2016).

Os rendimentos de radiomarcção obtidos estão de acordo com os valores recomendados pela Farmacopeia Americana (90%) para uma preparação radiofarmacêutica (CONVENTION, 2018).

#### 4.4.6 Avaliação de depuração sanguínea

A curva de depuração sanguínea para a NE radiomarcada está apresentada na figura 13. Podemos observar que a formulação apresenta um perfil de depuração bifásico, com meia vida de distribuição de 3,8 minutos, meia vida de eliminação de 117,3 minutos e área sob a curva de 2918 % DI/min.

**Figura 13 – Curva de depuração sanguínea após administração intravenosa do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP em animais BALB/c sadios. Dados expressos como porcentagem da média  $\pm$  desvio padrão da média (n=7).**



O perfil de depuração do  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP apresentou um ligeiro incremento na meia vida de eliminação quando comparada com aquela obtida para o fármaco livre ( $^{99m}\text{Tc}$ -LAP). Esse ganho também resultou em um aumento da área sob a curva de 1909% para 2918% DI/min (MIRANDA et al., 2019b).

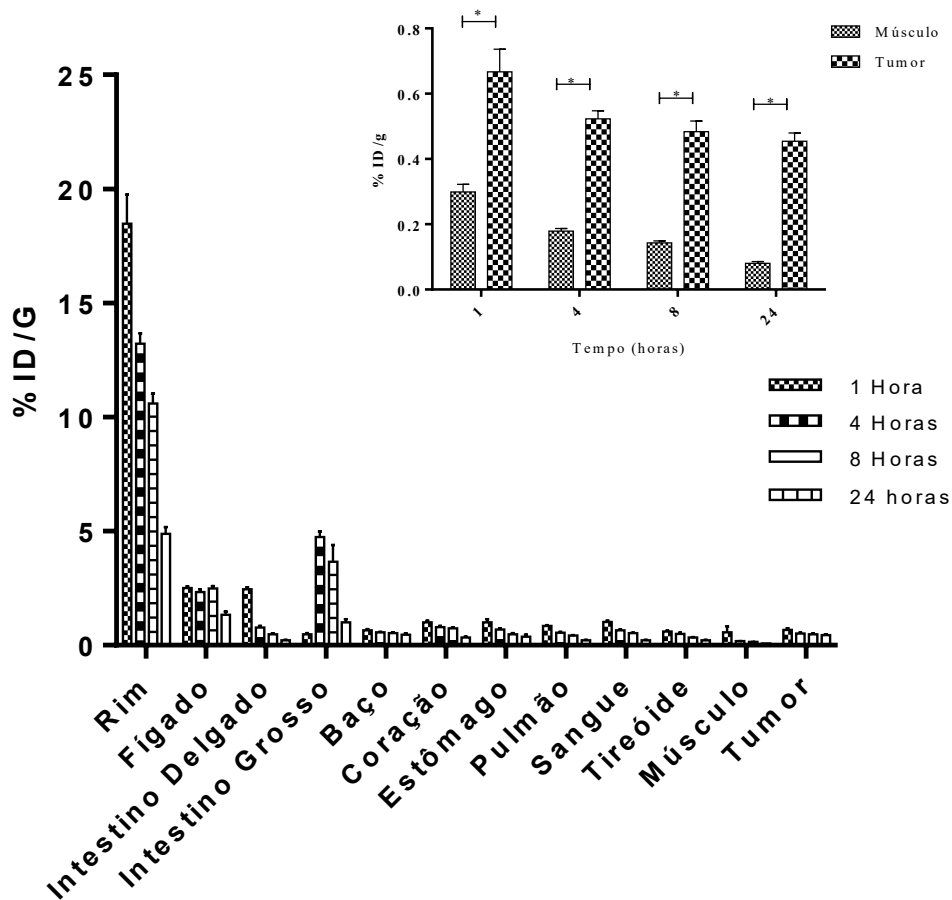
As melhoras nos parâmetros farmacocinéticos, observadas para a nanoemulsão, podem ser explicadas pelo aumento do tempo de circulação por diminuir o tempo de eliminação do fármaco em solução (SINGH et al., 2017). No caso da NE, de forma geral, houve um aumento na concentração plasmática do fármaco em relação ao LAP livre. Além disso, temos ainda um aumento no volume de distribuição com redução do *clearance* o que promove um aumento do tempo de meia vida (BRUXEL et al., 2012; CHOUDHURY et al., 2017).

#### 4.4.7 Avaliação da biodistribuição e da relação tumor-músculo

A radiomarcagem de moléculas ou nanossistemas possibilita acompanhar o destino dos complexos marcados no organismo, permitindo identificar órgãos e tecidos com maior afinidade pelo sistema em análise. O perfil de distribuição do complexo radiomarcado  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP, após administração intravenosa em animais portadores de tumor de mama murino 4T1, é apresentado na Figura 14.

Nota-se elevada captação em rins, fígado e intestinos. Adicionalmente, baixa captação é observada na tireoide, o que corrobora os resultados do estudo de estabilidade de marcação. É sabido que o tecnécio-99m, na sua forma livre, apresenta afinidade para a tireoide e, portanto, uma perda de instabilidade do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP resultaria na elevação dos níveis de captação nesse órgão (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001; ODA et al., 2017).

**Figura 14 – Biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc-NE-LAP}$  após administração intravenosa em animais portadores de tumor de mama murino 4T1 (n=7) (Insert: captação em tumor e músculo 1, 4, 8 e 24 horas após administração intravenosa). Dados expressos como média da dose injetada de  $^{99m}\text{Tc-NE-LAP}$  por grama de tecido  $\pm$  desvio padrão. (\*  $p < 0,05$ )**

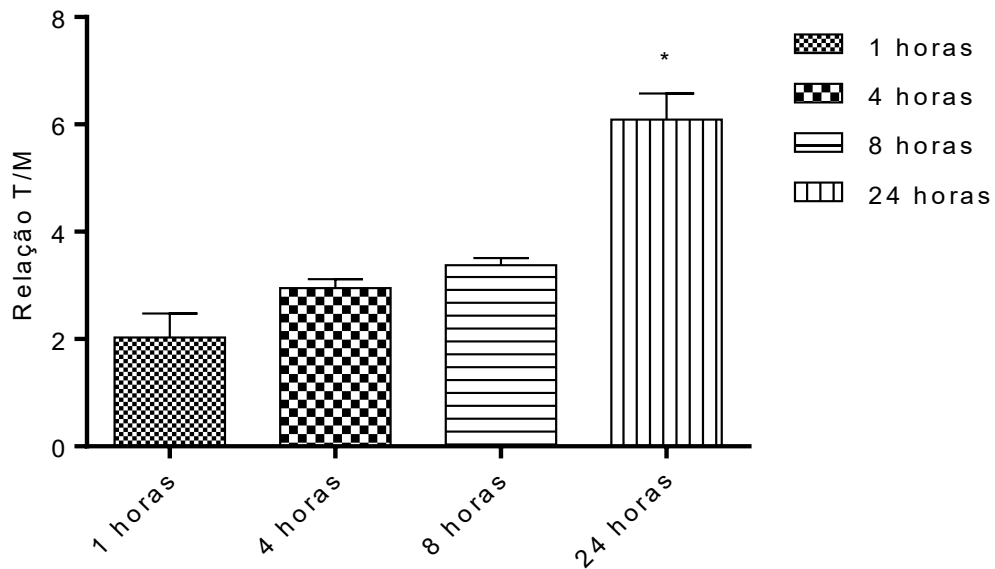


Normalmente, nanossistemas são facilmente captados pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear, porém essa captação, normalmente alta no fígado e baço não foi observada em nosso trabalho. Possivelmente essa baixa captação é devido a rápida degradação de polissorbato 80 por esterases sanguíneas, o que poderia levar a uma alteração no perfil de biodistribuição esperado (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2018; VAN TELLINGEN et al., 1999).

Essa rápida degradação pode também justificar a mudança pouco acentuada no tempo de circulação do LAP após a encapsulação em NE. A nanoemulsão é um sistema muito utilizado para administração de compostos hidrofóbicos, porém não é um sistema conhecido por fornecer liberação prolongada ou aumentar o tempo de meia-vida de forma significativa (DEKIĆ; PRIMORAC, 2017; FERREIRA et al., 2016; LI et al., 2012; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020).

Outro parâmetro que pode ser extraído dos estudos de biodistribuição é a razão entre a captação da radiação no tumor pela captação no tecido muscular contralateral. Esse parâmetro permite avaliar a afinidade do sistema marcado por um tecido, como o tecido tumoral. No destaque da Figura 14 podemos observar captação expressiva no tumor quando comparado com o músculo contralateral do mesmo animal. Esses achados são traduzidos em razões de captação tumor/musculo que estão representadas na Figura 15. É possível verificar essa relação é sempre superior a 2 durante todos os tempos analisados, o que significa uma captação tumoral pelo menos duas vezes maior no tecido tumoral de mama em comparação ao tecido muscular contralateral. É importante destacar que essa relação tem um aumento tempo-dependente o que contribui para confirmar a afinidade do nanossistema para a região do tumor.

**Figura 15 – Relação alvo/não alvo em análises de dose injetada por grama de tecido obtido de ensaio de biodistribuição em animais com tumor de mama (\* indica diferença estatística entre os tempos testados)**



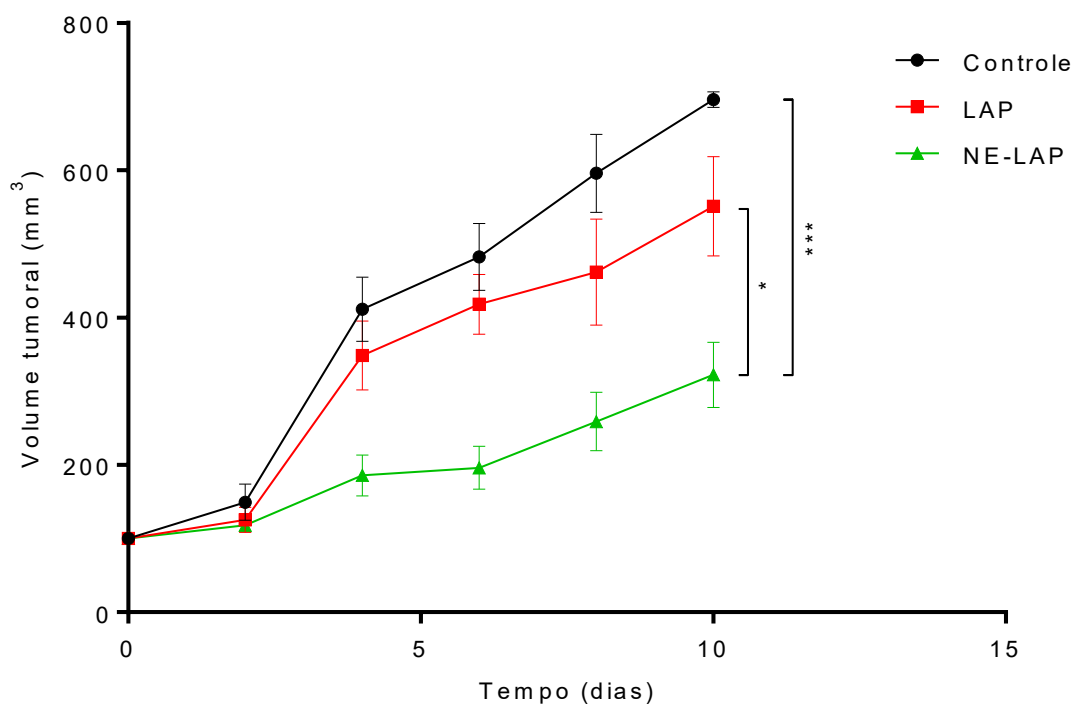
Recentemente, alguns autores demonstraram a acumulação tumoral de nanopartículas ocorre preferencialmente por via intracelular em detrimento ao acúmulo pelo efeito EPR (SINDHWANI et al., 2020). Este fato, juntamente com a já conhecida maior permeabilidade dos vasos tumorais podem representar as razões para o sucesso das nanopartículas na terapia antitumoral e contribuem para justificar os valores de relação tumor/musculo encontrados nesse trabalho.

#### 4.4.8 Estudo de atividade antitumoral

Foi avaliado ainda a atividade do fármaco livre e encapsulado em modelo animal de tumor de mama e o resultado está representado na figura 16. Observa-se que o LAP possui capacidade de atenuar o crescimento tumoral, porém esse controle foi potencializado quando o fármaco foi encapsulado nas NE.



**Figura 16 – Gráfico de atividade antitumoral no crescimento de camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1. Cada tratamento foi realizado por via intravenosa administrado cinco vezes, de dois em dois dias, a uma dose de 5 mg/kg/dia. Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média. As curvas de crescimento foram analisadas por ANOVA unidireccional, seguida do teste de Tukey. \* Representa a diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos LAP e NE-LAP. \*\*\* Representa a diferença estatística ( $P < 0,001$ ) entre os tratamentos NE-LAP e do grupo controle.**



Além disso, foram avaliados parâmetros como, volume tumoral relativo e o fator de inibição do crescimento, que são indicativos da efetividade de tratamentos antitumorais (DRUMMOND et al., 2006; LEITE et al., 2012; NUNES et al., 2022; SILVA et al., 2019). Os dados estão expressos na Tabela 4, e indicam um volume tumoral relativo duas vezes menor que o do grupo controle para as NE-LAP, além de um fator de inibição do crescimento tumoral 75% maior para NE-LAP comparado ao LAP livre. Esses achados confirmam a efetividade do tratamento utilizando NE-LAP.

**Tabela 4 – Volume Tumoral Relativo (VTR) e Inibição do Crescimento (IC) após administração de LAP e NE-LAP.**

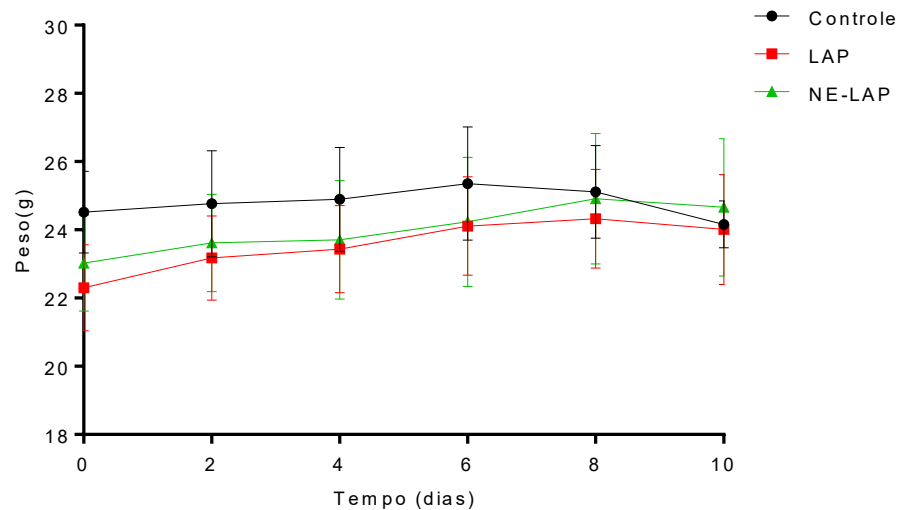
<b>Grupo</b>	<b>VTR</b>	<b>IC</b>
<b>Controle</b>	6,96	-
<b>LAP-livre</b>	5,51	30,68
<b>NE-LAP</b>	3,22	53,71

A melhora na atividade antitumoral proporcionada pela NE-LAP NE pode estar relacionada a combinação de diversos fatores incluindo, aumento da meia vida plasmática e maior afinidade pelo sítio tumoral confirmada pela relação tumor/músculo. Esses fatores levaram a uma maior biodisponibilidade do fármaco que aliado à sua capacidade de gerar ERO's culminaram na maior capacidade em controlar o crescimento tumoral. Outros autores já relataram avanços similares utilizando NE para a entrega de outros fármacos antitumorais (HAN et al., 2009; ZHAO et al., 2013).

#### 4.4.9 Investigação da toxicidade do tratamento antitumoral

Como uma das formas de avaliar a toxicidade do tratamento foi realizado o acompanhamento do peso corporal dos animais durante toda a abordagem terapêutica. A figura 17, apresenta o peso corporal dos camundongos durante o período de tratamento. Observa-se que o peso dos animais se manteve estável durante todo o protocolo de tratamento para todos os grupos estudados sugerindo baixa ou nenhuma toxicidade.

**Figura 17 – Variação do peso corporal de camundongos portadores de tumor 4T1 após administração intravenosa de PBS-Tween 80 2% (grupo de controle); solução tamponada de LAP, e NE-LAP.**



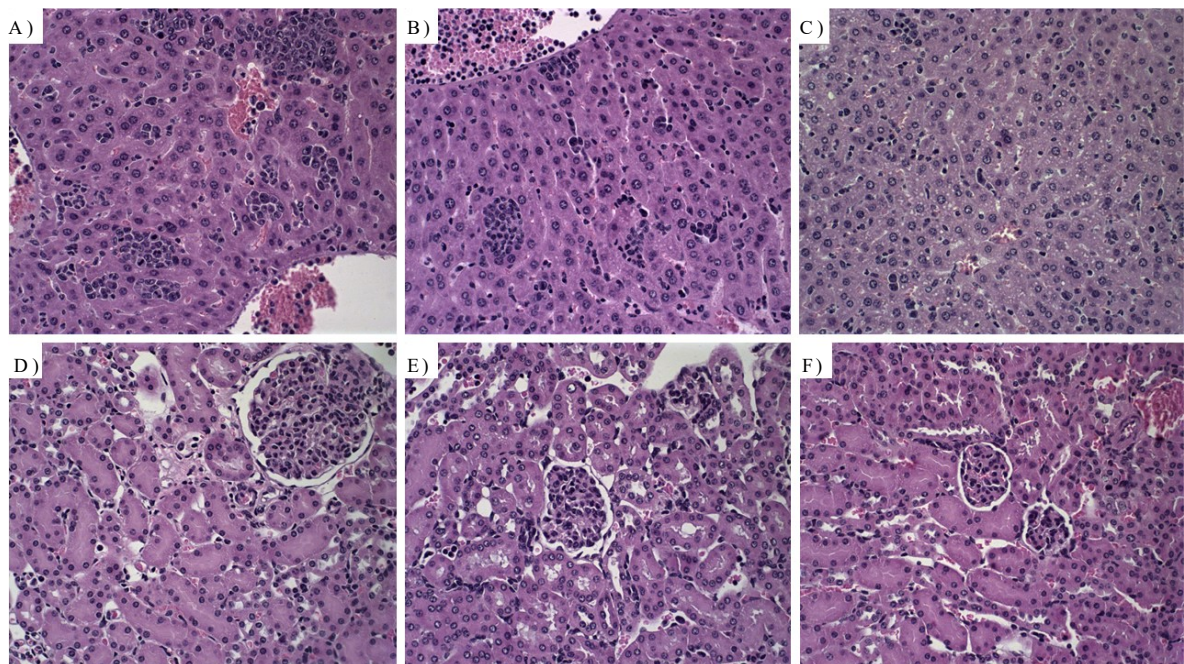
Foram investigados parâmetros bioquímicos para avaliação de função hepática e renal, pois são órgão envolvidos com metabolização e excreção de fármacos e podem ser afetados durante um regime de tratamento quimioterápico (FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003). Os dados apresentados na Tabela 5 indicam ausência de alterações nos parâmetros hepáticos e renais para os três grupos de tratamento avaliados.

**Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos de camundongos portadores de tumor de mama murino 4T1 após administração intravenosa de PBS + 2% de Tween 80 (controle), solução tamponada de LAP e NE-LAP.**

	Controle	LAP	NE-LAP
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,35 ± 0,10	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,05
<b>Ureia (mg/dL)</b>	19,00 ± 2,00	23,83 ± 3,71	22,67 ± 3,01
<b>ALT (U/L)</b>	25,32 ± 9,88	25,03 ± 5,40	23,72 ± 3,29
<b>AST (U/L)</b>	185,05 ± 51,84	142,75 ± 24,77	139,09 ± 27,92

Com o intuito de confirmar a segurança do tratamento, realizou-se a análise histológica dos órgãos fígado e rins. Os resultados dispostos na figura 18 evidenciam a manutenção da arquitetura tecidual e celular dos tecidos analisados confirmando ausência de toxicidade durante o tratamento.

**Figura 18 – Secções histológicas de fígado e rim de camundongos BALB/C fêmeas portadoras de tumor mamário tratados com PBS + 2 %Tween (controle), LAP e NE-LAP obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle, fígado; B) LAP, fígado; C) NE-LAP, fígado; D) controle, rim; E) LAP, rim e F) NE-LAP, rim. Amplificação de 40x.**



Os cortes histológicos confirmam o encontrado nos dados anteriores, onde não foi possível visualizar toxicidade hepática e renal após o tratamento, seja com o fármaco livre ou encapsulado. A toxicidade do LAP foi avaliada anteriormente por via oral e mostrou-se pouco tóxico, normalmente com efeitos transitórios e relacionados a altas doses, acima de 62 mg/Kg/dia (MORRISON et al., 1970a).

#### 4.5 Conclusão

Neste capítulo foi possível avaliar de forma concreta e ampla a atividade do LAP encapsulado em NE (NE-LAP), como forma de tratamento em modelo animal portador de câncer de mama murino.

A encapsulação permitiu o aumento da atividade antitumoral do LAP, consequência de um ganho no tempo de circulação e uma relação tumor-músculo favorável mostrando a capacidade do nanossistema de proteger e entregar o fármaco na região de interesse. O tratamento não acarretou hemólise, perda de peso, alteração de padrões bioquímicos estudados ou modificação da arquitetura tecidual demonstrando a segurança do tratamento. Ainda são necessários maiores estudos para avaliação de segurança e eficácia em modelo pré-clínico.

Sendo assim, a encapsulação do LAP em NE se mostrou como uma boa alternativa terapêutica para o tratamento de câncer de mama, capaz de proteger o fármaco e melhorar a entrega do composto na região de interesse.

## **5 CAPÍTULO 2**

**DESENVOLVER, MAVIDAR E PADRONIZAR MÉTODO DE DOSEAMENTO DO  
DERIVADO L-FUCOSÍDICO DO LAP**

## 5.1 Introdução

Análogos sintéticos do LAP possuem atividade antitumoral aumentada contra diversos tumores sólidos (EYONG et al., 2008; HUSSAIN; GREEN, 2017). Recentemente, derivados acetilglicosilados do LAP tem mostrado efeitos anticancerígenos frente células de leucemia mieloide humana (HL-60) e adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231), com valores de  $CI_{50}$  iguais a 5 e 14  $\mu\text{M}$ , respectivamente (MARQUES et al., 2020). Os resultados desses estudos demonstraram aumento da citotoxicidade dos derivados comparado ao LAP.

Dentre os análogos acetilglicosilados, o derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA), mostrou resultados satisfatórios frente as células das linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) sem apresentar dano a células normais de tecido renal (VERO) (OTTONI, 2014). Embora o derivado F-LapA tenha demonstrado ganho em citotoxicidade sua solubilidade aquosa ainda é um fator limitante para sua aplicação clínica (GUO, 2017; MARQUES et al., 2020). Portanto, nosso grupo de pesquisa objetivou desenvolver formulações de NE contendo F-LapA para aumentar sua eficácia e reduzir efeitos tóxicos, baseado na terapia direcionada do câncer. No entanto, um método de quantificação é necessário para dar suporte ao desenvolvimento farmacotécnico e garantir a correta quantificação da molécula na formulação final.

Considerando que segundo nosso conhecimento, não há um método analítico para quantificação do derivado F-LapA publicado atualmente, o objetivo desse capítulo foi apresentar a validação e padronização de um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) isocrático simples, rápido e preciso com detecção no ultravioleta para quantificação de F-LapA e posterior aplicação em formulações de

NE. O método foi padronizado e validado de acordo com a diretrizes atuais da RDC 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).



## 5.2 Objetivo geral

Padronizar e validar o método analítico para quantificação do derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA) de acordo com as diretrizes atuais da RDC 166/2017, método aplicado a formulações desenvolvidas e amostras de produtos acabados.

### 5.2.1 Objetivos Específicos

- ❖ Determinar a linearidade do método de validação;
- ❖ Calcular os dados de precisão para o método proposto;
- ❖ Estimar a robustez do método cromatográfico;
- ❖ Avaliar os limites de detecção e quantificação;

## 5.3 Materiais e métodos

### 5.3.1 Materiais

O álcool metílico grau HPLC foi adquirido da empresa Tedia Company (Ohio, EUA) e da ACS científica (São Paulo, Brasil). A água utilizada foi purificada utilizando o equipamento Milli-Q® (Millipore, USA). LAP foi obtido da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e o seu derivado sintetizado e caracterizado no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG como reportado por Ottoni, 2011.

### 5.3.2 Metodologia

#### 5.3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método utilizado para quantificar o teor de F-LAP por CLAE foi realizado tendo como base o doseamento do LAP conforme procedimento descrito por Fonseca e Colaboradores (2004) com algumas modificações. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram:

- Coluna de fase reversa Innoval C<sub>18</sub>, 150 x 4,6 mm, 5 µm (Agela Technologies, Tianjin, China);
- Fase móvel composta de Metanol e Ácido Acético 5% (80:20 v/v);
- Forno da coluna a 40°C;
- Detecção DAD em comprimento de onda a 278 nm;
- Fluxo de 1,0 mL/minuto e volume de injeção de 20 µL;
- Foi utilizado o equipamento HPLC Agilent 1260; módulos: uma bomba quaternária (G1311B), um injetor automático (G1329B), um forno de

acondicionamento de colunas (G1316A), um detector (G4212B) (Califórnia, EUA).

#### 5.3.2.2 Parâmetros de validação

Os parâmetros de validação avaliados para o método foram linearidade, precisão intradia, robustez, limites de detecção e quantificação.

#### 5.3.2.3 Linearidade

Para o preparo da curva foi pesado 25 mg do F-Lap, solubilizado em metanol e transferido para um balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com metanol, obtendo assim a concentração final de 1 mg/mL da solução estoque. A curva foi proposta com 9 pontos, a saber: 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2 µg/mL. Para o preparo dos pontos da curva os volumes de 5000; 2500; 1250; 625; 313; 156; 78; 39 e 20 µL, respectivamente, foram retirados da solução estoque e adicionados em balões de 10 mL. Em seguida, o volume foi completado com metanol até o menisco e a solução homogeneizada. Alíquotas foram retiradas de cada balão, filtradas em filtro 0,22µm e acondicionadas em vials de CLAE. Após a estabilização da linha de base, nas condições do ensaio, as amostras foram injetadas em triplicatas no cromatógrafo.

As áreas dos picos detectados foram utilizadas para a construção da curva analítica. A linearidade foi avaliada por meio da estimativa dos parâmetros: coeficientes de correlação ( $r$ ), determinação ( $r^2$ ) e resíduos de regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP) utilizando o programa Minitab 17®.

#### 5.3.2.4 Precisão intra-dia

A avaliação da precisão intra-dia do método foi realizada por meio de três determinações de soluções de baixa, média e alta concentração. Foram preparadas

três soluções estoques na concentração de 1000 µg/mL em MeOH. Foram feitas diluições, em triplicatas, até as concentrações finais de 250; 31,3 e 3,9 µg/mL respectivamente.

A média, o intervalo de confiança (IC) a 95% e o desvio padrão relativo (DPR) foram obtidos e utilizados como resultado de avaliação da precisão, que segundo a RDC 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não deve ser superior a 5%.

#### 5.3.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez, foram alterados separadamente, a empresa fornecedora do metanol utilizado na fase móvel [Tedia Company (Ohio, EUA) e ACS científica (São Paulo, Brasil)] e em outro momento, o equipamento de CLAE utilizado para a dosagem do derivado L-fucosídico do LAP [Agilent 1260 (Califórnia, EUA) e Waters 515 (Milford, EUA)].

#### 5.3.2.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Para estimativa dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) utilizamos a média das inclinações e do desvio padrão do intercepto das curvas analíticas obtidas para o derivado L-fucosídico, de acordo com as equações X e Y, respectivamente.

$$LD = 3 \sigma/b$$

$$LQ = 10 \sigma/b$$

Onde:  $\sigma$ , o desvio padrão do intercepto  $y$  quando  $x = 0$ ;  $b$ , inclinação da curva analítica (ANVISA, 2017).

## 5.4 Resultados e discussão

Para quantificação com segurança do derivado L-fucosídico do LAP, foi realizado validação analítica seguindo os protocolos propostos na RDC 166. Para isso foi realizado uma curva de calibração com concentração variando de 500 a 2 µg/mL de F-LapA.

### 5.4.1 Linearidade

A linearidade tem como principal função mostrar a capacidade da curva analítica de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em faixa pré-determinada (ANVISA, 2017). A linearidade pode ser avaliada através do coeficiente de correlação ( $r$ ) e determinação ( $r^2$ ) que estão dispostos na tabela 6.

**Tabela 6 – Tabela contendo os parâmetros de linearidade avaliados para validação analítica.**

Linearidade	
Concentrações	2-500 µg/mL
Coefficiente de Correlação ( $r$ )	0,99954489
Coefficiente de Determinação ( $r^2$ )	0,99909004
Equação	$y=979475 + 3871225.X$

Para realizar a análise completa segundo preconiza o guia de validação, foi realizado análise estatística dos resíduos e verificado se eram homocedásticos. Como apresentaram heterocedasticidade para a variância dos resíduos, foi utilizado a técnica dos mínimos múltiplos quadrados ponderados. A partir desta análise, foi possível obter a equação da reta capaz de quantificar o derivado L-fucosídico do LAP.

Segundo preconizado pela ANVISA o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,990. Assim, pode-se concluir que o modelo linear é adequado para a quantificação do F-LapA na faixa de 2 a 500 µg/mL.

#### 5.4.2 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em várias dosagens de uma mesma amostra. Ela é definida como a concordância entre resultados de sequentes medições utilizando um mesmo método e seguindo as mesmas condições (CIENFUEGOS, 2005).

Para isso três valores, alto, médio e baixa de concentração (250; 31,3 e 3,9 µg/mL) foram utilizados e dosados pelo método cromatográfico conforme descrito na tabela 7.

**Tabela 7 – Tabela contendo os dados de área obtidos em análises de reprodutibilidade e precisão.**

	Área			Média	Desvio	DPR
<b>Alto</b>	966625502	958534055	970561767	965240441,30	6132312,68	0,63
<b>Médio</b>	132545061	126822807	132511676	130626514,70	3294149,76	2,52
<b>Baixo</b>	15320047	15400972	16687397	15802805,33	767146,68	4,85

Como observado na tabela acima, os valores apresentaram desvio padrão inferior a 5%, conforme preconizado pela ANVISA.

#### 5.4.3 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação estão dispostos na tabela 8, e foram calculados através dos dados obtidos pela curva analítica.

**Tabela 8 – Tabela contendo os dados de Limite de detecção e quantificação obtidos por validação analítica.**

Limite de detecção e quantificação	
<b>LD</b>	0,72 µg/mL
<b>LQ</b>	2,41 µg/mL

#### 5.4.4 Robustez

A robustez de um método analítico é definida pela *International Conference on Harmonisation* (ICH) como a capacidade do método em não ser afetada por pequenas variações nos parâmetros utilizados e fornece uma indicação de sua confiabilidade sob condições normais de uso (EMA, 2011). Sendo assim, avaliamos a resposta do método frente a alteração do fornecedor do metanol e o equipamento de CLAE utilizado para dosagem do composto. Os dados obtidos estão dispostos na tabela 9:

**Tabela 9 – Tabela contendo os dados encontrados de robustez para análise de validação analítica.**

	Fornecedor 1	Fornecedor 2	DPR (%)
<b>Metanol</b>	77254846	76402781	3,77
	72056248	76322337	
	72264399	79220921	
<b>CLAE</b>	71881507	76321989	3,58
	77526080	79078690	
	78545178	79141354	

Como é possível observar, os valores de área obtidos com os dois métodos avaliados foram similares e não apresentaram diferenças estatísticas pela análise de teste t de Student. Esta avaliação sugere robustez no método, indicando que ele não sofre influências por pequenas variações no método de dosagem. Além disso, o valor do Desvio Padrão Relativo, também foi inferior a 5% conforme preconizado.

## 5.5 Conclusão

O método foi validado de acordo com a diretrizes da RDC nº 166/2017 e demonstrou ser linear, preciso e robusto dentro da faixa validada. Sendo assim, a validação se mostrou eficaz para a utilização no doseamento de F-LapA encapsulado em formulações farmacêuticas.



## **6 CAPÍTULO 3**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NE CONTENDO O DERIVADO L-FUCOSÍDEO PERACETILADO DO LAP (F-LapA)**

## 6.1 Introdução

O Câncer é uma doença de ampla distribuição geográfica, sendo a segunda principal causa de mortalidade, representando uma em cada seis mortes no ano de 2018 em todo o mundo. O câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo, com incidência superior a dois milhões de casos no ano de 2020. Segundo o Instituto Nacional do Câncer no Brasil são estimados 66.280 novos casos de câncer de mama, aproximadamente 30% dos casos de 2020 (BRASIL; INCA, 2022; FERLAY et al., 2021).

Devido à alta incidência do câncer de mama, a busca por novos tratamentos se faz cada vez mais necessária, sendo os compostos naturais e seus derivados alvos promissores para a busca de novos fármacos para o tratamento dessa doença (LIU et al., 2009). O LAP é um composto descoberto por Paterno em 1882, na casca e cerne da árvore *Tabebuia avellanedae*, com várias atividades biológicas já descritas, dentre elas a atividade antitumoral. Por apresentar vários efeitos adversos além de baixa biodisponibilidade, estudos clínicos de atividade antitumoral foram cancelados (BLOCK et al., 1974; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003).

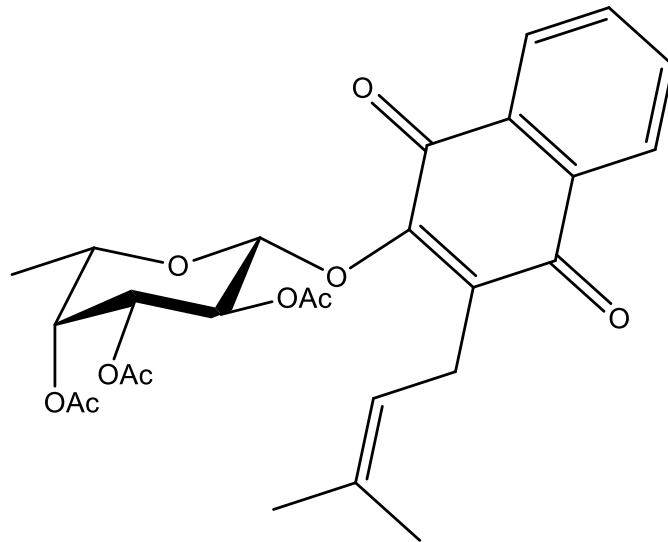
Devido sua reconhecida atividade biológica, vários estudos utilizam o LAP como protótipo para síntese de novas moléculas potencialmente bioativas (COSTA, 2012; KANDIOLLER et al., 2013). Alguns estudos apresentaram resultados promissores ao sintetizar derivados contendo grupos hidrofílicos e/ou lipofílicos para melhorar a biodisponibilidade e assim atingir melhores parâmetros farmacocinéticos (KARAKAŞ et al., 2019; OTTONI, 2014). Um estudo importante utilizou um derivado  $\beta$ -glicosídico tetra-acetilado do LAP com resultados satisfatórios contra o Carcinoma Walker-256 e

Leucemia Linfocítica em modelos animais (DA LINARDI; DE OLIVEIRA; SAMPAIO, 1975).

Uma alternativa muito utilizada na entrega de fármacos pouco solúveis em água é a utilização de nanosistemas, como a nanoemulsão. A nanoemulsão é uma dispersão de dois líquidos imiscíveis, em escala nanométrica que permite aumento da solubilidade além da proteção contra degradação enzimática e hidrólise do fármaco.

Assim, este capítulo teve como objetivo desenvolver, caracterizar, e avaliar a atividade antitumoral e toxicidade de NE encapsulando o derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA), imagem 19.

**Figura 19 – Estrutura química do derivado L-fucosídico peracetilado do LAP (F-LapA)**



## 6.2 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade de NE contendo derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA).

### 6.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver NE contendo F-LapA
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente e morfológicamente as NE contendo F-LapA;
- ✓ Analisar a estabilidade coloidal das NE em relação a diversos meios biológicos;
- ✓ Realizar estudos de degradação do F-LapA encapsulado em NE;
- ✓ Avaliar atividade citotóxica *in vitro* e captação celular das formulações desenvolvidas contendo F-LapA e compará-las as soluções de LAP;
- ✓ Realizar estudos de toxicidade aguda do derivado livre e encapsulado em modelo animal sadio.
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral do F-LapA, livre e encapsulado, em modelo animal portador de mama murino;
- ✓ Avaliar a toxicidade do tratamento antitumoral em animais portadores de câncer de mama murino.

## 6.3 Materiais e métodos

### 6.3.1 Materiais

O álcool metílico grau HPLC foi adquirido da empresa Tedia Company (Ohio, EUA). A água utilizada foi purificada utilizando o equipamento de destilação e deionização Milli-Q® (Millipore, USA). Monooleato de sorbitano etoxilado (*Super Refined™ Polysorbate™ 80; Tween 80™*), LAP, óleo de soja foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os meios de cultura *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), e Roswell Park Memorial Institute (RPMI), soro fetal bovino (SFB), gentamicina, penicilina e estreptomicina comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

As demais substâncias utilizadas foram em grau reagente, sem purificação adicional. O derivado L-fucosídico do LAP (F-LapA) foi sintetizado pelo grupo do Prof. Ricardo José Alves do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG e fornecidos para os estudos subsequentes.

Fibroblastos humanos não tumorais (NTHF) de cultura primária de tecidos gengivais foram cultivados em DMEM e gentilmente fornecidos pela Prof<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões (Laboratório de Virologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil) de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo número 021/2009. As células MDA-MB-231 e NTHF foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. A linhagem tumoral de câncer de mama murino 4T1 foi mantida em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. As culturas de células foram mantidas em garrafas T-75, em estufa úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

Os Camundongos BALB/c, com massa corpórea média de 20 g, foram adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos sem restrição de água e ração e ciclo escuro de 12:12 horas, na sala de experimentação animal do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os experimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 47/2022 (ANEXO 2).

### 6.3.2 Métodos

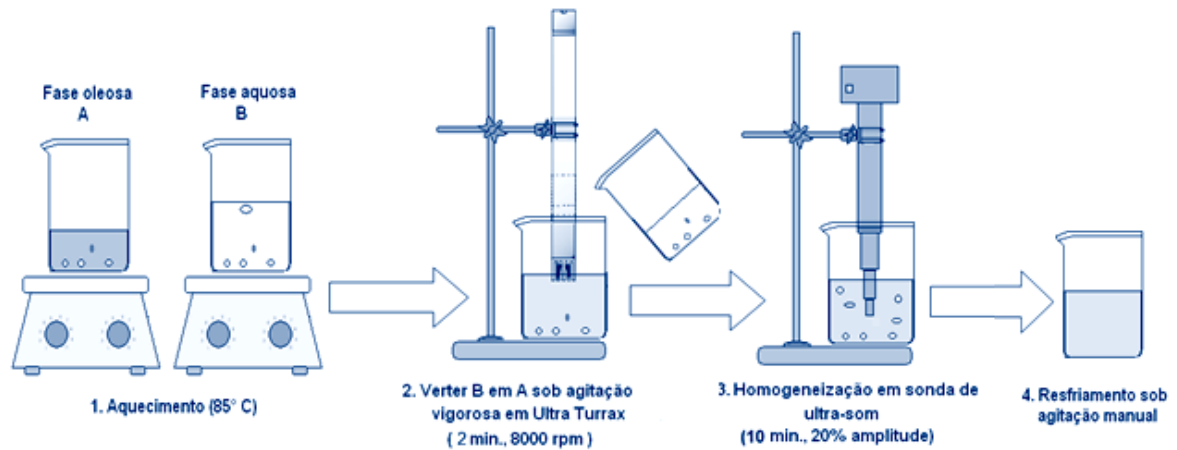
#### 6.3.2.1 Preparo das NE

As NE foram preparadas por método de homogeneização a quente, utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 e ultrassom com sonda de titânio de alta potência (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, EUA). A composição da formulação está representada na **Tabela 10**. Para o preparo das NE contendo o LAP, ele foi pesado e acrescentado à fase oleosa. A fase oleosa (FO) e a fase aquosa (FA) foram pesadas e aquecidas, separadamente, a 85°C. A FA lentamente vertida sobre a FO, sob agitação, em Ultra Turrax T-25, a 8.000 RPM, por dois minutos. Posteriormente, as partículas foram calibradas, em relação ao diâmetro, em ultrassom, por 10 minutos (**figura 20**).

**Tabela 10 – Composição das NE de F-LapA (1/1,5 gm/mL).**

Fase Oleosa (FO)	Peso	Fase Aquosa (FA)	Peso
Óleo de soja	200 mg (4%)	Glicerol	112 mg (2,24%)
Tween 80	75 mg (1,5%)	Água purificada q.s.p	5 mL (100%)
F-LapA	5/7,5 mg (0,1/0,15%)		

Figura 20 – Esquema representativo do preparo das NE à quente com calibração por ultrassom



Fonte: Sávia Caldeira, 2011.

### 6.3.2.2 Caracterização das Formulações

#### 6.3.2.2.1 Avaliação do diâmetro médio (DM), Índice de Polidispersão (Pdl) e potencial zeta

O diâmetro médio (DM) e índice de polidispersão (Pdl) foram determinados por espalhamento dinâmico da luz (DLS), a 25°C e ângulo de incidência do laser de 90°. O potencial zeta foi avaliado pela técnica de DLS associado à mobilidade eletroforética, à temperatura de 25°C e ângulo de incidência do laser de 90°. As amostras foram diluídas 100 vezes em água MiliQ®.

Para realização das medidas de DM, Pdl e potencial zeta foi utilizado equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra) com as amostras diluídas em 100 vezes em água MiliQ®.

#### 6.3.2.2.2 Análise de rastreamento de partículas (NTA)

O tamanho e concentração das partículas foram ainda medidos por propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano, empregando a equação de Stokes-

Einstein, por meio da técnica de Análise de rastreamento de partículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Nanosight NS300 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram preparadas após diluição em água ultrapura (mesma fase externa das formulações) e introduzidas na câmara de amostras do Nanosight com uma seringa descartável. As amostras foram medidas em temperatura ambiente por 60 segundos com detecção automática. As imagens foram capturadas por uma câmera de dispositivo de carga.

#### 6.3.2.2.3 Avaliação da eficiência de encapsulação de F-LapA

Para avaliação do teor encapsulado, a NE-F-LapA foi centrifugada por cinco minutos a 5000 x g para a remoção do F-LapA não encapsulado que devido sua baixa solubilidade em meio aquoso precipita e forma um pellet. Após essa etapa, 200 µL do sobrenadante (NE-LAP) foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 4 mL de tetrahidrofurano (THF), para solubilização dos lípides da matriz. O volume foi completado com metanol (MeOH) e o sobrenadante analisado por CLAE, avaliando a absorbância em comprimento de onda  $\lambda = 278$  nm (FONSECA et al., 2004). O F-LapA foi quantificado por CLAE com as seguintes condições cromatográficas: sistema eluente constituído de metanol:ácido acético 5%, na proporção 80:20 (v/v), coluna de fase reversa Innoval, C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 150 mm (Agela Technologies, Tianjin, China); fluxo de 1,0 mL/min; detecção em 278 nm, volume de injeção de 20 µL e forno da coluna a 40°C. O equipamento utilizado consiste em dois módulos de bomba isocrática Waters 515 (Milford, EUA), injetor automático Waters 717 plus (Milford, EUA) e detector UV-Dual  $\lambda$  2487 Waters (Milford, EUA).



### 6.3.2.3 Estabilidade físico-química

Para avaliação da estabilidade das NE, os parâmetros DM, Pdl, potencial zeta e teor de encapsulação (TE) foram investigados utilizando os métodos descritos nos itens anteriores. As amostras foram preparadas e armazenadas em geladeira (4°C) e analisadas por até 180 dias após o preparo.

### 6.3.2.4 Microscopia de luz polarizada

A presença de cristais de F-LapA nas dispersões da nanoemulsão foi avaliada por um microscópio óptico (Zeiss Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Alemanha) acoplado a um polarizador de luz e equipado com uma câmera digital AxioCam (Modelo ERC 5S, Carl Zeiss, Alemanha). As amostras foram preparadas em lâminas de microscópio (não diluídas) e a ausência de cristal indica encapsulação do F-LapA.

### 6.3.3.5 Estabilidade coloidal

A estabilidade do NE-F-LapA foi investigada em diferentes fluidos biológicos para prever o comportamento *in vivo* do sistema frente meios complexos. O NE-F-LapA foi diluído 4 vezes em NaCl (0,9% p/v), tampão PBS (pH 7,4), *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM), Soro Fetal Bovino (SFB) ou plasma murino. A dispersão resultante foi mantida a 37 °C sob agitação de 150 RPM, por 24 h. Em pontos pré-determinados de tempo foram coletadas alíquotas de cada solução e o DM foi medido por DLS (MALCOLM et al., 2018).

### 6.3.3.6 Ensaio de degradação do derivado encapsulado

Estudos de degradação foram conduzidos utilizando uma dispersão de F-LapA livre (PBS + 2% Tween 60 + 10% de PEG 400) na concentração igual 0,8 mg/mL. Alíquotas de 1 mL da formulação com concentração 1,5 mg/mL e da solução livre (0,8 mg/mL)

foram colocadas em um frasco contendo 25 mL da solução diluidora (PBS + 2% de Tween + 10% PEG 400) e a mistura foi mantida a 37°C sob agitação magnética (KS 4000 i control, IKA Shakers, Staufen - Alemanha). Alíquotas foram retiradas em tempos específicos de 0, 60, 120, 240, 360, 480 e 1440 minutos e a concentração de F-LapA foi determinada por CLAE como descrito no tópico 3.2.2.3.

#### 6.3.3.7 Avaliação da viabilidade celular

O efeito do tratamento sobre a viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio de sulforodamina B (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Os grupos avaliados foram: DMSO, F-LapA em solução de DMSO e NE-F-LapA em células tumorais de mama (4T1, MDA-MB-231) e fibroblastos saudáveis humanos. Para isso, 5000 células por poço foram semeadas numa placa de 96 poços em meio de cultura e incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após esse período, as soluções contendo os tratamentos preparados em meio de cultura foram adicionadas à placa.

As placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 48 h. Após este período, sem remover o sobrenadante, 100 µL de ácido tricloroacético 10,0% (v/v) foram adicionados em cada poço e as placas incubadas a 4°C durante 60 minutos para a fixação das células. Em seguida, as placas foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura por quatro vezes consecutivas e, após secagem completa à temperatura ambiente, 100 µL de solução de sulforodamina B a 0,057% (p/v) foram adicionados em cada cavidade e as placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 30 minutos. A seguir, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com ácido acético 1,0% (v/v) e novamente mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 100 µL de solução Tris Base a 10mM e pH 10,5.

A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas (Versamax Genius®, MA-EUA) a 510nm e a porcentagem da inibição do crescimento celular calculada em relação à absorção das células mantidas somente em meio de cultura (sem nenhum tratamento).

Os dados foram expressos como a porcentagem de proliferação celular para três experimentos independentes em quadruplicata, sendo representados como média ± desvio padrão. Posteriormente, foi determinada a concentração do F-LapA necessária para promover 50% de inibição da viabilidade celular (CI<sub>50</sub>) para os diferentes tratamentos.

Para o cálculo de índice de seletividade (IS) foram utilizados os valores de CI<sub>50</sub> para a linhagem 4T1 e fibroblasto a partir da seguinte equação:

$$IS = \frac{CI_{50} (NRFH)}{CI_{50} (4T1)}$$

#### 6.3.3.8 Captação celular

A captação celular do derivado F-LapA livre e NE-F-LapA foi realizado em células 4T1 e determinado por CLAE. Para a quantificação da captação celular de F-LapA, as células tumorais 4T1 foram semeadas em placas de 6 poços (5 x 10<sup>5</sup> células/poço) e incubadas por 24h a 37°C. Em seguida, as células foram tratadas (n = 3) com 1 mL de DMEM fresco contendo 25 mM de F-LapA em meio de dissolução (PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG 400) ou de NE-F-LapA. As células foram incubadas novamente por 1 e 4 h a 37°C. Após o tratamento, as células foram removidas das placas utilizando tripsina, lavadas com PBS para remover o fármaco não-internalizados e centrifugadas (2000 rpm, 5 min). Posteriormente, os *pellets* foram ressuspensos em 1mL de solução de metanol:álcool isopropílico (1:1) e as amostras

foram transferidas para o banho ultrassônico por 30 minutos para promover a lise celular e extração do F-LapA (NUNES et al., 2022). Finalmente, as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min e uma alíquota do sobrenadante foi usada para quantificar o F-LapA intracelular por CLAE como descrito na seção 3.2.2.3. A captação celular foi calculada pela equação 4.

$$\text{Captação celular (\%)} = \frac{[\text{F-LapA}] \text{ extraído das células}}{[\text{F-LapA}] \text{ total}} \times 100$$

#### 6.3.3.9 Estudos de toxicidade aguda *in vivo*

A avaliação da toxicidade aguda *in vivo* foi realizada segundo as recomendações da OECD 423 de 2001, contendo algumas adaptações para formulações de uso parenteral (OECD, 2001). Os parâmetros avaliados para a determinação da toxicidade *in vivo* foram: observação comportamental, peso corporal, consumo de água e ração, análises bioquímicas, análises hematológicas e análises histopatológicas.

Os camundongos foram divididos em 7 grupos com seis animais cada grupo e receberam, por via endovenosa, dose única do derivado F-LapA e NE-F-LapA, nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg, além de grupo controle, que recebeu administração de salina (NaCl 0,9%).

Após os tratamentos, os animais foram observados por 14 dias. Durante o período de observação, os parâmetros comportamentais, consumo de água e ração, peso corporal, morbidade e mortalidade foram avaliados. A variação de peso foi calculada de acordo com o peso inicial dos animais. Ao fim dos 14 dias de observação, os animais foram anestesiados, utilizando ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), e eutanasiados. O sangue total foi coletado para as análises hematológicas e bioquímicas.

Foi coletado sangue total por punção do plexo braquial em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Os parâmetros hematológicos avaliados foram: hemoglobina, número de hemácias, hematócrito, global e diferencial de leucócitos. Os parâmetros foram mensurados utilizando aparelho hematológico automático Hemovet 2300 (São Paulo, Brasil).

Para as análises bioquímicas, o sangue total foi coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo solução de EDTA, ou citrato de sódio quando necessário. O sangue total coletado foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 min. O plasma obtido foi utilizado para a quantificação dos parâmetros de coagulação, hepáticos e renais. Para a determinação da função hepática foram realizadas dosagens de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A nefrotoxicidade foi determinada mediante medidas da concentração de ureia e creatinina (SILVA et al., 2018). Os dados da coagulação avaliados foram tempo de protrombina (TP) e tempo de trombolastina parcialmente ativada (TTPa). Todos os testes bioquímicos foram realizados mediante análise espectrofotométrica em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) segundo o indicado nas bulas dos kits de diagnóstico.

#### 6.3.3.10 Realização do modelo tumoral em camundongos

O tumor mamário 4T1 foi desenvolvido em camundongos BALB/c fêmeas com 7-8 semanas de vida. As células 4T1 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em câmara com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade e 37°C. Após 3-5 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com o Azul de Trypan. A concentração da suspensão de 4T1 foi ajustada para 1,0 x 10<sup>6</sup> células em

100 µL e injetada via subcutânea (SC) na coxa direita dos animais. As células tumorais foram deixadas crescer *in vivo* durante 07 dias até os tumores atingirem, aproximadamente, 100 mm<sup>3</sup>.

#### 6.3.3.11 Atividade antitumoral

Após o desenvolvimento do tumor, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de tratamento (n = 7 para cada grupo): grupo Salina (NaCl 0,9%), solução diluente (PBS + 2% de Tween 80 + 10% de PEG 400), dispersão de LAP em PBS com 2% de Tween; solução de F-LapA em solução diluente e NE-F-LapA. A dose total de F-LapA em todos os grupos de tratamento foi de 50 mg/kg, dividida em 5 administrações (10 mg/kg), a cada 2 dias. Para o grupo de LAP, a dose foi de 25 mg/kg, dividida em 5 administrações (5 mg/kg), a cada dois dias. Ao longo do estudo, os camundongos foram pesados e os tumores foram medidos com paquímetro a cada 2 dias, até o final do experimento (Dia 10) quando os camundongos foram sacrificados. Os volumes tumorais foram calculados a partir da fórmula:

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0,5$$

Onde  $d_1$  e  $d_2$ , representam o menor e o maior diâmetro, respectivamente (LEITE et al., 2012). A razão de inibição de crescimento (IC) foi calculada no dia 10 ( $D_{10}$ ), como se segue:

$$IR = 1 - (VTR \text{ médio do grupo tratado} / VTR \text{ médio do grupo controle}) \times 100$$

Onde, VTR = Volume tumoral  $D_{10}$  / Volume tumoral  $D_0$

#### 6.3.3.12 Avaliação bioquímica

A avaliação bioquímica da toxicidade foi realizada para todos os animais após o tratamento. Os animais foram anestesiados e o sangue total coletado por punção do

plexo braquial em tubos contendo solução de EDTA (anticoagulante), ou citrato de sódio quando necessário. O sangue total coletado foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 min. O plasma obtido (n=4) foi utilizado para a quantificação dos parâmetros hematológicos, hepáticos e renais. Para a determinação da função hepática foram realizadas dosagens de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A possível nefrotoxicidade foi determinada mediante medidas da concentração de uréia e creatinina (MIRANDA et al., 2021). Os fatores hematológicos avaliados foram tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa). Todos os testes bioquímicos foram realizados mediante análise espectrofotométrica em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) segundo o indicado nas bulas dos kits de diagnóstico.

#### 6.3.3.13 Avaliação histopatológica

Foram realizadas investigações histopatológicas para avaliar a toxicidade do tratamento a partir da identificação de alterações a nível celulares e teciduais. Assim, após o estudo de atividade antitumoral, todos os animais foram eutanasiados e os órgãos, fígado, pulmão e tumor, foram coletados, lavados com solução de NaCl 0,9% (p/v) e fixados em formol tamponado a 10% (v/v) por um período de 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram fragmentados e incluídos em blocos de parafina, seccionados em corte de 5  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas no microscópio óptico conectado a câmera digital Spot Insight Color adaptado a um microscópio Olympus BX-40 e o software de captura SPOT® versão 3.4.5.

#### 6.3.3.14 Análise estatística

Os valores médios e os desvios-padrão (sd) foram calculados para todos os experimentos. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey, ou teste T quando o número de grupos foi igual a dois. Além disso, todos os dados foram previamente testados para homoscedasticidade e normalidade. Um nível de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).



## 6.4 Resultados e discussão

### 6.4.1 Caracterização

Os dados de caracterização das NE's, branca e NE-F-LapA nas concentrações 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL estão descritos na Tabela 11. É importante destacar que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros físico-químicos avaliados para todas as três formulações testadas.

**Tabela 11 – Tamanho de partícula, concentração, Pdl, potencial zeta e Eficiência de Encapsulação (EE) de NE- branco e NE-F-LapA em duas concentrações diferentes de F-LapA (1,0 e 1,5 mg/mL).**

	Tamanho (nm)		Concentração (partículas/mL)	Zeta	Pdl	% EE
	DLS	NTA				
<b>Branco</b>	192 ± 10	180 ± 4	4,2x10 <sup>12</sup> ± 1,6x10 <sup>11</sup>	-21,97 ± 0,64	0,17 ± 0,01	---
<b>NE 1,0</b>	195 ± 10	176 ± 5	3,8x10 <sup>12</sup> ± 1,8x10 <sup>11</sup>	-21,70 ± 2,34	0,19 ± 0,02	100,44 ± 1,43
<b>NE 1,5</b>	183 ± 12	186 ± 3	3,6x10 <sup>12</sup> ± 1,2x10 <sup>11</sup>	-19,43 ± 0,55	0,18 ± 0,01	98,29 ± 4,12

**Nota:** DLS – Espalhamento Dinâmico da Luz (em inglês – Dynamic Light Scattering); NTA – Análise por rastreamento de partículas (em inglês – Nanoparticle Tracking Analysis); Pdl – Índice de Polidispersão; %EE – Porcentagem de Eficiência de Encapsulação; NE 1,0 – NE-F-LapA 1,0 mg/mL; NE 1,5 – Nanoemulsão contendo F-LapA a 1,5 mg/mL.

Os valores encontrados para DM, índice de polidispersão e potencial zeta são semelhantes aos relatados por outros autores e aqueles apresentados no capítulo 1 dessa tese para a NE-LAP (LITZINGER et al., 1994; MIRANDA et al., 2019b; PATRAVALE; DANDEKAR; JAIN, 2012; RAI et al., 2018).

Com relação ao tamanho das partículas, o tamanho obtido (100 – 200 nm) é considerado ideal para administração endovenosa. Segundo Petros e DeSimone (2010), partículas com tamanho menor que 100 nm tendem a ser capturadas mais

facilmente pelos sinusóides esplênicos, enquanto partículas com tamanho superior a 200 nm são facilmente absorvidas pelo fígado (PETROS; DESIMONE, 2010).

O Pdl indica a homogeneidade da amostra, onde valores próximos a 1,0 indicam uma amostra totalmente heterogênea e dispersões com Pdl inferiores a 0,3 são considerados monodispersas (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; WU et al., 2011).

O Pdl também fornece informações sobre a estabilidade de nanoemulsão, pois sistemas mais polidispersos podem apresentar diferente solubilidade para cada glóbulo da dispersão (MASON et al., 2006; SINGH et al., 2017). Esta diferença na solubilidade pode acabar gerando maturação de Oswald, principal processo de deterioração em NE, quando pequenas partículas se fundem em partículas maiores (MEINDERS; VAN VLIET, 2004; SAFAYA; ROTLIWALA, 2020; TADROS et al., 2004).

O potencial zeta é outro parâmetro que fornece informações quanto a estabilidade baseada na repulsão/atração de cargas presente na superfície das nanopartículas em dispersão. Segundo alguns autores, carga superiores a 20mV, em módulo, indicam certa estabilidade da dispersão (HUNTER, 1981; MISHRA et al., 2019; RASMUSSEN; PEDERSEN; MARIE, 2020).

Outro aspecto interessante do sistema formado é a sua grande capacidade (100%) de encapsulação do F-LapA. Além disso, mesmo após a encapsulação do derivado, os parâmetros físico-químicos da NE se mantiveram estáveis e compatíveis com uma futura aplicação biológica. Portanto, este sistema se mostrou eficaz para encapsular o derivado, uma vez que é sabidamente uma ótima plataforma na encapsulação de substâncias pouco solúveis em água (LI et al., 2012).

O resultado de NTA está descrito a seguir na tabela 12 e seus valores representados graficamente na figura 21. É possível perceber que a maioria dos glóbulos estão

abaixo de 200 nm, e os valores médio de tamanho corroboram com aqueles encontrados pelo DLS.

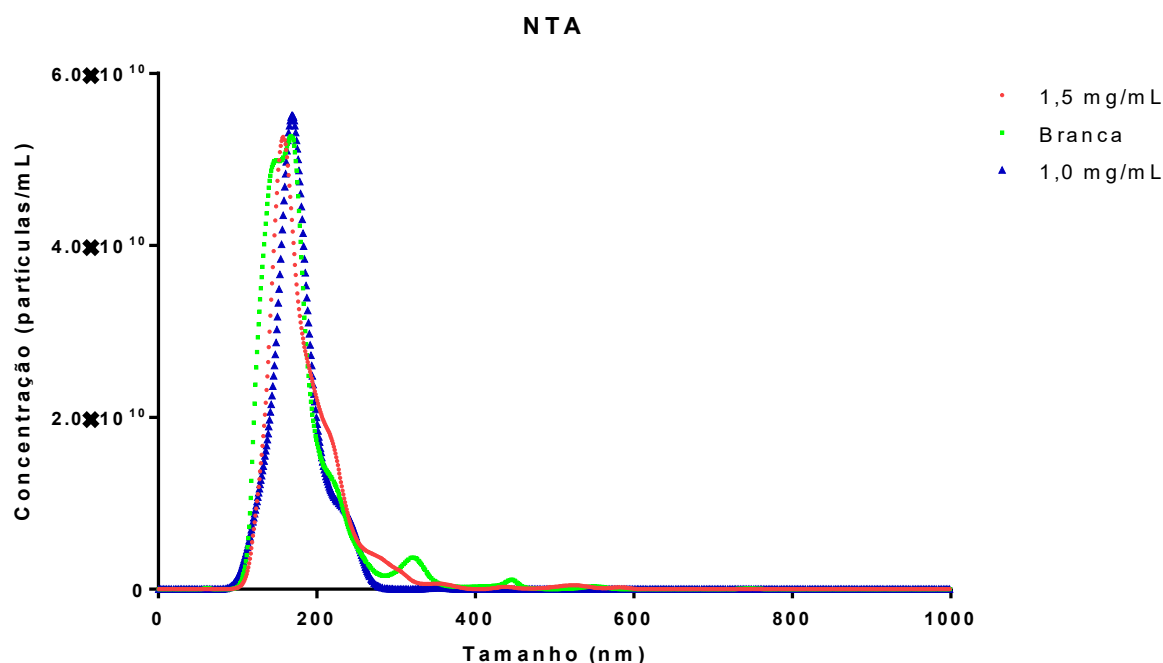
**Tabela 12 – Parâmetros físico-químicos obtidos por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).**

Parâmetros (nm)				
Formulação	Tamanho médio, nm	D10	D50	D90
<b>Branco</b>	180	131	164	237
<b>NE 1,0</b>	176	138	171	220
<b>NE 1,5</b>	186	140	171	243

**Nota:** D10 – Distribuição de tamanho de 10% da amostra; D50 – Distribuição de 50% da amostra; D90 – Distribuição de 90% da amostra; NE 1,0 – Nanoemulsão de F-LapA 1,0 mg/mL; NE 1,5 – Nanoemulsão de F-LapA 1,5 mg/mL.

O gráfico de distribuição de tamanho das NE avaliado pela técnica de NTA (**Figura 21**) estão em consonância com os dados na tabela e indicam uma distribuição uniforme dos nanoglóbulos, com sua maioria de tamanho inferior a 200nm. A ligeira diferença de tamanho encontrado entre as duas técnicas pode estar relacionado pela diferença de metodologia aplicada. Apesar das duas utilizarem espalhamento de luz e equação de Stokes-Einstein, no caso do DLS temos uma avaliação em massa, enquanto no caso do NTA temos avaliação partícula por partícula (FILIPPE; HAWE; JISKOOT, 2010).

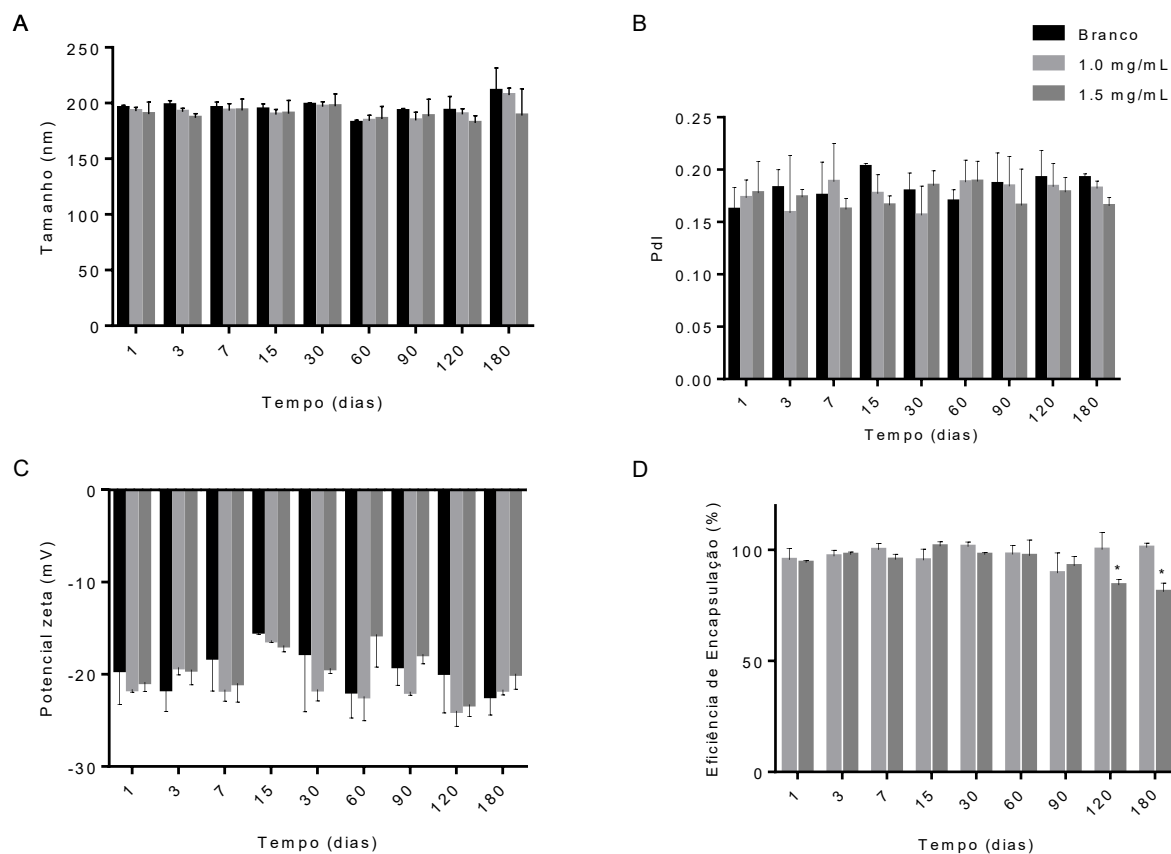
Figura 21 – Gráfico de dispersão de tamanho das NE pela técnica de NTA



#### 6.4.2 Estudo de estabilidade

Os dados referentes a estabilidade físico-química avaliada durante 180 dias estão dispostos na Figura 22. Não foi possível observar diferença significativa nos parâmetros avaliados (tamanho, Pdl ou potencial zeta) durante o período investigado. A eficiência de encapsulação do F-LapA na NE (concentração 1,5 mg/mL) apresentou redução do percentual encapsulado após 4 e 6 meses, liberando aproximadamente 15% e 20%, respectivamente. Por outro lado, a NE-FLapA de 1,0 mg/mL não apresentou diferença neste mesmo tempo.

**Figura 22 – Gráfico de estabilidade físico-químicas das NE NE-F-LapA em diversas concentrações por até 180 dias, armazenadas a 4°C A) Tamanho médio (nm); B) Índice de Polidispersão (Pdl); C) Potencial Zeta e D) Teor de Encapsulação (%).**

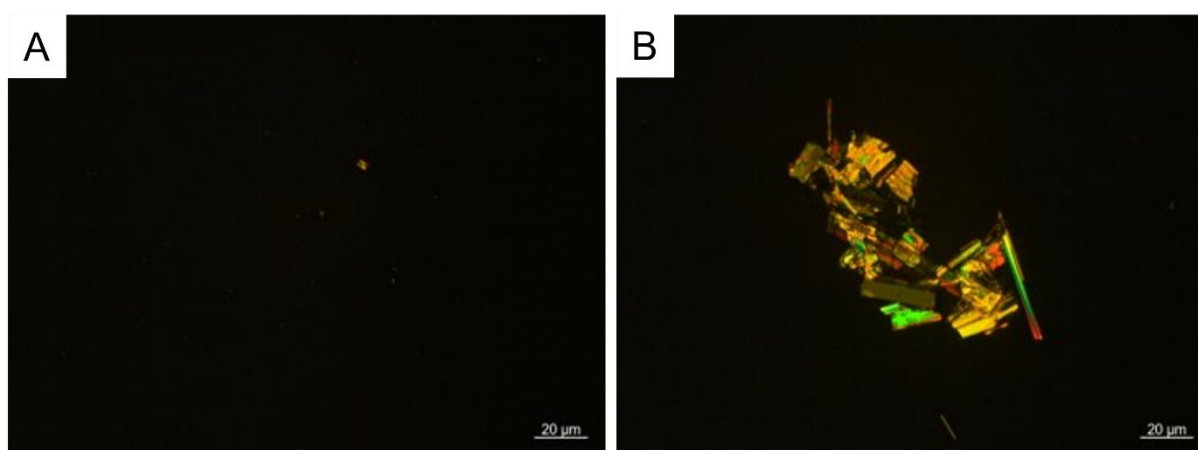


Apesar de nanoemulsão não ser considerado um sistema de grande modulação da entrega de fármacos, encontramos aqui uma formulação satisfatoriamente estável, com até 3 meses para a formulação de 1,5 mg/mL e até 6 meses para a formulação contendo 1,0 mg/mL do derivado L-fucosídico do LAP (TADROS et al., 2004). Este dado é importante pois demonstra a capacidade do sistema em reter o fármaco de forma estável, o que permite a sua administração em concentrações superiores às possíveis para o fármaco livre.

### 6.4.3 Microscopia de Luz Polarizada

A perda do conteúdo encapsulado foi também avaliada por microscopia de luz polarizada. Nesta técnica, o fármaco, pouco solúvel em água, quando expulso das nanoestruturas se organiza em cristais permitindo sua visualização ao microscópio. A figura 23, mostra imagens representativas de microscopias realizadas para as formulações nas concentrações 1,0 e 1,5 mg/mL após 4 meses do preparo.

**Figura 23 - Microscopia de luz polarizada mostrando presença ou ausência de cristais em amostras de NE-F-LapA após 4 meses de armazenamento. A) NE-F-LapA 1,0 mg/mL; B) NE-F-LapA 1,5 mg/mL.**



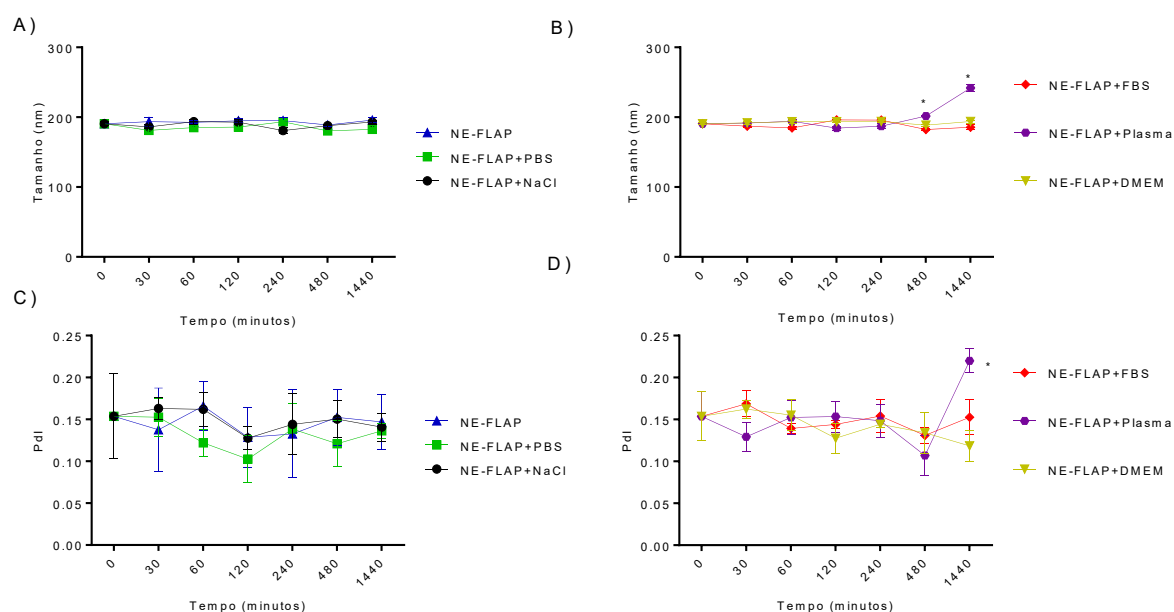
Pelas imagens se visualizou a presença de cristais prismáticos amarelo-esverdeados na microscopia da NE-F-LapA 1,5 mg/mL, confirmando o resultado encontrado no estudo de estabilidade onde houve liberação parcial do fármaco após quatro meses de armazenamento da NE a 4°C. Por outro lado, esses cristais não foram visualizados na NE-F-LapA 1,0 mg/mL.

### 6.4.4. Estabilidade em meios biológicos

Um dos pontos importantes a se avaliar para a administração de nanossistemas é o comportamento das partículas após administração *in vivo*, por isso realizamos a

avaliação do perfil de estabilidade em meios biológicos. Os dados DM e Pdl podem ser visualizados na Figura 24 e foram avaliados por até 24 horas após diluição da NE nos seguintes meios: salina (NaCl 0,9%), tampão fosfato (PBS), plasma murino, soro fetal bovino (SFB) e meio de cultura (DMEM).

**Figura 24 – Gráfico de estabilidade coloidal de NE-F-LapA em diversos meios biológicos diluídos quatro vezes. A) Avaliação de tamanho de NE-F-LAP 0,5 mg/mL; NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução fosfato tamponada (PBS pH 7,4). B) Avaliação de tamanho de NE-F-LAP 0,5 mg/mL em Soro Fetal Bovino (SFB); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em plasma murino. C) Avaliação do Índice de polidispersão (Pdl) de NE-F-LAP 0,5 mg/mL; NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução salina (NaCl 0,9%); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em solução fosfato tamponada (PBS pH 7,4). D) Avaliação do Índice de polidispersão (Pdl) de NE-F-LAP 0,5 mg/mL em Soro Fetal Bovino (SFB); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-F-LAP 0,5 mg/mL em plasma murino.**



As NE se mostraram estáveis frente a todos os meios testados em até 4 horas de incubação. No entanto, após 24 horas, foi observado ligeiro aumento no tamanho e Pdl das NE incubadas com plasma murino. Os demais meios testados não alteraram

os parâmetros avaliados mesmo após 24 horas de incubação. É importante salientar que mesmo havendo aumento nos parâmetros de DM e Pdl para a formulação incubada com plasma murino os valores obtidos após 24 horas de incubação (DM = 242 nm e Pdl = 0,22) ainda estão dentro das faixas aceitáveis para administração endovenosa, pois segundo a Farmacopeia Americana são aceitáveis para administração intravenosa formulações lipídicas de até 500 nm (CONVENTION, 2012; DRISCOLL, 2006).

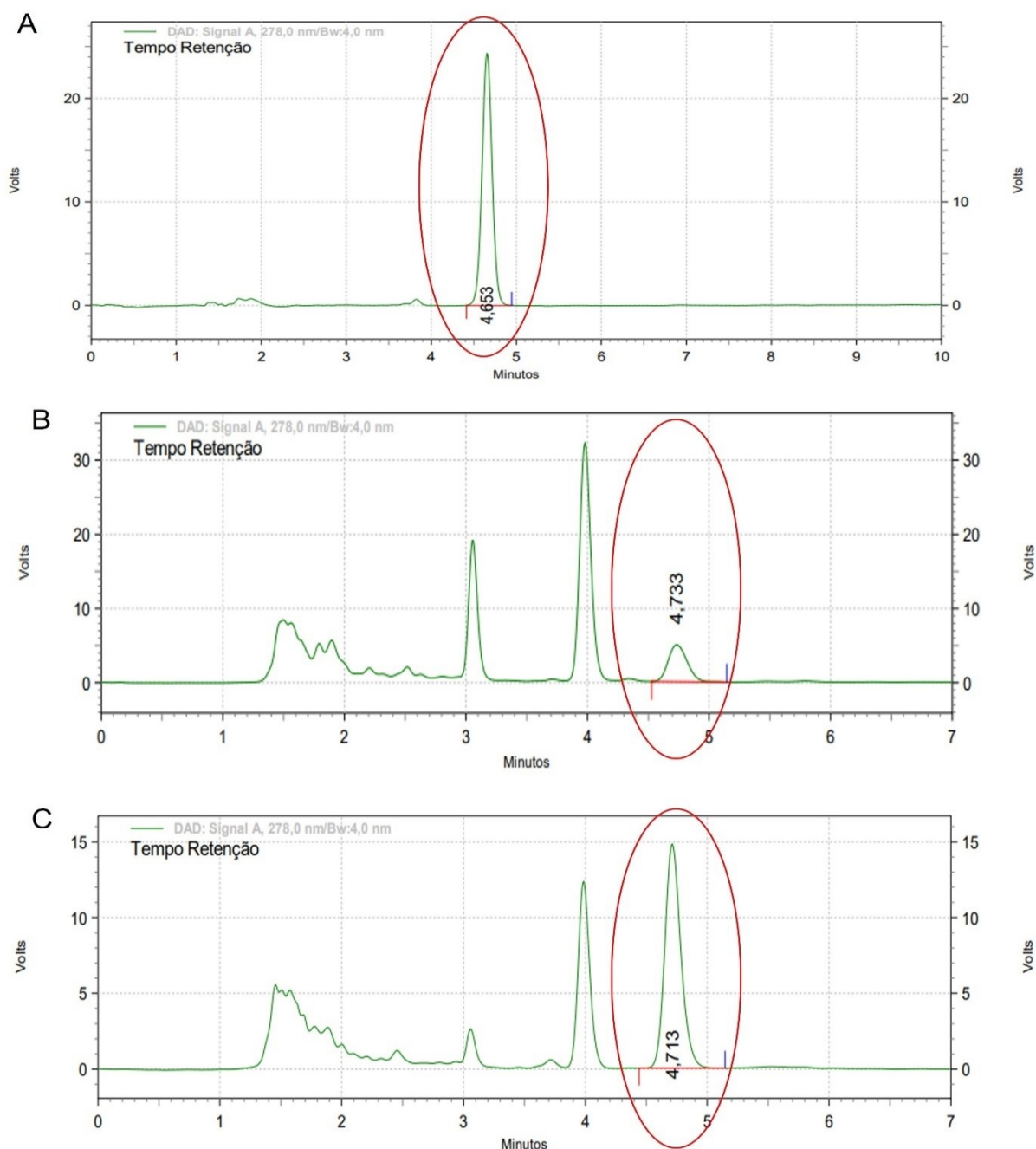
#### 6.4.5 Degradação

Com o objetivo de avaliar uma possível degradação do derivado F-LapA quando contato com o meio diluente ou meio de cultura foi realizada a análise por CLAE de alíquotas dos meios de diluição e cultura contendo uma quantidade conhecida do derivado. De fato, após incubação observou-se a presença de diferentes picos no cromatograma das amostras coletadas sugerindo degradação do derivado (**Figura 25**).

Não foram realizados estudos específicos para avaliar a composição dos compostos degradados, porém supõe-se que sejam: quebra por hidrólise com liberação de um ou mais grupos acetóxi.



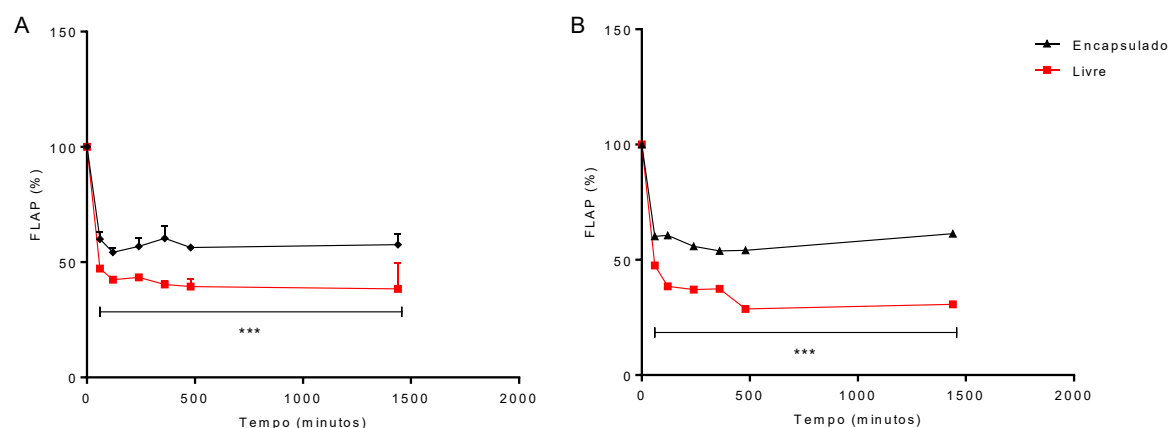
Figura 25 – Figura apresentando os cromatogramas indicando degradação do derivado em contato com meio diluente. (A) cromatograma do derivado puro; (B) cromatograma do derivado livre em meio diluente (diluição 10x) após 24 horas; (C) cromatograma do derivado encapsulado em meio diluente (diluição 10x) após 24 horas.



**Nota:** em destaque os picos referentes ao derivado, demais picos relacionados a degradação.

A Figura 26 representa o percentual remanescente do derivado (não degradado) após diluição nos meios testados. Com intuito de avaliar o potencial protetor da NE frente a degradação, foi testado também o perfil de degradação do derivado após encapsulado nesses sistemas. É possível verificar que houve diferença significativa entre o fármaco livre e encapsulado nos dois meios avaliados em todos os tempos analisados.

**Figura 26 – Gráfico de degradação do derivado L-fucosídico livre e encapsulado em NE. A Gráfico representando a degradação em meio diluente; B Gráfico representando a degradação em meio de cultura**



Esse resultado mostra a capacidade da nanoemulsão em proteger o fármaco de degradação, enzimática ou hidrólise. A habilidade de proteger contra degradação, enzimática ou hidrólise, é amplamente conhecida para NE e retratada em diversos trabalhos (DE CAMPOS; RICCI-JÚNIOR; MANSUR, 2012; RAHMAN et al., 2020). Esses dados confirmam a efetividade das NE como uma estratégia para aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água e/ou susceptíveis a degradação.

#### 6.4.6 Viabilidade celular

O estudo de citotoxicidade foi realizado frente duas linhagens tumorais (4T1 e MDA-MB-231) e uma linhagem saudável (Fibroblasto) e os valores  $CI_{50}$  e índice de seletividade estão apresentados na Tabela 13. Os dados mostram que a citotoxicidade é aproximadamente 4 vezes menor para o fármaco encapsulado que em comparação com o fármaco livre.

**Tabela 13 – Concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) de F-LapA livre e encapsulado em NE contra diversas linhagens celulares.**

Tratamento	4T1	MDA-MB-231	Fibroblasto	IS
<b>F-LapA</b>	8,15 ± 1,12 $\mu$ M	9,35 ± 0,92 $\mu$ M	30,61 ± 3,85 $\mu$ M	3,76
<b>NE-F-LapA</b>	2,80 ± 2,12 $\mu$ M	2,94 ± 1,35 $\mu$ M	31,74 ± 6,29 $\mu$ M	11,34

**Nota:** IS- índice de seletividade; F-LapA – derivado L-fucosídico do LAP; NE-F-LapA – nanoemulsão contendo o derivado L-fucosídico do LAP.

Os valores de citotoxicidade e seletividade encontrados são similares aos reportados para outros derivados do LAP, inclusive frente células tumorais de mama (COSTA, 2012; EPIFANO et al., 2014; FIORITO et al., 2014; KARAKAŞ et al., 2019). O índice de seletividade também foi de aproximadamente quatro vezes, o que aponta uma maior atividade do fármaco livre em células tumorais do que em células saudáveis. Segundo Indrayanto e Suhud um IS igual ou superior a 3 indicam uma classificação para uma amostra com potencial atividade antitumoral, enquanto isso IS igual ou superior a 10 é indicativo de amostra que deve ser investigada com testes mais específicos (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

Um carboidrato importante nas pesquisas de direcionamento ativo para células tumorais é a L-fucose, isto porque ele participa ativamente na adesão, progressão tumoral, invasão, e sinalização celular (KEELEY; YANG; LAU, 2019; LISTINSKY;

SIEGAL; LISTINSKY, 1998; YUAN et al., 2008). Por participar da sinalização de adesão e proliferação celular, inclusive no câncer de mama, a taxa de captação de L-fucose é alta indicando assim ser uma boa estratégia de direcionamento em tumores de mama (TU et al., 2017).

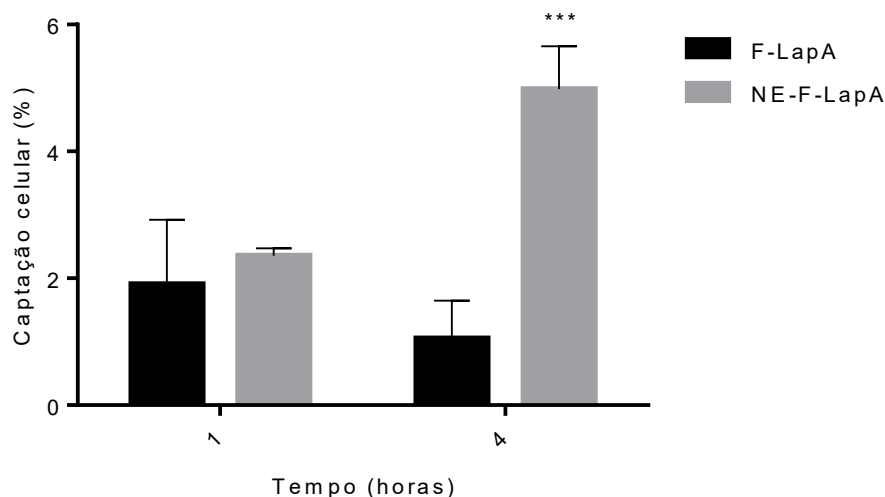
Já a atividade citotóxica do derivado é provavelmente devido à parte da estrutura correspondente ao LAP. Afinal, sabidamente, as naftoquinonas são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), e estes podem resultar em apoptose das células tratadas (COSTA, 2012; GOULART et al., 2003; KARAKAŞ et al., 2019; WANG et al., 2019).

Em células saudáveis, os mecanismos intracelulares são capazes de eliminar a produção de ERO enquanto nas células tumorais maiores concentrações são produzidas e os mecanismos de eliminação não são suficientes para manter as células vivas (NAKAMURA; TAKADA, 2021; SHAH; ROGOFF, 2021).

#### 6.4.7 Captação

Foi realizado também, estudo de captação em até 4 horas do F-LapA livre e NE-F-LapA em células de câncer de mama murino, linhagem 4T1. Os dados estão representados na Figura 27. Neste estudo foi possível visualizar que a NE-F-LapA foi capaz de aumentar em aproximadamente 5 vezes (4,98% do fármaco encapsulado contra 1% do derivado livre) a penetração do fármaco pelas células tumorais avaliadas.

**Figura 27 – Gráfico de captação celular do derivado L-fucosídico livre e encapsulado em NE em células da linhagem 4T1.**



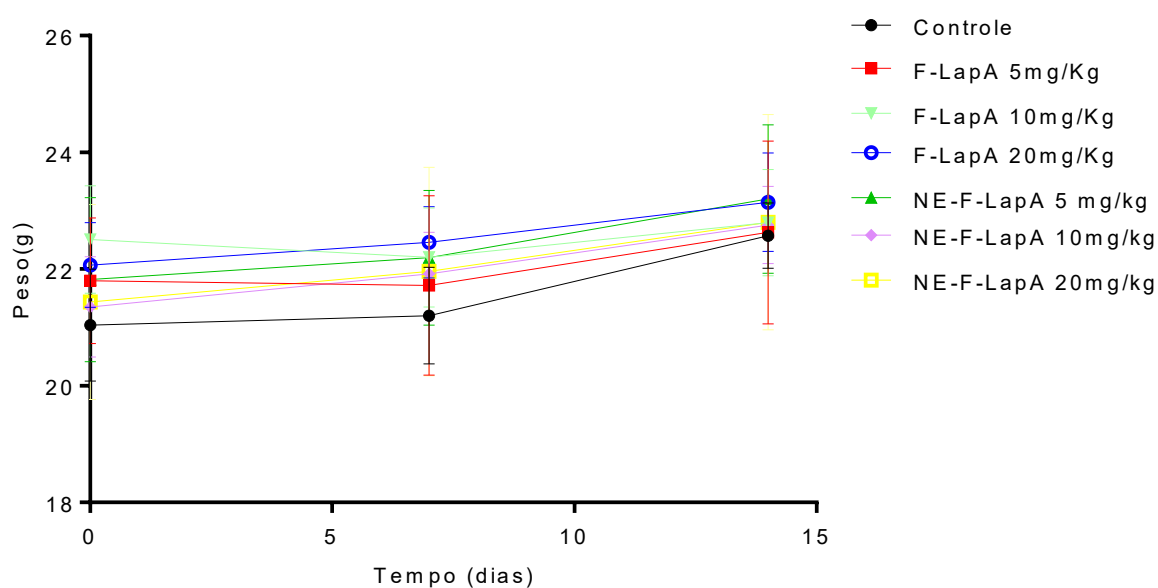
O estudo de captação demonstrou a capacidade da plataforma de entrega em realizar entrega de grandes quantidades de compostos pouco hidrossolúveis em comparação com o composto livre, essa característica é amplamente conhecida e associada com NE (FOFARIA et al., 2016; KIM; PENA; AUGUSTE, 2019; LOUREIRO et al., 2015). Provavelmente, essa grande capacidade de melhora na entrega do derivado esteja associada a capacidade das NE em se fundir às células entregando o fármaco associado a capacidade de proteção da degradação do composto livre em meio aquoso.

#### 6.4.8 Toxicidade Aguda

O estudo de toxicidade seguindo o protocolo da OECD, com algumas adaptações, não apresentou nenhum indício de toxicidade no regime de tratamento utilizado, mesmo em doses mais altas (OECD, 2001). A figura 28 mostra o acompanhamento do peso dos animais durante o estudo e nenhuma alteração significativa nos pesos dos animais tratados foi observada. Além disso, nenhum grupo apresentou indícios

de toxicidade avaliados visualmente como: piloereção, alteração comportamental ou diminuição do consumo de água ou ração.

**Figura 28 – Gráfico da variação do peso corporal em camundongos saudios após administração intravenosa de PBS-Tween 80 + 1% + 10% de PEG400 (grupo controle); solução tamponada de F-LapA e NE-LAP (5, 10 e 20 mg/Kg de F-LapA).**



Os dados dos parâmetros hematológicos, como indicativos de toxicidade, estão descritos na Tabela 14. Foi verificada diferença estatística apenas na contagem de plaquetas, porém com valores dentro da faixa de normalidade. Apesar dessa diferença, não foi possível observar nenhuma alteração com significado clínico como: hemorragias, perda de sangue nas fezes, hematomas e outros. As pequenas variações observadas podem ser em decorrência da formação de agregados de plaquetas, confirmados microscopicamente. Portanto, a presença de agregados de plaquetas em alguns dos animais avaliados, decorrente da técnica utilizada, pode ser a causa das variações plaquetárias observadas sem manifestação clínica (LIPPI; PLEBANI, 2012).

Uma das possíveis causas dessa pseudotrombocitopenia foi atribuída a utilização de EDTA, anticoagulante utilizado, com proporção inadequada (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2004). Como o preparo dos tubos contendo anticoagulante são realizados de forma manual e a quantidade de sangue coletado pode variar de animal para animal, a proporção ideal de anticoagulante:sangue (1 mL para 5 mL de sangue) pode estar alterada em algumas amostras.

**Tabela 14 – Parâmetros hematológicos de camundongos saudáveis após administração intravenosa de PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (controle); F-LapA e NE-F-LapA em diversas concentrações.**

	CTRL	F-LapA 5	NE-F-LapA 5	F-LapA 10	NE-F-LapA 10	F-LapA 20	NE-F-LapA 20
<b>Hm (cel/mm<sup>3</sup>x10<sup>3</sup>)</b>	6,18 ± 0,46	6,41 ± 0,14	6,47 ± 0,08	6,32 ± 0,22	6,72 ± 0,13	5,90 ± 1,87	6,15 ± 0,63
<b>Hb (g/L)</b>	13,25 ± 1,80	13,27 ± 0,97	13,35 ± 0,52	12,80 ± 0,61	13,86 ± 0,32	14,10 ± 0,20	11,77 ± 1,44
<b>Ht</b>	29,80 ± 2,59	30,85 ± 0,86	31,93 ± 0,48	31,03 ± 1,33	32,64 ± 0,50	30,17 ± 6,94	30,30 ± 3,10
<b>CTL (cel/mm<sup>3</sup>x10<sup>3</sup>)</b>	5,24 ± 1,49	4,27 ± 1,91	3,75 ± 0,65	4,40 ± 0,66	3,72 ± 0,33	5,37 ± 1,15	4,50 ± 0,17
<b>Neutrófilos (cel/mm<sup>3</sup>x10<sup>3</sup>)</b>	2,26 ± 1,25	1,85 ± 1,99	1,47 ± 0,31	1,43 ± 0,30	1,14 ± 0,34	1,67 ± 0,35	1,27 ± 0,12
<b>Linfócitos (cel/mm<sup>3</sup>x10<sup>3</sup>)</b>	2,98 ± 0,26	2,42 ± 0,24	2,28 ± 0,36	2,97 ± 0,51	2,52 ± 0,18	2,78 ± 1,96	3,23 ± 0,06
<b>CP</b>	392,67 ± 92,77	396,83 ± 91,71	346,50 ± 50,56*	314,50 ± 48,13*	413,80 ± 130,31	393,00 ± 13,53	279,67 ± 36,46*

**Notas:** CTRL – grupo controle; F-LapA 5 – grupo derivado L-fucosídico livre 5 mg/Kg; NE-F-LapA 5 – grupo derivado L-fucosídico encapsulado 5 mg/kg; F-LapA 10 – grupo derivado L-fucosídico livre 10 mg/Kg; NE-F-LapA 10 - grupo derivado L-fucosídico encapsulado 10 mg/Kg; F-LapA 20 – grupo derivado L-fucosídico livre 20 mg/Kg; NE-F-LapA 20 – grupo derivado L-fucosídico livre 20 mg/Kg; Hm – contagem total de hemácias; Hb – dosagem de hemoglobina; Ht – valor do hematócrito; CTL – contagem total de leucócitos; CP – contagem de plaquetas.



Além das avaliações hematológicas, foram feitas avaliações bioquímicas e de coagulação. Os resultados desses parâmetros estão dispostos na Tabela 15. Podemos observar que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros testados. O LAP não apresenta perfil de grande toxicidade, normalmente sendo relatados apenas náuseas, vômitos, anemia e aumento do tempo de protrombina.

Realizamos a avaliação da cascata de coagulação, vias extrínseca e intrínseca, por meio das dosagens de TP e TTPA, para avaliar possível toxicidade relacionada ao tratamento no grupo controle e maiores doses utilizadas. A utilização do LAP em estudos clínicos relatou aumento do tempo de protrombina, devido a sua semelhança com a vitamina K que possui importante função na ativação dos fatores de coagulação (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; BLOCK et al., 1974; FONSECA; BRAGA; SANTANA, 2003; HUSSAIN et al., 2007). Semelhante a atividade da Varfarina e outros anticoagulantes orais, o LAP compete com a vitamina K pelas enzimas quinona-redutase e epóxido-redutase, aumentando assim o tempo de coagulação, por diminuição da ativação dos fatores de coagulação (DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001; TELES; FUKUDA; FEDER, 2012; VRANCKX; VALGIMIGLI; HEIDBUCHEL, 2018).

Apesar do mecanismo conhecido, essa atividade só foi observada em doses altas de tratamento com LAP, 2 g/Kg/dia, dose 100 vezes maior a utilizada em nosso trabalho, por isso foram avaliados apenas nos grupos de maiores concentrações (BLOCK et al., 1974; HUSSAIN et al., 2007).

**Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos de camundongos saudáveis após administração intravenosa de PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (controle); F-LapA e NE-F-LapA em diversas concentrações.**

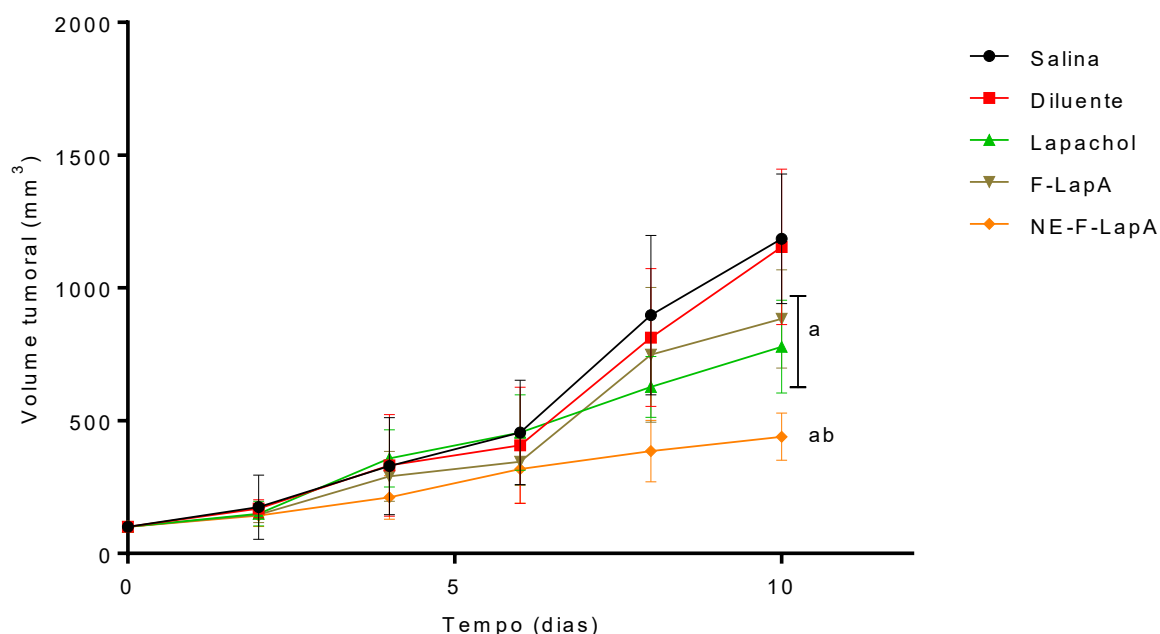
	<b>CTRL</b>	<b>F-LapA 5</b>	<b>NE-F-LapA 5</b>	<b>F-LapA 10</b>	<b>NE-F-LapA 10</b>	<b>F-LapA 20</b>	<b>NE-F-LapA 20</b>
<b>AST</b>	93,58 ± 12,33	104,33 ± 5,26	103,03 ± 3,5	104,75 ± 22,59	107,73 ± 12,38	91,70 ± 12,41	90,79 ± 10,90
<b>ALT</b>	34,22 ± 3,17	39,50 ± 4,05	30,56 ± 3,11	33,18 ± 4,04	37,54 ± 6,46	51,90 ± 5,93	31,43 ± 4,62
<b>Ureia</b>	42,56 ± 10,73	46,35 ± 9,12	41,57 ± 7,47	35,68 ± 2,34	45,53 ± 5,234	56,50 ± 13,44	52,32 ± 3,35
<b>Creatinina</b>	0,53 ± 0,16	0,68 ± 0,12	0,53 ± 0,19	0,45 ± 0,09	0,66 ± 0,20	0,40 ± 0,09	0,33 ± 0,08
<b>TP</b>	16,15 ± 5,45	–	–	–	–	11,77 ± 8,87	19,8 ± 8,66
<b>TTPA</b>	38,15 ± 2,33	–	–	–	–	50,95 ± 4,60	42,4 ± 4,56

**Notas:** CTRL – grupo controle; F-LapA 5 – grupo derivado L-fucosídico livre 5 mg/Kg; NE-F-LapA 5 – grupo derivado L-fucosídico encapsulado 5 mg/kg; F-LapA 10 – grupo derivado L-fucosídico livre 10 mg/Kg; NE-F-LapA 10 - grupo derivado L-fucosídico encapsulado 10 mg/Kg; F-LapA 20 – grupo derivado L-fucosídico livre 20 mg/Kg; NE-F-LapA 20 – grupo derivado L-fucosídico livre 20 mg/Kg; ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase, TP – Tempo de protrombina; TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada.

#### 6.4.9 Atividade Antitumoral

O estudo de atividade antitumoral foi realizado em modelo animal de câncer de mama murino e os dados de variação do volume tumoral em função do tempo para os diferentes tratamentos estão representados na Figura 29. Observa-se que o derivado L-fucosídico encapsulado em NE apresentou melhor capacidade de controlar o crescimento tumoral quando comparado com o LAP e o derivado não encapsulado.

**Figura 29 – Gráfico de atividade antitumoral no crescimento de camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1. Cada tratamento foi realizado por via intravenosa administrado cinco vezes, de dois em dois dias, a uma dose de 10 mg/kg/dia. Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média. As curvas de crescimento foram analisadas por ANOVA unidireccional, seguida do teste de Tukey. a - Representa a diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos e Grupo controle. b - Representa a diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em comparação com os grupos LAP e F-LapA.**



Os grupos, salina e diluente apresentaram perfil semelhante, mostrando que os diluentes, usados para solubilizar os compostos na forma livre, não apresentam

atividade antitumoral relevante. Com um perfil intermediário de atividade temos o grupo tratado com derivado não encapsulado e o grupo tratado com LAP, essa atividade semelhante pode ser atribuída a degradação do derivado, que provavelmente, libera o LAP no meio resultando em uma atividade similar. Apesar da dose ser menor, aproximadamente metade, a atividade proposta é pelo arcabouço de naftoquinona (LAP) o que geraria ERO, e essa parte teria aproximadamente metade da massa do derivado. Além do volume tumoral, avaliamos ainda a eficácia dos tratamentos por meio do cálculo do volume tumoral relativo e inibição de crescimento (Tabela 16).

**Tabela 16 – Volume Tumoral Relativo (VTR) e Inibição do Crescimento (IC) após administração de Salina (controle), PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (diluyente); LAP; F-LapA e NE-F-LapA.**

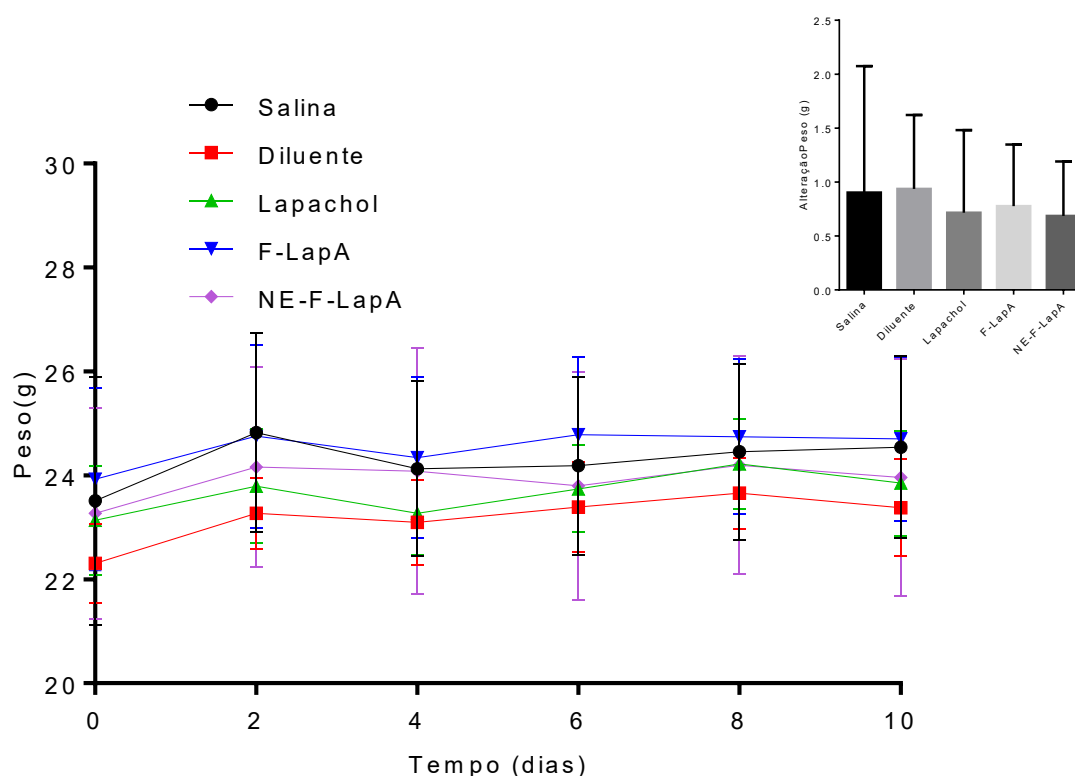
	VTR	IC
Salina	11,27	
Diluyente	11,54	–
LAP	8,26	26,74
F-LapA	8,73	22,51
NE-F-LapA	5,06	55,13

Pelos resultados é possível visualizar que houve um melhor controle do crescimento, em aproximadamente 50%, do grupo tratado com a derivado encapsulado em NE em comparação com o grupo controle, ou diluyente. A melhor atividade pode ser dada pelo aumento da captação e diminuição da degradação, a combinação destes fatores pode aumentar a entrada do fármaco nas células mantendo sua estrutura química o que pode aumentar a sua atividade no sítio alvo (HAN et al., 2009; ZHAO et al., 2013).

Durante o estudo de atividade antitumoral realizou-se uma análise preliminar de toxicidade por meio de parâmetros como peso dos animais, análises bioquímicas e

histopatológicas. A variação do peso dos animais ao longo do tratamento está representada na figura 30.

**Figura 30 – Variação do peso corporal de ratos portadores de tumor 4T1 após administração intravenosa de Salina, Diluente (PBS; 1% de Tween 80 e 10% de PEG 400); solução tamponada de LAP, Solução tamponada de F-LapA e NE-F-LapA. Insert: Alteração de peso corporal dos camundongos comparando o último dia com o primeiro dia do tratamento.**



Pode-se observar que não houve perda de peso durante o tratamento o que indica baixa ou nenhuma toxicidade para todos os grupos avaliados. Quando um tratamento é tóxico, uma das principais alterações está relacionada com a perda de peso dos animais avaliados (NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2021; OECD, 2001). Porém, quando avaliados os pesos finais em comparação com o peso inicial, percebe-se que todos os grupos apresentaram um ligeiro ganho de peso (inserto Figura 29), sugerindo a ausência de toxicidade dos tratamentos no regime proposto.

Para as análises bioquímicas e de coagulação, os resultados estão expressos na tabela 17. De maneira similar ao estudo de toxicidade aguda, não foi observada nenhuma alteração indicativa de toxicidade renal, hepática ou de coagulação. Como comentado anteriormente, o LAP não apresentou grandes indícios de toxicidade renal ou hepática ao longo dos testes clínicos realizados. Adicionalmente, vale destacar também que o meio diluente também se mostrou não tóxico durante os ensaios realizados.

**Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos de camundongos portadores de tumor de mama 4T1 após administração intravenosa de salina (controle); PBS + 1% de Tween 80 + 10% de PEG400 (diluente); F-LapA e NE-F-LapA em diversas concentrações.**

	CTRL	Diluente	Lap	F-LapA	NE-F-LapA
<b>AST</b>	92,25 ± 4,12	116,40 ± 14,77	128,78 ± 17,33	120 ± 23,93	107,61 ± 16,50
<b>ALT</b>	23,28 ± 2,81	22,41 ± 2,52	25,32 ± 1,59	23,35 ± 6,15	26,41 ± 5,40
<b>Ureia</b>	49,77 ± 12,90	33,54 ± 0,63	43,62 ± 5,42	39,92 ± 7,72	43,89 ± 8,87
<b>Creatinina</b>	0,43 ± 0,13	0,45 ± 0,05	0,58 ± 0,10	0,36 ± 0,03	0,44 ± 0,05
<b>TP</b>	9,40 ± 0,56	11,17 ± 0,47	15,17 ± 4,05	12,10 ± 0,57	12,40 ± 1,86
<b>TTPA</b>	32,75 ± 4,17	44,25 ± 15,47	38,20 ± 11,74	34,88 ± 3,91	40,17 ± 10,00

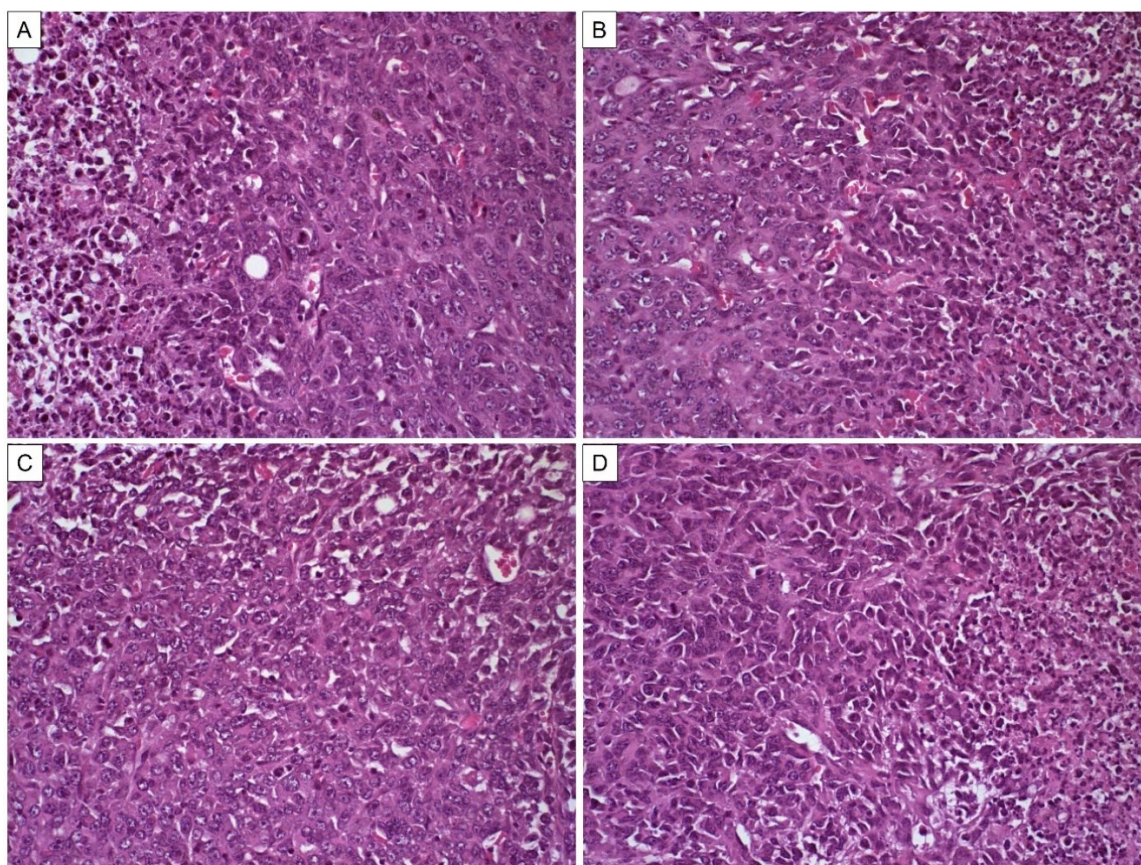
**Notas:** CTRL – grupo controle (NaCl 0,9%); Diluente – grupo solução diluente (PBS + 1% Tween 80 + 10% PEG 400) Lap – grupo LAP em solução PBS + 1% Tween 80 (5 mg/kg); F-LapA – grupo derivado L-fucosídico livre (10 mg/Kg); NE-F-LapA - grupo derivado L-fucosídico encapsulado (20 mg/Kg); ALT – Alanina Aminotransferase; AST – Aspartato Aminotransferase, TP – Tempo de protrombina; TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada.

#### 6.4.10 Avaliação histopatológica

##### 6.4.10.1 Histologia tumoral

A Figura 31 mostra seções de tecido tumoral de animais recebendo diferentes tratamentos. Para o grupo controle, foram observadas massas sólidas nas quais estavam presentes células epiteliais características do modelo de tumor 4T1. Para todos os grupos foram encontrados grande área de necrose, com várias figuras de mitose e pouco estroma.

**Figura 31 – Secções histológicas de tumor de camundongos BALB/C femininos portadores de tumor mamário tratados com Salina (controle), LAP, F-LapA e NE-F-LapA obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle; B) LAP; C) F-LapA; D) NE-F-LapA. Amplificação de 40x.**



Os tumores dos animais tratados com a NE-FLapA apresentaram áreas de necrose mais intensas que os demais grupos avaliados. Essa informação corroborou os dados obtidos para alterações no volume tumoral e no índice de inibição do crescimento, que indicaram maior eficácia da formulação em relação ao fármaco livre

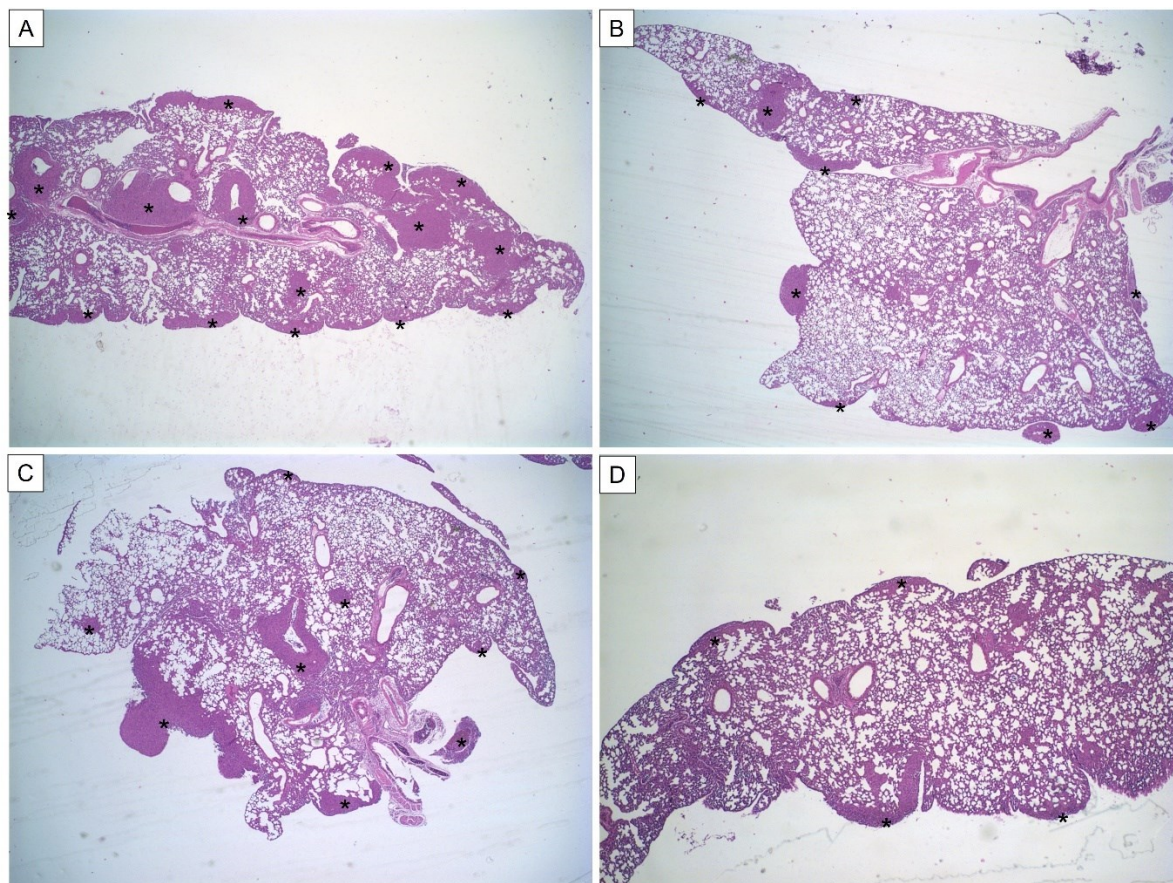
#### 6.4.10.2 Avaliação histológica de pulmão e fígado

O modelo experimental 4T1 é conhecido por ser altamente metastático, com grande número de metástases pulmonares aparecendo aproximadamente 18 dias após a inoculação celular (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000; YANG et al., 2020). Assim, este modelo permite avaliar não só a atividade antitumoral contra tumores primários, mas também o controle da disseminação de células tumorais com implantação em outros sítios. As seções histológicas do tecido pulmonar são mostradas na Figura 32.



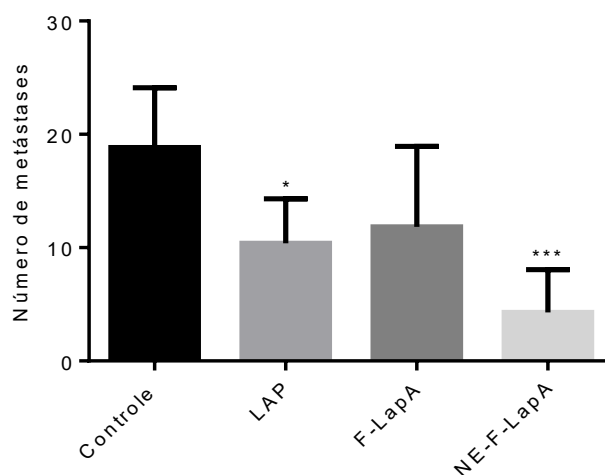
Figura 32 – Secções histológicas de pulmão de camundongos BALB/C femininos portadores de tumor mamário tratados com Salina (controle), LAP, F-LapA e NE-F-LapA obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle; B) LAP; C) F-LapA; D) NE-F-LapA. Amplificação de 2x.

Asteriscos indicam presença de metástases.



A presença de metástases, avaliadas utilizando microscópio ótico, foi observada em todos os grupos e os dados estão expressos na Figura 33. É possível observar que o número de metástases diminuiu consideravelmente para dos grupos LAP e F-LapA livres e NE-F-LapA em comparação com o grupo controle. O grupo que utilizou o LAP, obteve melhor controle de metástases em comparação com o derivado, provavelmente pela degradação sofrida pelo F-LapA.

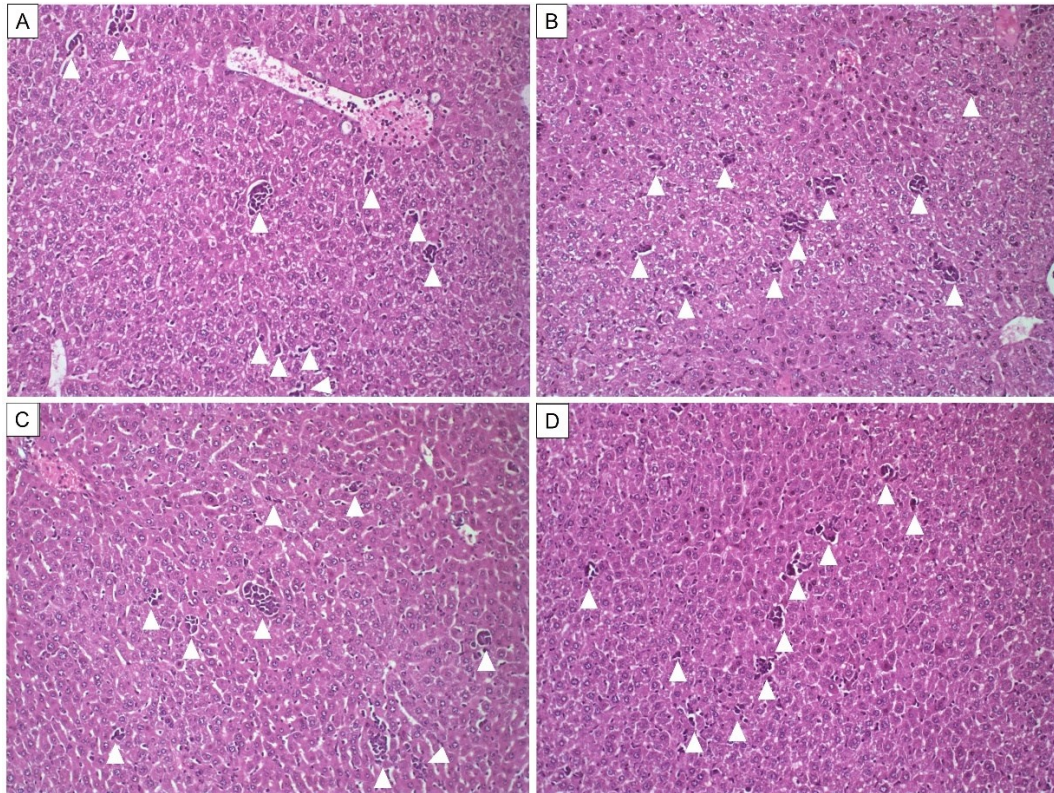
**Figura 33 – Gráfico contendo o número de metástases contadas para cada grupo. (\* Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ); \*\*\* Representa diferença estatística em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).**



Alguns trabalhos já relataram a capacidade do LAP em diminuir metástases, como possivelmente a atividade antitumoral é derivada principalmente da estrutura química, era esperado que essa atividade se mantivesse após administração do derivado (BALASSIANO et al., 2005; COSTA et al., 2016; MAEDA et al., 2008).

As imagens histopatológicas hepáticas estão apresentadas na imagem 34, e todos os grupos avaliados apresentaram características metastáticas semelhantes com pontos multifocais, com poucas alterações teciduais.

**Figura 34 – Secções histológicas de fígado de camundongos BALB/C femininos portadores de tumor mamário tratados com Salina (controle), LAP, F-LapA e NE-F-LapA obtidos e corados por Hematoxilina & Eosina. A) Controle; B) LAP; C) F-LapA; D) NE-F-LapA. Amplificação de 20x. Cabeças de seta indicam presença de metástases.**



## 6.5 Conclusão

Neste trabalho foi possível encapsular de forma eficiente o derivado F-LapA em NE do tipo óleo em água. Os glóbulos formados apresentaram características físico-químicas adequadas para estudos *in vivo* e alta estabilidade em diferentes meios biológicos. As NE foram ainda capazes de proteger o derivado de degradação viabilizando os estudos subsequentes em células e modelos animais.

A encapsulação foi capaz de aumentar a captação celular que resultou em um incremento da atividade citotóxica e do índice de seletividade do derivado L-fucosídico. Os testes *in vivo* não apresentaram indícios de toxicidade aguda, avaliados até 20 mg/kg. Não foram observados indícios de toxicidade, como diminuição do peso, alteração de marcadores bioquímicos, hematológicos ou de coagulação.

O tratamento antitumoral utilizando as NE apresentou melhor controle do crescimento tumoral em comparação ao fármaco livre com redução do volume tumoral relativo, e aumento do índice de inibição de crescimento. Portanto, o sistema apresenta características promissoras para o tratamento de tumores de mama.



## 7 CONCLUSÃO GERAL

O LAP já foi amplamente estudado para tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer. Mostrou-se possível realizar a encapsulação do LAP em NE do tipo óleo em água, com estabilidade físico-química, atividade citotóxica contra células tumorais de mama. A encapsulação em NE foi capaz de aumentar a meia-vida do fármaco e contribuindo para uma maior captação no tecido tumoral. Além disso, o nanossistema ainda se mostrou capaz de controlar o crescimento tumoral sem indícios de toxicidade. Assim, neste trabalho consegue-se comprovar a atividade antitumoral do LAP em modelo experimental de mama murino, porém com baixa estabilidade (apenas trinta dias) da plataforma utilizada.

A NE-LAP apresentou bons resultados, porém sua estabilidade de apenas um mês e encapsulação de 0,5 mg/mL do composto, indica a necessidade da busca de melhorias na formulação. A incorporação de maior quantidade de compostos com atividade antitumoral, maior prazo de estabilidade e possível diminuição de efeitos colaterais associados ao LAP.

O derivado L-fucosídico do LAP apresentou atividade citotóxica em linhagem tumoral de mama importante, mostrando um grande potencial de tratamento antitumoral que ainda pode ser melhorado utilizando técnicas de entrega de medicamentos. Assim, realizou-se a encapsulação do derivado L-fucosídico em NE que apresentaram características físico-químicas adequadas, estabilidade físico-química de aproximadamente 4 meses e capacidade de proteger o fármaco de degradação em meio biológico.

Além disso, o nanossistema foi capaz de aumentar a captação do fármaco por células tumorais, aumentar o índice de seletividade para células tumorais em comparação

com células saudáveis além de controlar o crescimento tumoral sem toxicidade aparente.

Outro importante achado foi a capacidade do derivado encapsulado em diminuir o número de metástases pulmonares quando comparado com o grupo controle e fármaco livre.

## 8 PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados demonstram um grande potencial das NE contendo F-LAP encapsulado, permitindo sua utilização como plataforma anticâncer. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos para conhecer o potencial do sistema proposto:

- Estudos mais sensíveis de toxicidade relacionados a coagulação com o intuito de verificar o desaparecimento da toxicidade em doses mais altas;
- Estudo *in vitro* da produção de ERO's induzidos pelo tratamento;
- Avaliação dos mecanismos de atividade associados ao LAP e seu derivado;
- Avaliação dos produtos de degradação e suas interferências nas atividades biológicas;
- Testes em outras células tumorais para avaliação da capacidade da plataforma em demais modelos de tumores.

## REFERÊNCIAS

AHMED, S.; REHMAN, S. U.; TABISH, M. Cancer nanomedicine: A step towards improving the drug delivery and enhanced efficacy of chemotherapeutic drugs. **OpenNano**, v. 7, p. 100051, jul. 2022.

AL-MAHMOOD, S. et al. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 5, p. 1483–1507, 5 out. 2018.

ALMEIDA, V. L. DE et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, fev. 2005.

AMIN, K.; DANNENFELSER, R.-M. In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p. 1173–1176, 1 jun. 2006.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 166. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166**, 2017.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57–59, 2002.

BALASSIANO, I. T. et al. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology Reports**, v. 13, n. 2, p. 329–333, fev. 2005.

BAO, G.; MITRAGOTRI, S.; TONG, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 15, n. 1, p. 253–282, 11 jul. 2013a.



BAO, G.; MITRAGOTRI, S.; TONG, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 15, n. 1, p. 253–282, 11 jul. 2013b.

BARZAMAN, K. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, p. 106535, jul. 2020.

BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2–25, fev. 2014.

BLAKNEY, A. K.; IP, S.; GEALL, A. J. An Update on Self-Amplifying mRNA Vaccine Development. **Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 97, 28 jan. 2021.

BLOCK, J. B. et al. Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer chemotherapy reports. Part 2**, v. 4, n. 4, p. 27–8, dez. 1974.

BRASIL, M. DA S. **ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 6. ed. Rio de Janeiro: (INCA), Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL, M. DA S.; INCA. **Estimativa 2023 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

BRASILEIRO-FILHO, G. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. Em: **Bogliolo Patologia**. 7. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2006. v. 19p. 175–236.

BRUSCHI, M. L. **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. Cambridge: Elsevier, 2015.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Characterization of mucin – lipid droplet interactions: Influence on potential fate of fish oil-in-water emulsions under simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 425–433, 1 maio 2016.

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast Disease**, v. 32, n. 1–2, p. 35–48, 2010.

CHEN, Q. et al. Development of long-circulating lapachol nanoparticles: formation, characterization, pharmacokinetics, distribution and cytotoxicity. **RSC Advances**, v. 10, n. 50, p. 30025–30034, 2020.

CHO, K. et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 1 mar. 2008.

CHOUDHURY, H. et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Features of Nanoemulsion Following Oral, Intravenous, Topical and Nasal Route. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 17, 3 jul. 2017.

CIENFUEGOS, F. **Estatística Aplicada ao Laboratório**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.

CONVENTION, T. U. S. P. GLOBULE SIZE DISTRIBUTION IN LIPID INJECTABLE EMULSIONS - USP32-NF27. n. c, p. 2011–2013, 2012.

CONVENTION, T. U. S. P. **The United States Pharmacopeia: USP 41 : The National Formulary: NF 36**. 34th. ed. Rockville: Rockville, Md.The United States Pharmacopeial Convention, 2018.

CORBETT, K. S. et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Development Enabled by Prototype Pathogen Preparedness. **bioRxiv**, p. 2020.06.11.145920, 11 jun. 2020.

COSTA, A. DE M. **Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogas do lapachol**. Dissertação—[s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2012.

COSTA, M. P. et al. Controlled release of nor- $\beta$ -lapachone by PLGA microparticles: A strategy for improving cytotoxicity against prostate cancer cells. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 873, 1 jul. 2016.

DA LINARDI, M. C. F.; DE OLIVEIRA, M. M.; SAMPAIO, M. R. P. A Lapachol Derivative Active against Mouse Lymphocytic Leukemia P-388. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1159–1161, 1 nov. 1975.

DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. DO C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 183–188, 2012.

DAVIS, S. S. Pharmaceutical aspects of intravenous fat emulsions. **J. Hosp. Pharm.**, v. September, p. 165–171, 1974.

DE CAMPOS, V. E. B.; RICCI-JÚNIOR, E.; MANSUR, C. R. E. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 3, p. 2881–2890, 2012.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133, 2008.

DEKIĆ, L.; PRIMORAC, M. Microemulsions and Nanoemulsions as Carriers for Delivery of NSAIDs. Em: **Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 69–94.

DETSI, A. et al. Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 7, p. 1–68, 16 jul. 2020.

DÔRES, S. M. C. DAS; PAIVA, S. A. R. DE; CAMPANA, Á. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 3, p. 207–218, dez. 2001.

DRISCOLL, D. F. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 9, p. 1959–1969, 9 ago. 2006.

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, 15 mar. 2006.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Pseudotrombocitopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, out. 2004.

EMA, E. M. A. European Medicines Agency: An unacceptable choice. Em: **Prescrire International**. 1. ed. London, UK: [s.n.]. v. 20p. 278.

EPIFANO, F. et al. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 37–49, 13 mar. 2014.

ESTEVEES-SOUZA, A. et al. Antitumoral activity of new polyamine-naphthoquinone conjugates. **Oncology reports**, v. 20, n. 1, p. 225–31, jul. 2008.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Information for the package leaflet regarding polysorbates used as excipients in medicinal products for human use. **European medicines agency. Committee for Medicinal Products for Human Use.**, v. 44, n. November, p. 1–14, 2018.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Status of EMEA Scientific Guidelines and European Pharmacopoeia Monographs and Chapters in the Regulatory Framework Applicable to Medicinal Products. **Emea/42371/2008**, n. September, p. 2–4, 2008.

EYONG, K. O. et al. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 20, p. 5387–5390, 15 out. 2008.

FERLAY, J. et al. Global cancer observatory: cancer today. **International Agency for Research on Cancer**, p. Available from <https://gco.iarc.fr/today>, 2020.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FERNANDES, R. S. et al. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. **Nuclear Medicine Communications**, v. 37, n. 3, p. 307–312, 1 jul. 2016.

FERREIRA, V. 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, 18 jun. 2016.

FILIFE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 4 maio 2010.

FIORITO, S. et al. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 2, p. 454–457, 15 jan. 2014.

FOFARIA, N. M. et al. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine— Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, n. 1–2, p. 12–22, 10 fev. 2016.

FONSECA, S. G. C. et al. Validation of the analytical methodology for evaluation of lapachol in solution by HPLC. **Quimica Nova**, v. 27, n. 1, p. 157–159, 2004.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol-Chemistry, pharmacology and assay methods. **Rev Bras Farm**, v. 84, n. 1, p. 9–16, 2003.

FRAGUAS-SÁNCHEZ, A. I.; LOZZA, I.; TORRES-SUÁREZ, A. I. Actively Targeted Nanomedicines in Breast Cancer: From Pre-Clinical Investigation to Clinic. **Cancers**, v. 14, n. 5, p. 1198, 25 fev. 2022.

FRANCO, M. K. K. D. et al. X-Ray Scattering Techniques Applied in the Development of Drug Delivery Systems. Em: **X-ray Scattering**. [s.l.] InTech, 2017.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577–5591, 2012.

FURRUKH, M.; QURESHI, A. Treatment Of Breast Cancer; Review And Updates. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC**, v. 30, 18 abr. 2018.

GODSEY, M. E.; SURYAPRAKASH, S.; LEONG, K. W. Materials innovation for co-delivery of diverse therapeutic cargos. **RSC Advances**, v. 3, n. 47, p. 24794, 2013.

GOULART, M. O. F. et al. Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. **Bioelectrochemistry**, v. 59, n. 1–2, p. 85–87, 2003.

GRYNKIEWICZ, G.; SZEJA, W.; BORYSKI, J. Synthetic analogs of natural glycosides in drug discovery and development. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 65, n. 6, p. 655–676, 2008.

GUERRA, M. et al. TOXICOLOGY OF LAPACHOL IN RATS: EMBRYOLETHALITY. **Rev. Brasil. Biol**, v. 61, n. 1, p. 171–174, [s.d.].

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, mar. 2017.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57–64, 1 jan. 2008.

HAN, M. et al. A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 4, p. 926–935, abr. 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HARSHITA et al. Lipid-Based Nanosystem As Intelligent Carriers for Versatile Drug Delivery Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 11, p. 1167–1180, 24 abr. 2020.

HORNBERG, J. J. et al. **Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24368175/>>. Acesso em: 28 set. 2020

HOWLADER, N. et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 5, maio 2014.

HUNTER, R. J. Charge and Potential Distribution at Interfaces. **Zeta Potential in Colloid Science**, p. 11–58, 1 jan. 1981.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: An overview. **Arkivoc**, v. 2007, n. 2, p. 145, 23 ago. 2007.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. **Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research(1997-2016). Expert Opinion on Therapeutic Patents** Taylor and Francis Ltd, , 3 out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28586252/>>. Acesso em: 12 ago. 2020

JAHANGIRIAN, H. et al. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: Green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957–2978, 12 abr. 2017.

JAIN, K. K. Nanobiotechnology and personalized medicine. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l: s.n.]. v. 104p. 325–354.



JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 8 abr. 2015.

JUNIOR, E. DA S. et al. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. **Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas**, v. 14, n. 1, p. 115–122, 2013.

KAELIN, W. G. The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 689–698, 19 set. 2005.

KANDIOLLER, W. et al. Organometallic anticancer complexes of lapachol: Metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. **Chemical Communications**, v. 49, n. 32, p. 3348–3350, 26 mar. 2013.

KARAKAŞ, D. et al. A novel 1,4-naphthoquinone-derived compound induces apoptotic cell death in breast cancer cells. **Turkish Journal of Biology**, v. 43, n. 4, p. 256–263, 2019.

KATSURA, C. et al. Breast cancer: presentation, investigation and management. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 83, n. 2, p. 1–7, 2 fev. 2022.

KAU, P. et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. **BMC Cancer**, v. 12, 27 mar. 2012.

KEELEY, T. S.; YANG, S.; LAU, E. The diverse contributions of fucose linkages in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1241, 24 ago. 2019.

KIM, B.; PENA, C. D.; AUGUSTE, D. T. Targeted Lipid Nanoemulsions Encapsulating Epigenetic Drugs Exhibit Selective Cytotoxicity on CDH1-/FOXM1+ Triple Negative

Breast Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 16, n. 5, p. 1813–1826, 6 maio 2019.

KOPECKOVA, K. et al. Nanodrugs used in cancer therapy. **Biomedical Papers**, v. 163, n. 2, p. 122–131, 25 jun. 2019.

KOURNIATIS, L. R. et al. Orange oil/water nanoemulsions prepared by high pressure homogenizer. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 295–300, 2010.

KRAFT, J. C. et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 29–52, jan. 2014.

KUMAR, M. et al. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 225–234, set. 2019.

LECOEUR, H. et al. Chapter Three Analysis of Apoptotic Pathways by Multiparametric Flow Cytometry: Application to HIV Infection. **Methods in Enzymology**, v. 442, p. 51–82, 1 jan. 2008.

LECOEUR, H.; PRÉVOST, M. C.; GOUGEON, M. L. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: A reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p. 65–72, 2001.

LEITE, E. A. et al. Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5259–5269, out. 2012.

LI, Y. et al. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 517–528, 1 jun. 2012.

LIPPI, G.; PLEBANI, M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 8, 1 jan. 2012.

LISTINSKY, J. J.; SIEGAL, G. P.; LISTINSKY, C. M. A potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 110, n. 4, p. 425–440, out. 1998.

LITZINGER, D. C. et al. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. **BBA - Biomembranes**, v. 1190, n. 1, p. 99–107, 23 fev. 1994.

LIU, D.; AUGUSTE, D. T. Cancer targeted therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 632–643, 10 dez. 2015.

LIU, E.-H. et al. Anticancer Agents Derived from Natural Products. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 13, p. 1547–1555, 1 nov. 2009.

LOUREIRO, A. et al. Folic acid-tagged protein nanoemulsions loaded with CORM-2 enhance the survival of mice bearing subcutaneous A20 lymphoma tumors. 2015.

LUI, C. Y. et al. Some formulation properties of lapachol, a potential oncolytic agent of natural origin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 11, n. 9–10, p. 1763–1779, 1985.

LUO, X. et al. Production of highly concentrated oil-in-water emulsions using dual-channel microfluidization: Use of individual and mixed natural emulsifiers (saponin and lecithin). **Food Research International**, v. 96, p. 103–112, 1 jun. 2017.

MAEDA, M. et al. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 229, n. 2, p. 232–238, 1 jun. 2008.

MALCOLM, D. W. et al. The Effects of Biological Fluids on Colloidal Stability and siRNA Delivery of a pH-Responsive Micellar Nanoparticle Delivery System. **ACS Nano**, v. 12, n. 1, p. 187–197, 23 jan. 2018.

MANOUCHEHRI, E. et al. Understanding breast cancer risk factors: is there any mismatch between laywomen perceptions and expert opinions. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 309, 23 dez. 2022.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233–239, ago. 2001.

MARQUES, L. B. et al. Lapachol acetylglycosylation enhances its cytotoxic and pro-apoptotic activities in HL60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 65, p. 104772, jun. 2020.

MARQUES, R. G.; MORALES, M. M.; PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 69–74, fev. 2009.

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635–R666, 18 out. 2006.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer research**, v. 46, n. 12 Pt 1, p. 6387–92, dez. 1986.

MEINDERS, M. B. J.; VAN VLIET, T. The role of interfacial rheological properties on Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 119–126, 20 maio 2004.

MELLOR, H. R.; CALLAGHAN, R. Resistance to chemotherapy in cancer: A complex and integrated cellular response. **Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 275–300, 2008.

MIRANDA, S. E. et al. Lapachol marcado con tecnecio 99m como sonda de imágenes para la identificación de tumores de mama. **Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular**, v. 38, n. 3, p. 167–172, maio 2019a.

MIRANDA, S. E. et al. Technetium-99m-labeled lapachol as an imaging probe for breast tumor identification. **Revista Espanola de Medicina Nuclear e Imagen Molecular**, v. 38, n. 3, p. 167–172, 1 maio 2019b.

MIRANDA, S. E. M. et al. Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110936, jan. 2021.

MISHRA, R. K. et al. Efficient Nanocarriers for Drug-Delivery Systems: Types and Fabrication. **Nanocarriers for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery**, p. 1–41, 1 jan. 2019.

MORRISON, R. K. et al. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, jul. 1970a.

MORRISON, R. K. et al. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 1 jul. 1970b.

MORTON, D. M. Importance of species selection in drug toxicity testing. **Toxicology Letters**, v. 102–103, p. 545–550, dez. 1998.

NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–22, 1 jan. 2021.

NAKAMURA, H.; TAKADA, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. **Cancer Science**, v. 112, n. 10, p. 3945, 1 out. 2021.

NUGENT, P.; DUNCAN, J. N.; COLAGIOVANNI, D. B. Preparation of a Preclinical Dossier to Support an Investigational New Drug (IND) Application and First-In-Human Clinical Trial. Em: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 189–213.

NUNES, S. S. et al. PEGylated versus Non-PEGylated pH-Sensitive Liposomes: New Insights from a Comparative Antitumor Activity Study. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 2, p. 272, 24 jan. 2022.

ODA, C. M. R. et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nanomicelles as a platform for tumor delivering. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 268–275, 1 maio 2017.

OECD. OECD/OCDE 423 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method INTRODUCTION. 2001.

OGAWA, T. et al. Synthesis and antinociceptive activity of orally active opioid peptides: Improvement of oral bioavailability by esterification. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 7, p. 759–771, 2003.

OTTONI, F. M. **SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DO LAPACHOL – PROTÓTIPOS POTENCIAIS DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS**. Dissertação—[s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

OTTONI, F. M. et al. Synthesis of Lapachol-Based Glycosides and Glycosyl Triazoles with Antiproliferative Activity Against Several Cancer Cell Lines. p. 0–37, 2021.

PATEL, A. Benign vs Malignant Tumors. **JAMA Oncology**, v. 6, n. 9, p. 1488, 1 set. 2020.

PATRAVALE, V.; DANDEKAR, P.; JAIN, R. Nanoparticulate systems as drug carriers: the need. Em: **Nanoparticulate Drug Delivery**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 1–28.

PERES, R. S. et al. Lapachol, a compound targeting pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 47, 7 dez. 2017.

PETROS, R. A.; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 615–627, 2010.

PLICHTA, J. K. et al. Breast cancer tumor histopathology, stage at presentation, and treatment in the extremes of age. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 180, n. 1, p. 227–235, 24 fev. 2020.

PRASAD, M. et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1521–1537, 2018.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, out. 2000.

RAEMDONCK, K. et al. Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 1, p. 444–472, 2014.

RAHMAN, H. S. et al. Novel drug delivery systems for loading of natural plant extracts and their biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 2439–2483, abr. 2020.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203–225, jan. 2018.

RAMOS-PERALTA, L. et al. Naphthoquinone: Bioactivity and Green Synthesis. Em: **Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**. [s.l.: s.n.]. p. 542–550.

RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Research**, v. 28, n. 10, p. 1952–1954, 1968.

RASMUSSEN, M. K.; PEDERSEN, J. N.; MARIE, R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 11 maio 2020.



SÁ, R. D. C. D. S.; GUERRA, M. D. O. Reproductive toxicity of lapachol in adult male Wistar rats submitted to short-term treatment. **Phytotherapy research : PTR**, v. 21, n. 7, p. 658–662, jul. 2007.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 454–459, 2020.

SHAH, M. A.; ROGOFF, H. A. Implications of reactive oxygen species on cancer formation and its treatment. **Seminars in Oncology**, v. 48, n. 3, p. 238–245, 1 jun. 2021.

SHUBIK, P. **Vascularization of tumors: A review**. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** Springer-Verlag, , jul. 1982.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 12 jan. 2023.

SILVA, J. DE O. et al. Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 352, p. 162–169, ago. 2018.

SILVA, J. DE O. et al. Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109323, 1 out. 2019.

SINDHWANI, S. et al. The entry of nanoparticles into solid tumours. **Nature Materials**, v. 19, n. 5, p. 566–575, 1 maio 2020.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 28 abr. 2017.

SINHA, T. Tumors: Benign and Malignant. **Cancer therapy & Oncology International Journal**, v. 10, n. 3, 1 maio 2018.

SPLANE, B.; DORU, P. **Benign vs. Malignant Tumors: Causes and Treatments**. Disponível em: <<https://www.verywellhealth.com/what-does-malignant-and-benign-mean-514240>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

SRINIVAS, U. S. et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biology**, v. 25, p. 101084, jul. 2019.

STACHURSKI, J.; MICHALEK, M. The Effect of the  $\zeta$  Potential on the Stability of a Non-Polar Oil-in-Water Emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 184, n. 2, p. 433–436, 25 dez. 1996.

STYLIANOPOULOS, T.; JAIN, R. K. Design considerations for nanotherapeutics in oncology. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 1893–1907, nov. 2015.

SUNASSEE, S. N. et al. Cytotoxicity of lapachol,  $\beta$ -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 98–110, abr. 2013.

SUTER, L.; BABISS, L. E.; WHEELDON, E. B. **Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development**. **Chemistry and Biology** Elsevier Ltd, , 2004.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 20 maio 2004.

TELES, J. S.; FUKUDA, E. Y.; FEDER, D. Warfarin: pharmacological profile and drug interactions with antidepressants. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, n. 1, p. 110–115, mar. 2012.

TU, C. F. et al. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- $\beta$  receptor core fucosylation. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 111, 5 dez. 2017.

TUBTIMSRI, S. et al. Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 425, 1 set. 2018.

VAN TELLINGEN, O. et al. Rapid esterase-sensitive breakdown of polysorbate 80 and its impact on the plasma pharmacokinetics of docetaxel and metabolites in mice. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2918–24, out. 1999.

VENTOLA, C. L. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 42, n. 12, p. 742–755, dez. 2017.

VENTURA PINTO, A.; LISBOA DE CASTRO, S. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4570–4590, 10 nov. 2009.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, ago. 2006.

VRANCKX, P.; VALGIMIGLI, M.; HEIDBUCHEL, H. The Significance of Drug–Drug and Drug–Food Interactions of Oral Anticoagulation. **Arrhythmia & Electrophysiology Review**, v. 7, n. 1, p. 55, 2018.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288, 22 jan. 2019.

WANG, H. et al. Two novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest by regulating reactive oxygen species-mediated MAPK/Akt/STAT3 signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, 15 jul. 2019.

WINTERS, S. et al. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. 151. ed. Los Angeles: Academic Press, 2017. v. 151p. 1–32.

WONG, H. L. et al. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 491–504, 10 jul. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

WU, W. et al. Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats. **International Journal of Nanomedicine**, p. 521, mar. 2011.

YANG, L. et al. Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 47, n. 1, p. 105–116, 22 fev. 2020.

YING, M.; CHEN, G.; LU, W. Recent Advances and Strategies in Tumor Vasculature Targeted Nano-Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 22, p. 3066–3075, 13 jul. 2015.

YUAN, K. et al. Cell Surface Associated Alpha-L-Fucose Moieties Modulate Human Breast Cancer Neoplastic Progression. **Pathology & Oncology Research**, v. 14, n. 2, p. 145–156, 13 jun. 2008.

ZHAO, H. et al. Nanoemulsion loaded with lycobetaine-oleic acid ionic complex: Physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1959–1973, 18 maio 2013.

## ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 6/2018**Título do projeto:** Estudo de biodistribuição e avaliação da eficácia antitumoral de nanoemulsões contendo lapachol**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Andre Luis Branco de Barros**Unidade:** Faculdade de Farmacia**Departamento:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 09/04/2018. Validade: 09/04/2018 à 08/04/2023

Belo Horizonte, 09/04/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 47/2022

Título do projeto: Estudo de atividade antitumoral e toxicidade sistêmica do fucosídeo do lapachol

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Andre Luis Branco de Barros

Unidade: Faculdade de Farmacia

Departamento: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 28/03/2022. Validade: 28/03/2022 à 27/03/2027.  
Belo Horizonte, 28/03/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

## APÊNDICE

MIRANDA, S. E. M. et al. Enhanced antitumor efficacy of LAP-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110936, jan. 2021





Original article



## Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model

Sued Eustáquio Mendes Miranda<sup>a,b</sup>, Janaína de Alcântara Lemos<sup>b</sup>, Renata Salgado Fernandes<sup>b</sup>, Juliana de Oliveira Silva<sup>b</sup>, Flaviano M. Ottoni<sup>b</sup>, Danyelle M. Townsend<sup>d</sup>, Domenico Rubello<sup>c</sup>, Ricardo José Alves<sup>b</sup>, Geovanni Dantas Cassali<sup>e</sup>, Lucas Antônio Miranda Ferreira<sup>b</sup>, Andre Luis Branco de Barros<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Department of Nuclear Medicine, Santa Maria della Misericordia Hospital, Rovigo, Italy

<sup>d</sup> Department of Drug Discovery and Pharmaceutical Sciences, Medical University of South Carolina, USA

<sup>e</sup> Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lapachol  
Nanoemulsion  
Antitumor activity  
Breast cancer  
Radiolabeling

### ABSTRACT

Lapachol (LAP) is a natural compound with various biological properties, including anticancer activity. However, its clinical application is limited due to the low aqueous solubility and potential adverse side effects. Nanoemulsions are drug delivery systems that can assist in the administration of hydrophobic drugs, increasing their bioavailability and protecting from degradation. Thus, this study aimed to prepare a LAP-loaded nanoemulsion (NE-LAP), and evaluate its antitumor activity. For this purpose, the nanoemulsion was prepared using a hot homogenization method and characterized morphologically by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM). Mean diameter, polydispersity index, and zeta potential was evaluated by DLS, encapsulation efficiency was measured by HPLC. Moreover, the short-term storage stability, the drug release and hemolysis *in vitro* was determined. Additionally, pharmacokinetic, toxicology and toxicity properties of <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP were evaluated in a breast cancer (4T1) tumor model. The cryo-TEM showed spherical globules, and the physicochemical characterization of NE-LAP showed a homogeneous stable nanoemulsion with a mean diameter of ~170 nm, zeta potential of around -20 mV, and encapsulation greater than 85 %. *In vitro* studies validated that encapsulation did not impair the cytotoxicity activity of LAP. The nanoemulsion was successfully radiolabeled and <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP showed prolonged blood circulation and tumor affinity was confirmed by tumor-to-muscle ratio. Moreover, NE-LAP showed higher antitumor activity than the free drug and the treatment did not result in any signs of toxicity. Therefore, these findings suggest that NE-LAP can be considered an effective strategy for cancer treatment.

### 1. Introduction

Cancer is the second leading cause of death worldwide, behind only cardiovascular diseases [1]. Breast cancer is the most common tumor in women, with an incidence of 11.6 % and a mortality rate of 6.6 % [2]. Although chemotherapy is used as one of the main strategies for breast cancer treatment, several drawbacks including, multidrug resistance, adverse side effects, and low tumor cell specificity, often result in poor treatment efficacy [3,4]. Therefore, many approaches have been explored in an attempt to overcome these disadvantages. Strategies

includes developing novel tumor-specific bioactive compounds or designing drug delivery systems to improve properties of FDA approved drugs with known biological activity [5,6].

Lapachol (LAP), a natural compound of the class of naphthoquinones, has several biological activities described, among them: antibacterial, trypanomicide, leishmanicide, and antitumor. LAP has been tested *in vitro* against several cancer cell lines and *in vivo* in some animal models [7,8]. However, the occurrence of adverse side effects, such as anemia, nausea, and vomiting, along with its poor water solubility and low bioavailability have limited the clinical use of this drug

\* Corresponding author.

E-mail address: [albb@ufmg.br](mailto:albb@ufmg.br) (A.L.B. de Barros).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2020.110936>

Received 30 July 2020; Received in revised form 21 October 2020; Accepted 23 October 2020

Available online 27 November 2020

0753-3322/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

[9].

Nanometer-scale drug delivery systems are promising alternatives to increase the antitumor efficacy of drugs and to reduce their adverse side effects [10]. Nanoemulsion is a dispersion of two immiscible liquids, typically water and oil, on a nanometer scale (20–200 nm), stabilized by surfactants [11–13]. It is an attractive delivery platform since it can encapsulate hydrophobic drugs, allowing high payloads in a low concentration of oil [14]. The use of nanoemulsions have shown favorable data in drug stability, cellular uptake, and blood circulation time, in both *in vitro* and *in vivo* tumor models [15–18]. Regarding LAP, some studies reported the encapsulation of the drug as a strategy to overcome its limitations, nevertheless, none of them are used for intravenous application or antitumor evaluation [19–23]. Thus, this study aimed to evaluate the antitumor activity of nanoemulsion loaded with LAP (NE-LAP). To achieve this purpose, the system was characterized as the mean diameter, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, and drug release. In addition, NE-LAP was radiolabeled with technetium-99m for evaluating the ability of the system to reach the tumor site. Moreover, the antitumor efficacy and toxicity was evaluated in 4T1 breast tumor model in BALB/c mice.

## 2. Material and methods

Ethoxylated sorbitan monooleate (SuperRefined™ Polysorbate™ 80; Tween 80™), soybean oil, glycerol, lapachol, and SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). RPMI 1640 Medium, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, and trypsin EDTA 0.25 % were purchased from Gibco-Invitrogen (Waltham, MA, USA). <sup>99m</sup>Tc was obtained from an alumina-based <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc generator (IPEN, São Paulo, Brazil). Xylazine solution (Dopaser® 2 %) was purchased from Hertape Calier (Juatuba, Brazil). Ketamine hydrochloride solution (Dopalen® 10 %) was supplied by Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brazil). All other chemicals were of analytical grade. The subcutaneous tumor model was established in 8-week female BALB/c mice purchased from CEBIO-UFMG (Belo Horizonte, Brazil). All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/UFMG) under protocol # 06/2018.

### 2.1. Nanoemulsion preparation

Oil-in-water (O/W) nanoemulsions (NE) were prepared using the hot homogenization method. The composition of the nanoemulsion in the oily phase (Soybean oil, 400 mg; Polysorbate 80, 115 mg), and the aqueous phase (Glycerol, 224 mg; ultrapure water, 10 mL) were heated, separately, to 80 °C. With the temperature maintained at 80 °C, aqueous phase was gently dropped onto the oily phase under constant agitation, at 8000 rpm, with an Ultra Turrax T-25 homogenizer (Ika Labor Technik, Germany). The formed emulsion was immediately submitted to a high-intensity probe sonication for 10 min (CPX 500 model, Cole-Palmer Instruments, USA). After this period, the formulations were cooled down to room temperature with manual agitation and the volume was adjusted to 10 mL with ultrapure water. The pH of the NE was adjusted to 7.0 with a solution of NaOH (0.1 mol L<sup>-1</sup>) and the formulations were stored at 4 °C. For NE-LAP, the drug was added to the oily phase at different concentrations (0.05 %; 0.075 %; 0.1 %) and the same method of preparation was used.

### 2.2. Particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential

The mean particle diameter and PDI were measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). Zeta potential measurements were carried out by DLS associated with electrophoretic mobility. The samples were diluted 100-times in ultrapure water.

### 2.3. Encapsulation efficiency (EE)

NE-LAP was purified by 0.45 μm filtration. By using this strategy, encapsulated LAP freely pass through the membrane while non-encapsulated LAP remains in the filter. For EE quantification, samples of total LAP (before filtration) and purified LAP (after 0.45 μm filtration) were dispersed in THF:Methanol (4:6) mixture and the drug concentration was determined by HPLC (Waters, 515 isocratic pump, 717 plus automatic injector, and UV-Dual λ 2487 detector, Milford, EUA) using methanol: 5 % acetic acid (80:20 (v/v)) as mobile phase, Innoval reversed-phase C<sub>18</sub> column, (5 μm, 4.6 × 150 mm) (Agela Technologies, Tianjin, China); flow 1.0 mL/min; 25 °C, 20 μL injection volume and column oven at 40 °C, with UV detection in λ = 278 nm [24]. Then, the %EE was calculated by the formula:

$$\%EE = \frac{E_{LAP} \times 100}{T_{LAP}}$$

Where: T<sub>LAP</sub> = total LAP concentration in NE, E<sub>LAP</sub> = Encapsulated LAP concentration.

### 2.4. Morphological analysis

Transmission electron cryo-microscopy (cryo-TEM) (Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV) were used to study the morphology of NE-LAP. The samples were prepared by plunge freezing technique, by spreading the sample into a thin film across an EM grid and then rapidly submerging it in liquid ethane. Mean diameter was determined by the analyses of 100 nanoparticles, using Image J software.

### 2.5. Short-term storage stability

Immediately after preparation, NE-LAP at concentrations of 0.5, 0.75, and 1.0 mg/mL were stored at 4 °C, protected from the light. At 3, 7, 15, and 30 days post-preparation NE-LAP were evaluated as mean diameter, zeta potential, and encapsulation efficiency.

### 2.6. Colloidal stability

The stability of the NE-LAP was investigated in different biological fluids to predict the *in vivo* behavior of the drug delivery system. NE-LAP was diluted 4-times in NaCl (0.9 % w/v), PBS buffer (pH 7.4), Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) or murine plasm. The resulting solution was kept at 37 °C under agitation of 150 RPM, for 24 h [25]. At pre-determined time points aliquots of each solution were collected and mean diameter was measure by DLS.

### 2.7. Polarized light microscopy (PLM)

The presence of LAP crystals in the nanoemulsion dispersion was evaluated by an optical microscope (Zeiss Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Germany) coupled with polarized light and equipped with an AxioCam digital camera (Model ERc 5S, Carl Zeiss, Germany). The samples were prepared in microscope slides (undiluted). The detection of LAP crystal indicates the presence of non-encapsulated LAP, and therefore, lack of stability.

### 2.8. In vitro drug release

The release of LAP from NE was performed by the dialysis method using tubing cellulose membranes with a cutoff size of 14 kDa and a diameter of 21 mm (cellulose ester membrane; Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Dialysis bags were filled with 1 mL of formulation, sealed and incubated with 50 mL of PBS (pH 7.4) containing Tween 80 (2 %), at 37 °C, for 24 h, under magnetic stirring at 150 rpm. An aqueous solution of LAP (in PBS containing 2 % Tween 80) was used as a control (concentration 0.46 mg/mL). At 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, and 1440 min,

aliquots were withdrawn and LAP concentration was analyzed by HPLC. The same volume was replaced with the receptor liquid (PBS + Tween 80). Values were plotted as cumulative percentage of drug release.

## 2.9. Radiolabeling of NE-LAP

Radiolabeling of NE-LAP was carried out in a sealed vial containing 1.0 mL NE-LAP and 100  $\mu$ L SnCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O solution in 0.25 mol L<sup>-1</sup>HCl (1.0 mg/mL). The pH was adjusted to 7.4 using NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>), and vacuum was performed to the vial. An aliquot of 0.1 mL of Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (3.7 MBq) was added to the vial and maintained at room temperature for 15 min.

Radiolabeling yield was determined by thin-layer chromatography (TLC-SG, Merck, Darmstadt, Germany) using acetone as the mobile phase to quantify <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Radioactivity was determined using a gamma counter (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA). <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> was removed from the preparation using a 0.45  $\mu$ m syringe filter [26].

## 2.10. In vitro radiolabeling stability

The radiolabeling stability of <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP at room temperature in 0.9 % (w/v) NaCl and in the presence of mouse plasma to simulate *in vivo* conditions were performed. Briefly, a volume of 90  $\mu$ L of <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP was incubated, under agitation, at 37 °C (Dubnoff Bath MA-095/CF) with 1.0 mL of fresh mouse plasma. Radiolabeling stability was determined by TLC-SG from samples taken at 1, 2, 4, 8, and 24 h after incubation, according as previously described [27].

## 2.11. Blood clearance

The blood clearance was performed according to published procedures [27]. Aliquots of 3.7 MBq of <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP were injected intravenously into healthy BALB/c mice. An incision was made in the tail of the animals and blood was collected in pre-weighed tubes at times of 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480, and 1440 min after administration. The tubes were weighed and their radioactivity determined by a gamma counter. These data were used to plot a percentage of the dose injected per gram of blood (% ID/g) versus time.

## 2.12. Cell culture

The breast cancer cell line (4T1) was grown in RPMI 1640 medium, supplemented with 10 % (v/v) of fetal bovine serum, penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). Cells were maintained in 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. The cells were grown to confluence and harvested by trypsinization.

## 2.13. Tumor cell inoculation

Aliquots of 1.0  $\times$  10<sup>6</sup> 4T1 cells in RPMI medium (0.1 mL) was injected (SC) into the right flank of female BALB/c mice. Mice were kept in an area with light control, with free access to water and food. Tumor cells were allowed to grow *in vivo* for 7 days, once the tumor volume reached about 100 mm<sup>3</sup>.

## 2.14. Tumor-to-muscle ratio

Aliquots of 3.7 MBq of <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP were injected intravenously into tumor-bearing BALB/c mice. At 1, 4, 8, and 24 h post-injection, the tumor and surrounding muscle were removed, dried on filter paper, and weighed. The radioactivity in each tissue was determined by a gamma counter. A standard dose containing the same injected amount was counted simultaneously in a separate tube, which was defined as 100 % radioactivity. The results were expressed as the tumor-to-muscle ratio in order to assess the tumor affinity of the <sup>99m</sup>Tc-NE-LAP.

## 2.15. Cell viability

MDA-MB-231 and 4T1 cells were seeded in 96-well plates (1  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well and 5  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well, respectively) 24 h prior to treatment. Cells were exposed to a series of concentrations of buffered solution of LAP, NE-LAP, and blank NE, for 48 h. Cell viability was assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay as previously described [28]. Briefly, after incubation, 10 % trichloroacetic acid (TCA) was added to each well to fix cells for one hour. Plates were then washed with water to remove TCA and stained with SRB for 30 min. Afterward, the plate was washed with 1 % acetic acid to remove the unbound SRB. Then, the protein-bound dye was solubilized in 10 mM of Tris-Base [tris (hydroxymethyl) aminomethane] solution and optical densities (OD) were read at 510 nm on a microplate spectrophotometer Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

## 2.16. Hemolysis assay

Fresh mice blood (8 weeks, 20.0  $\pm$  2.0 g) was collected in tubes containing 10 % w/v EDTA solution. The red blood cells (RBC) were separated by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at room temperature (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge, Germany). The RBC collected from the bottom were washed with NaCl 0.9 % (w/v) until a colorless supernatant was obtained above the cell mass. The final pellet was diluted with NaCl 0.9 % (w/v) solution to obtain a 4 % (w/v) RBC concentration. NE-LAP of three different concentrations of LAP were evaluated. The samples were incubated with an equal volume of 4 % RBC suspension (n = 5) for 1 h at 37 °C under agitation at 500 bpm (metabolic bath, Dubno ff ; MA-95/CF Marconi, Brazil). After the incubation, the cell suspensions were centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the absorbance of the supernatants was measured in a spectrophotometer (Evolution 201 UV-vis Spectrophotometer Thermo Scientific, USA) at 540 nm. Deionized water and NaCl 0.9 % (w/v) were used as negative and positive controls, respectively. The percent hemolysis was calculated for each sample by taking the absorbance of positive control as 100 % hemolytic sample, using following equation:

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{[\text{Absorbance sample}]/[\text{Absorbance positive control}]}{100} \times 100$$

## 2.17. Antitumor activity

For the antitumor activity assay only the 4T1 tumor model was used. On the 7th day after 4T1 cell inoculation, once the tumor volume reached  $\sim$ 100 mm<sup>3</sup>, the mice were randomly assigned into three groups (n = 7 for each group): group 1: PBS-Tween 80 at 2 % (negative control group); group 2: buffered solution of LAP; group 3: NE-LAP. For all treatments, the dose of LAP was 5 mg/kg, in a total of 5 administrations, every 2 days, injected by the tail vein. Throughout the study, tumors were measured with a caliper every 2 days. Tumor volumes were calculated from the formula:

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0.5$$

Where d<sub>1</sub> and d<sub>2</sub>, represent the smaller and larger diameter, respectively [29].

At the end of the experimental period (D10), the relative tumor volume (RTV), and the tumor growth inhibition ratio (IR) were determined by the formulas:

$$\text{RTV} = \frac{\text{Tumor volume on day10}}{\text{Tumor volume on day 0}}$$

$$\text{IR} = \frac{\text{Mean RTV from each treatment} \times 100}{\text{Mean RTV from control group}}$$

At the end of the experiment, the animals were euthanized and the

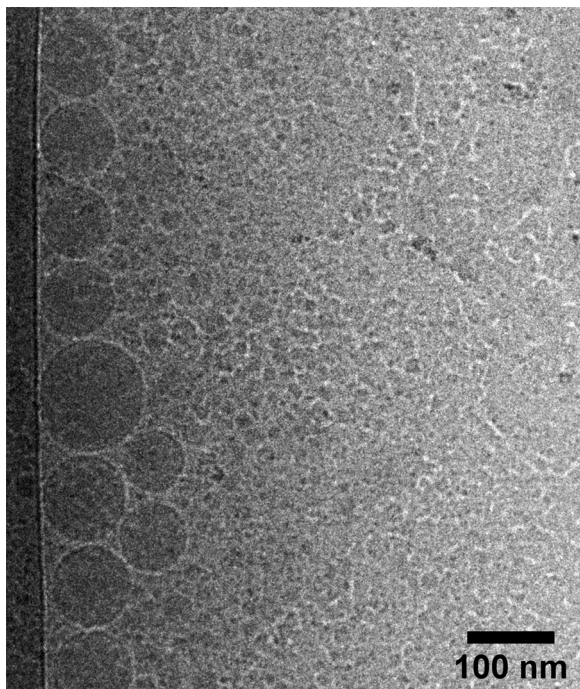


**Table 1**

Particle size, PDI, zeta potential, entrapment efficiency (EE) and Drug concentration of NE- blank and NE-LAP at 3 different concentrations of LAP (0.5, 0.75, and 1.0 mg/mL).

	Size (nm)	PDI <sup>a</sup>	Zeta (mV)	EE (%)	Drug concentration (µg/mL)
NE	174 ± 14	0.201 ± 0.040	-26.0 ± 8.3	-	-
NE-LAP 0.5	178 ± 6	0.175 ± 0.019	-20.6 ± 7.8	100.3 ± 1.5	501,6 ± 7,3
NE-LAP 0.75	174 ± 2	0.179 ± 0.020	-17.9 ± 4.0	97.3 ± 2.9	729,8 ± 21,8
NE-LAP 1.0	176 ± 6	0.170 ± 0.025	-21.9 ± 2.8	85.4 ± 3.7	853,9 ± 37,6

<sup>a</sup> Polydispersity index.



**Fig. 1.** Cryogenic Transmission Electron Microscopy of NE-LAP, 100 nm scale bar.

blood collected, in the presence of EDTA, for toxicity evaluation [29].

### 2.18. Histological analysis

The liver and kidney were collected for histopathological analysis. Samples were fixed in 10 % buffered formalin for 48 h, dehydrated in alcohol and included in paraffin blocks. 4 µm sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The slides were evaluated by a trained pathologist and images were captured by a camera connected to an optical microscope (Olympus BX-40; Olympus, Tokyo, Japan).

### 2.19. Biochemical analysis

Blood was collected using EDTA as an anticoagulant and centrifuged at 5000 rpm for 10 min and plasma was obtained. Plasma was used to perform biochemical analyses such as urea, creatinine, AST (aspartate aminotransferase), and ALT (alanine aminotransferase). The biochemical tests were performed using commercial kits from Labtest® (Lagoa Santa, Brazil) through Bioplus BIO-2000 semiautomatic analyzer equipment (São Paulo, Brazil).

### 2.20. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM, version 5.00 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The difference between the experimental

groups was tested using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test, or T test, when the number of groups evaluated was equal to two. All data showed normal distribution and homoscedasticity, when necessary. The differences were considered statistically significant when the P values were <0.05.

## 3. Results

### 3.1. Characterization

Blank NE and NE-LAP at different concentrations of LAP, were characterized as mean diameter, PDI, zeta potential, %EE, and the results are summarized in Table 1. All blank and LAP formulations showed a mean diameter of ~ 175 nm, with low polydispersity index values ( $\leq 0.2$ ), indicating monodisperse size distribution. These values are in agreement with what is recommend for intravenous administration [30]. Particles with sizes between 100 and 200 nm are favorable for intravenous administration, as they are large enough to prevent absorption in the liver and small enough to avoid filtration in the spleen [30,31]. Moreover, nanosystems with a size smaller than 200 nm are advantageous since they may reduce opsonization and consequently the uptake by the cells of the mononuclear phagocytic system [32,33].

The highly negative zeta potential is a good indication of stability since high values, in module, may inhibit droplet fusion by charge repulsion. Encapsulation content was high to all formulations, as expected in nanoemulsion systems, due to the hydrophobic nature of LAP. The encapsulation value decreased as the drug concentration increased, suggesting saturation of the system [34–36].

Representative cryo-TEM image is shown in Fig. 1. Images showed good sample preparation and dispersion. It can be observed nanoparticles as round globules, with smooth surface and, an average size of approximately 165 nm, which is consistent with DLS data.

### 3.2. Short-term storage stability

NE-LAP at different concentrations of LAP were prepared and stored at 4 °C. The storage stability over time was evaluated as demonstrated in Fig. 2.

As observed in Fig. 2A and B, the mean diameter and PDI did not change over time indicating the stability of the NE-LAP up to 30 days. Importantly, the average size of particles remains in the range of 200 nm, which is compatible with intravenous administration, and PDI showed values always lower than 0.3 indicating particles homogeneously distributed [31]. Moreover, a negative zeta potential value (~20 mV) was achieved throughout the whole experiment (Fig. 2C).

The encapsulation stability was also evaluated within 30 days and results are shown in Fig. 2D. NE-LAP at concentrations of 0.75 mg/mL and 1.0 mg/mL showed low stability over time, resulting in significant drug release after 7 and 3 days, respectively. Both NE-LAP released more than 50 % of the drug at the end of the experiment. NE-LAP at 0.5 mg/mL showed excellent stability within 30 days of storage.

Stability was assessed by polarized light microscopy. Fig. 3 shows a representative image on the day of the instability of each formulation or day 30 if no instability was observed. Therefore, crystals were present for NE-LAP at 1.0 mg/mL at day 3 (Fig. 3A) and for NE-LAP at 0.75 mg/

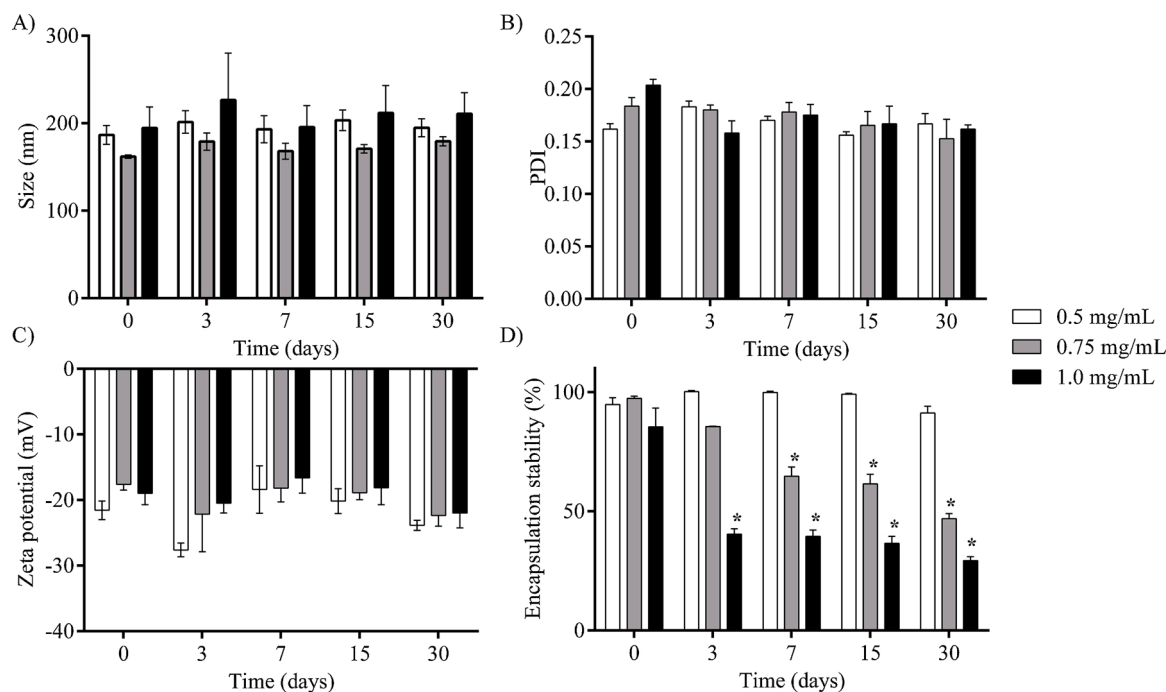


Fig. 2. Storage stability of NE-LAP at different concentrations of LAP stored at 4 °C, for 30 days. A) Mean diameter, B) PDI, C) zeta potential, D) Encapsulation Stability. (\* Represents statistical differences ( $P < 0.05$ ) compared to day 0).

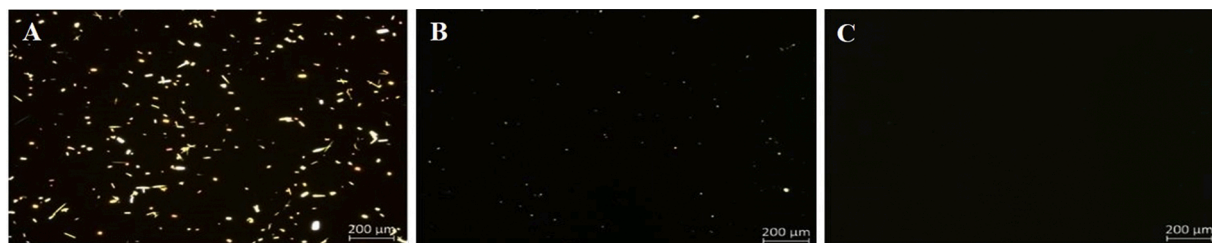


Fig. 3. Polarized light microscopy images of NE-LAP at different concentrations. Images were taken on the day of the instability of each formulation or day 30 if no instability was observed. A) NE-LAP, 1.0 mg/mL, at day 3; B) NE-LAP, 0.75 mg/mL, at day 7; C) NE-LAP, 0.5 mg/mL, at day 30. 5X magnification.

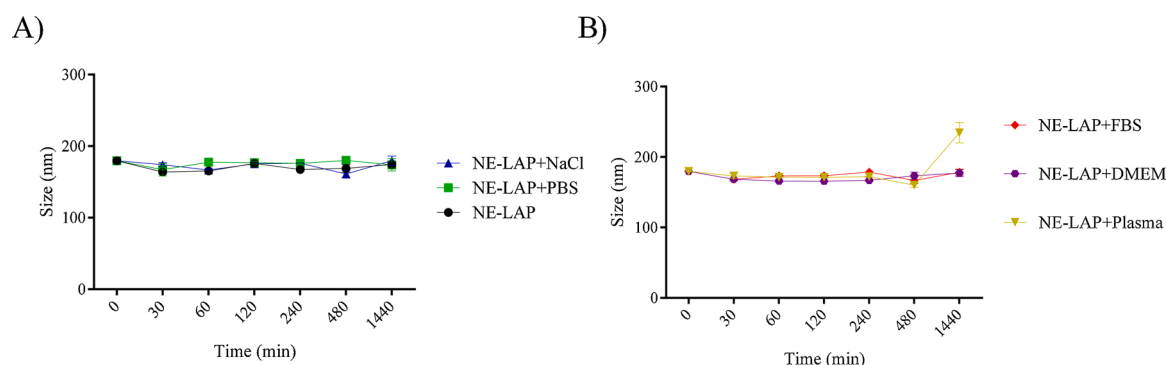


Fig. 4. Colloidal stability assay in several biological fluids, NE-LAP were diluted three times. A) NE-LAP; NE-LAP in NaCl (0.9 %); NE-LAP in phosphate-saline buffer (PBS). B) NE-LAP in Fetal Bovine Serum (FBS); NE-LAP in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM); NE-LAP in murine plasma.

mL at day 7 (Fig. 3B). In contrast, no crystals were observed in NE-LAP at 0.5 mg/mL even after 30 days of storage (Fig. 3C). Altogether, the stability studies indicate that 0.5 mg/mL is the optimum concentration for achieving a more stable nanoemulsion. Therefore, NE-LAP at 0.5 mg/mL was used for further *in vitro* and *in vivo* assays.

### 3.3. Colloidal stability

The colloidal stability of the NE-LAP was investigated in different media, such as NaCl (0.9 % w/v), PBS, DMEM, mice plasma. The evaluated parameters are summarized in Fig. 4. It was found that NE-LAP showed excellent stability, independently of the media, without any significant change in the particle mean diameter in 24 h.

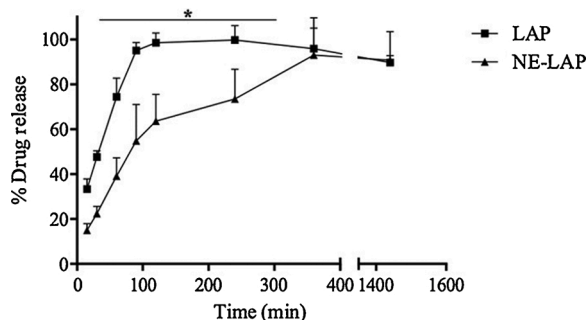


Fig. 5. *In vitro* drug release profile of LAP from nanoemulsion (NE-LAP) at 37 °C for 24 h (\* Represents statistical differences ( $P < 0.05$ ) between LAP and NE-LAP).

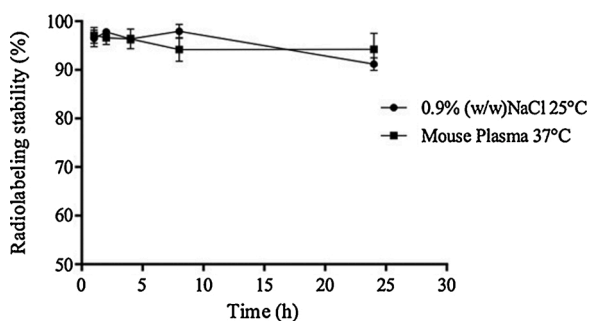


Fig. 6. Radiolabeling stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP in the presence of 0.9 % (w/v) NaCl, at 25 °C or mouse plasma, at 37 °C, as a function of time ( $n = 7$ ).

### 3.4. *In vitro* drug release

Fig. 5 shows the release profile of free and encapsulated LAP. Here we showed that the free LAP reached 100 % release within approximately 1.5 h. In contrast, NE-LAP at 0.5 mg/mL showed a more sustained release, reaching 100 % after six hours. Nanoemulsions are characterized by a gradual release of the drug, and other authors have shown controlled release of the drug from nanoemulsion in a similar manner [37].

### 3.5. Radiolabeling yield and stability

Following radiolabeling, impurities were quantified. The radiolabeling yield of  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP was  $94.5 \pm 1.3$  %, which is superior to that recommended by the American Pharmacopoeia [38]. The results of radiolabeling stability are presented in Fig. 6.  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP was highly stable up to 24 h with than 90 % of the radiometal remaining in the

nanoparticles. This finding is extremely important to guarantee that animal studies data will reflect the nanoparticles' fate instead of the  $^{99m}\text{Tc}$  itself [27].

### 3.6. Blood clearance and tumor-to-muscle ratio

Pharmacokinetic properties were evaluated in tumor bearing mice. Blood clearance for  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP is shown in Fig. 7A.  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP decays in a biphasic manner showing a  $\alpha$ -half-life of 3.8 min and a  $\beta$ -half-life of 117.3 min. The area under the curve (AUC) was  $2918 \text{ \%ID}\cdot\text{min}^{-1}$ .

It is important to underscore that  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP showed better parameters when compared with previous studies of  $^{99m}\text{Tc}$ -LAP reported by our group [27]. There was a large increase in the  $\beta$ -half-life from 50 to 117.3 min and a considerable increment in the AUC from 1909 to  $2918 \text{ \%ID}\cdot\text{min}^{-1}$  [27]. These results clearly showed the contribution of the nanoemulsion in prolonging blood circulation time of the drug, which is of pivotal importance to enhance tumor accumulation and consequently a high antitumor efficacy.

A biodistribution study was performed in order to evaluate specific tumor uptake of  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP. Fig. 7B shows the tumor-to-muscle ratio, which is an important parameter to identify the tumor affinity compared with the surrounding tissue. Tumor-to-muscle ratio increases over time reaching the maximum after 24 h (6.49). These data indicate that the  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP accumulates preferentially in the tumor than the surrounding muscle. It is important mentioning that the tumor-to-muscle ratio for  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP was higher than that previously reported for  $^{99m}\text{Tc}$ -LAP [27]. The preferential tumor accumulation of NE-LAP is a relevant parameter to guarantee the proper access to the target tissue in a tumor treatment protocol.

### 3.7. Cell viability

Cell viability was assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay against a human and a murine breast cancer cell line, 4T1 and MDA-MB-231, respectively. Half-maximum inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) for LAP and NE-LAP were obtained and are shown in Table 2. No differences were found between treatments suggesting that encapsulation did not impair the cytotoxicity of the drug. NE-blank did not impair on cytotoxicity, at all the evaluated concentrations the cell viability was close to 100 %. Therefore, it was not possible to calculate an  $\text{IC}_{50}$  value for this

Table 2

Half-maximum inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) for LAP and NE-LAP against 4T1 and MDA-MB-231 tumor cells ( $p < 0.05$ ).

Treatment	4T1 ( $\mu\text{M}$ )	MDA-MB-231 ( $\mu\text{M}$ )
LAP	$8.29 \pm 3.07$	$6.60 \pm 3.1$
NE-LAP	$10.34 \pm 1.06$	$7.29 \pm 1.79$

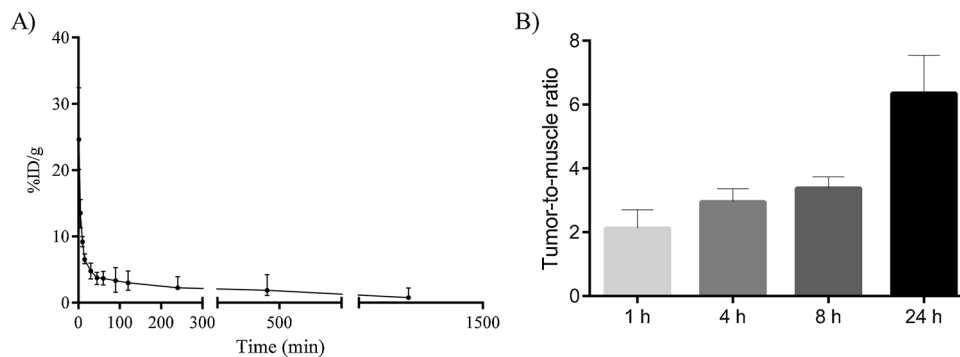


Fig. 7. Blood clearance and the tumor-to-muscle ratio of  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP. A) Blood circulation of  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP after intravenous administration in healthy BALB/c female mice. All data are the mean percentage ( $n = 7$ ) of the injected dose of per gram of blood,  $\pm$  the standard deviation of the mean. B) Tumor-to-muscle ratio at 1, 4, 8 and 24 h after intravenous administration of  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP in 4T1 tumor-bearing mice ( $n = 7$ ).

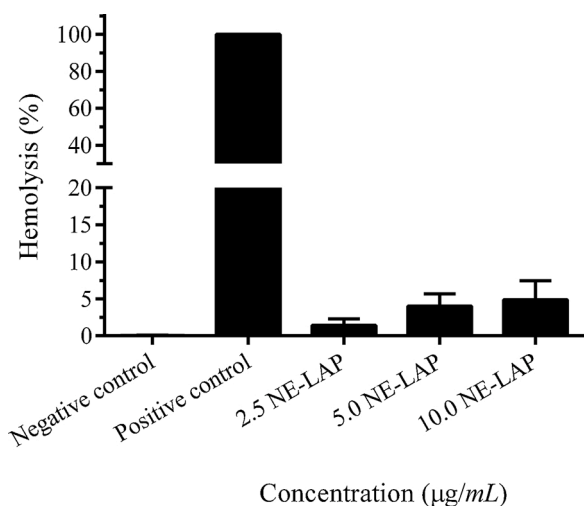


Fig. 8. NE-LAP *in vitro* hemolysis assay. Data are expressed as mean  $\pm$  sd (n = 5).

group, showing the absence of cytotoxicity of the nanocarrier.

### 3.8. Hemolysis assay

The hemolytic activity profiles of different concentrations of NE-LAP are shown in Fig. 8. It is possible to observe that hemolysis is dose-dependent, reaching a maximum of 4.88 % for NE-LAP at 10  $\mu\text{g/mL}$  (10 NE-LAP). Components with hemolysis values below 10 % can be considered as non-hemolytic [39]. Therefore, NE-LAP proved to be hemocompatible for the intravenous administration.

### 3.9. Antitumor activity

Fig. 9A shows the 4T1 tumor growth for all the evaluated groups over time. It can be observed that LAP (free and encapsulated) was more effective at controlling tumor growth when compared to the control group. In addition, NE-LAP was statistically different from control and LAP groups, indicating higher efficiency in antitumor activity. Values of RTV and IR (Table 3) corroborate the data found in the tumor growth curve, indicating higher IR and lower RTV for the NE-LAP group.

### 3.10. Toxicity

Toxicity was evaluated through changes body weight and blood chemistry parameters that assess liver and kidney damage. The body

weight was monitored over the treatment, Fig. 9B. It can be noted that the control group had a decrease in weight; meanwhile, the other groups had gained weight. This result indicates that LAP-treated groups showed no signs of potential gut toxicity in this protocol.

Table 4 shows the biochemical analysis of blood from 4T1 tumor-bearing mice treated with free LAP and NE-LAP. Creatinine and urea were performed for kidney function evaluation, while alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were dosed for checking liver function. Comparing to the control group, neither treated groups show any alteration in biochemical parameters, demonstrating a lack of potential dose-limiting organ toxicity. These data were confirmed by histological analysis, since no significant alterations were observed for liver or kidneys slides (Fig. 10).

## 4. Discussion

Several biological applications have been reported for LAP, including antitumor activity [7,8]. However, its low water solubility, which results in low bioavailability, has limited the use of this drug [9]. In this sense, many strategies to overcome these drawbacks have been applied, such as the use of drug delivery systems [40–45]. The characterization of a new nanosystem is essential for understanding the benefits of the proposed system, as well as the possible toxicities [46]. In this work, we produce a LAP-loaded nanoemulsion stable for 30 days with a

Table 3

Relative tumor volume (RTV) and tumor growth inhibition ratio (IR) after the administration of LAP and NE-LAP.

Group	RTV	IR
Control	6.96	–
LAP	5.51	30.68
NE-LAP	3.22 <sup>a,b</sup>	53.71 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Represents significant difference as compared with the control group.

<sup>b</sup> Represents significant difference as compared with LAP treatment. *P*-values less than 0.05 were set as the significance level (Tukey's test). The values represent the mean  $\pm$  SD (n = 7 mice/group).

Table 4

Biochemical parameters of 4T1 tumor-bearing mice after intravenous injection of PBS-Tween 2 % (control group); buffered solution of LAP, and NE-LAP.

	Control	LAP	NE-LAP
Creatinine (mg/dL)	0.35 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.05
Urea (mg/dL)	19.00 $\pm$ 2.00	23.83 $\pm$ 3.71	22.67 $\pm$ 3.01
ALT (U/L)	25.32 $\pm$ 9.88	25.03 $\pm$ 5.40	23.72 $\pm$ 3.29
AST (U/L)	185.05 $\pm$ 51.84	142.75 $\pm$ 24.77	139.09 $\pm$ 27.92

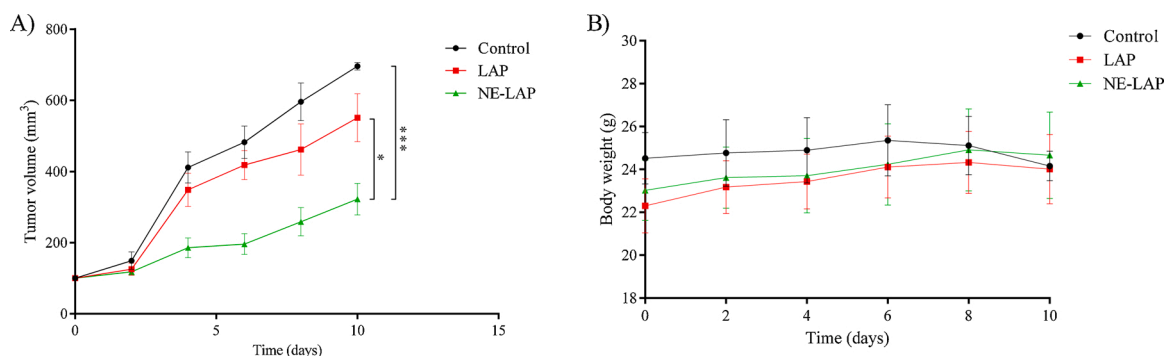
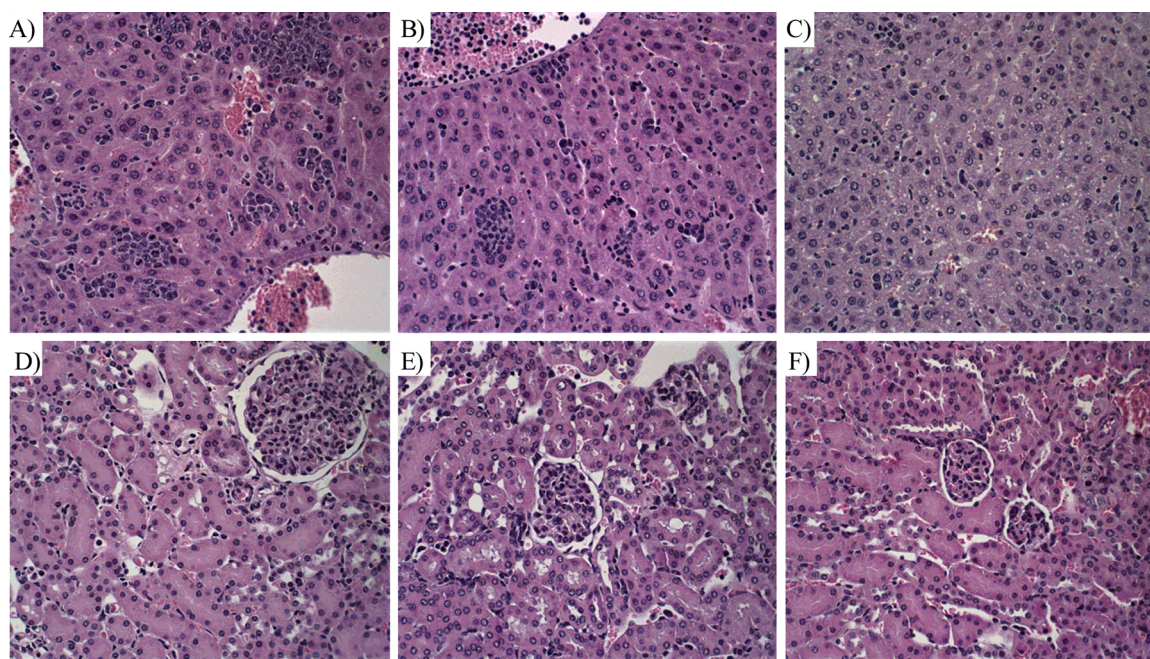


Fig. 9. A) Antitumor effect of PBS-Tween 80 2 % (control), LAP, and NE-LAP on the growth of 4T1 tumor-bearing BALB/c mice. Each treatment was intravenously administered five times, every two days, at a dose of 5 mg/kg/day. Data are expressed by the mean  $\pm$  standard deviation of the mean. Growth curves were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. \* Represents statistical differences ( $P < 0.05$ ) between LAP and NE-LAP treatments. \*\*\* Represents statistical differences ( $P < 0.001$ ) between NE-LAP and Control treatments. B) Body weight variation of 4T1 tumor-bearing mice after intravenous injection of PBS-Tween 2 % (control group); buffered solution of LAP, and NE-LAP (\* Represents statistical differences ( $P < 0.05$ ) between the treatments and control group).





**Fig. 10.** Histological sections of liver and kidney from breast tumor-bearing female BALB/C mice treated with PBS + 2 %Tween (control), LAP and NE-LAP obtained and stained by Hematoxylin & Eosin. A) Control, liver; B) LAP, liver; C) NE-LAP, liver; D) control, kidney; E) LAP, kidney and F) NE-LAP, kidney. Amplification of 40x.

compatible size, polydispersity index, and zeta potential, in addition to a suitable encapsulation rate for intravenous administration. According to the American Pharmacopoeia, injectable emulsions must have an average diameter of less than 500, with Gaussian distribution, since large particles can get trapped in the lungs, being a risk to the patients [47,48]. It is important to note that the physicochemical characteristics are important parameters for determining the drug's fate in a living organism, providing greater drug concentration in the organ or target of interest to exert its pharmacological action. Rodrigues et al., proposed a submicron emulsion of LAP as a promising delivery platform for natural medicines [19]. Our system differs from this study mainly in the surfactant concentration. The authors have evaluated increasing concentrations of surfactants, reaching an optimum amount of 2.2 %, while we used only 1.5 % in the composition of NE-LAP, with suitable parameters for *in vivo* studies. It is well-known that high concentrations of surfactants might be toxic and should be avoided in intravenous formulations [49,50]. In addition, to the best of our knowledge this is the first report assessing biological behavior and antitumor activity of nanoemulsion of LAP.

A high encapsulation percentage of LAP was achieved and might be related to its increased solubility in the oily phase [51]. However, with the increase of LAP amount into the nanoemulsion, a lack of stability was observed. This may be a result of the saturated system that expels molecules of LAP to the external medium after storage [35,52,53].

NE-LAP radiolabeled studies were carried out to assess the *in vivo* behavior of the system, mainly its capacity of accumulating in the tumor region. It is important to note that the  $^{99m}\text{Tc}$ -NE-LAP showed  $\beta$ -half-life more than 2-times longer than free  $^{99m}\text{Tc}$ -LAP, which probably contributes to a tumor-to-muscle ratio greater than 2 over time and reaching 6 at 24 h post-injection. Recently, authors have demonstrated the effective nanoparticle tumor accumulation through intracellular pathway preferentially than EPR effect. This fact, along with the already known enhanced permeability of tumor vessels, which is still slightly contributing to tissue accumulation, may represent the reasons for the success of nanoparticles in the anticancer therapy [54]. In both uptake routes, a longer blood circulation time is pivotal since high concentration of the drug is available in the bloodstream, consequently, a high

tumor accumulation is achieved.

In sequence, we evaluated if the encapsulation of LAP would impair its cytotoxicity against a murine (4T1) and a human (MDA-MB-231) breast tumor cell lines. It is important to mention that both tumor cells exhibit a triple-negative phenotype, which is considered a very aggressive cancer with poor prognosis and not responsive to classic hormone therapies [55,56]. Cytotoxicity studies reveal an  $\text{IC}_{50}$  for NE-LAP in the same range of the free drug, indicating the maintenance of antitumor activity even after encapsulation. It is already known that LAP, as a naphthoquinone, might generate reactive oxygen species (ROS) through oxidation by flavoenzymes [57,58]. When the damage caused by ROS is very extensive and the cellular machinery cannot eliminate oxidative stress, the cell goes into apoptosis [59,60].

Further *in vivo* antitumor activity assay confirms the efficacy of NE-LAP in controlling tumor growth. It is important to note that the treatment with NE-LAP leads to a big improvement in the IR when compared to the free drug. This may be related to the improved bioavailability and increased uptake in the tumor region. Similar results were observed by Zhao, (2013) and Han, (2009), where they also obtained better outcomes by encapsulating anticancer drugs in nanoemulsion [61,62]. Additionally, no sign of toxicity was observed in hemolysis assay, biochemical and histological analysis, and body weight, indicating the safety of this treatment.

## 5. Conclusions

NE-LAP was successfully prepared and characterized showing suitable parameters to support intravenous administration. Short-term stability demonstrated that NE-LAP at 0.5 mg/mL remained stable for 30 days and drug release studies revealed a more sustained release profile. Biodistribution and blood clearance studies confirm an increase in the blood circulation time, which leads to a preferential tumor uptake. These improvements certainly contributed to the higher antitumor activity observed for NE-LAP in contrast to LAP itself. This favorable performance along with the absence of signs of toxicity leads us to indicate NE-LAP as an effective strategy for cancer treatment.



## Declaration of Competing Interest

The authors declare they have no conflict of interest.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) for their financial support and scholarship. The authors also thank the Center of Microscopy from Federal University of Minas Gerais, Brazil, to the assistance in the Cryo-TEM.

## References

- [1] World Health Organization, The top 10 causes of death. Top 10 Causes Death, 2018, pp. 14–16 (Accessed July 29, 2020), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [2] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA, Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [3] I.J. Fidler, M.L. Kripke, The challenge of targeting metastasis, *Cancer Metastasis Rev.* 34 (2015) 635–641, <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9586-9>.
- [4] Y. Octavia, C.G. Tocchetti, K.L. Gabrielson, S. Janssens, H.J. Crijns, A.L. Moens, Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 1213–1225, <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2012.03.006>.
- [5] R.H. Wijdeven, B. Pang, Y.G. Assaraf, J. Neeffes, Old drugs, novel ways out: drug resistance toward cytotoxic chemotherapeutics, *Drug Resist. Updat.* 28 (2016) 65–81, <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.07.001>.
- [6] C. Atalay, Multi-drug resistance and cancer, *Expert Opin. Ther. Pat.* 17 (2007) 511–520, <https://doi.org/10.1517/13543776.17.5.511>.
- [7] K.V. Rao, T.J. McBride, J.J. Oleson, Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent, *Cancer Res.* 28 (1968) 1952–1954.
- [8] J.B. Block, A.A. Serpick, W. Miller, P.H. Wiernik, Early clinical studies with lapachol (NSC-11905), *Cancer Chemother. Rep.* 2 (4) (1974) 27–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4614904>.
- [9] F. Epifano, S. Genovese, S. Fiorito, V. Mathieu, R. Kiss, Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review, *Phytochem. Rev.* 13 (2014) 37–49, <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9289-1>.
- [10] H. Jahangirian, E.G. Lemraski, T.J. Webster, R. Rafiee-Moghaddam, Y. Abdollahi, A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: Green nanomedicine, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 2957–2978, <https://doi.org/10.2147/IJN.S127683>.
- [11] R. Aboofazeli, Nanoemulsion-scaled emulsions (nanoemulsions), *Iran, J. Pharm. Res.* 9 (2010) 325–326, <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.897>.
- [12] Y. Singh, J.G. Meher, K. Raval, F.A. Khan, M. Chaurasia, N.K. Jain, M.K. Chourasia, Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *J. Control. Release* 252 (2017) 28–49, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>.
- [13] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *J. Phys. Condens. Matter* 18 (2006) R635–R666, <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>.
- [14] Marcos Luciano Bruschi, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Woodhead Publishing, 2015, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00006-0>.
- [15] L. Chen, B. Chen, L. Deng, B. Gao, Y. Zhang, C. Wu, N. Yu, Q. Zhou, J. Yao, J. Chen, An optimized two-vial formulation lipid nanoemulsion of paclitaxel for targeted delivery to tumor, *Int. J. Pharm.* 534 (2017) 308–315, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.005>.
- [16] B. Kim, C.D. Pena, D.T. Auguste, Targeted lipid nanoemulsions encapsulating epigenetic drugs exhibit selective cytotoxicity on CDH1-FOXM1+ Triple Negative breast cancer cells, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 1813–1826, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01065>.
- [17] M.H. Alkhatib, W.S. Alshehri, F.B. Abdu, In vivo evaluation of the anticancer activity of the gemcitabine and doxorubicin combined in a nanoemulsion, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 10 (2018) 35–42, <https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS.225.17>.
- [18] K. Shanmugapriya, H. Kim, H.W. Kang, In vitro antitumor potential of astaxanthin nanoemulsion against cancer cells via mitochondrial mediated apoptosis, *Int. J. Pharm.* 560 (2019) 334–346, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.015>.
- [19] F.V.S. Rodrigues, L.S. Diniz, R.M.G. Sousa, T.D. Honorato, D.O. Simão, C.R. M. Araújo, T.M. Gonçalves, L.A. Rolim, P.L. Goto, A.C. Tedescoc, M.P. Siqueira-Moura, Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone, *Quim. Nova* 41 (2018) 756–761, <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170247>.
- [20] D.P. De Santana, S.G.C. Fonseca, D.C.G. Bedor, L.B. Leal, J.A. Silva, Aplicação termoanalítica no desenvolvimento e caracterização de micropartículas de PLGA contendo lapachol, *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* 29 (2008) 261–266 (Accessed July 29, 2020), [http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/593/516](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/593/516).
- [21] M.A.M. Tabosa, A.R.B. de Andrade, A.A.M. Lira, V.H.V. Sarmiento, D.P. de Santana, L.B. Leal, Microemulsion Formulations for the Transdermal Delivery of Lapachol, *AAPS PharmSciTech* 19 (2018) 1837–1846, <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0995-2>.
- [22] A.A.M. Lira, E.D.A. Sester, L.R.P. Abreu, L.B.L. Da Silva, A.G. Wanderley, D.P. De Santana, Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: Estudo de permeação in vitro, *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* 40 (2004) 35–41, <https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000100007>.
- [23] A.A.M. Lira, E.A. Sester, A.L.M. Carvalho, R.R. Strattmann, M.M. Albuquerque, A. G. Wanderley, D.P. Santana, Development of lapachol topical formulation: Anti-inflammatory study of a selected formulation, *AAPS PharmSciTech* 9 (2008) 163–168, <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9002-z>.
- [24] S.G.C. Fonseca, L.B.L. Da Silva, R.F. Castro, D.P. De Santana, Validation of the analytical methodology for evaluation of lapachol in solution by HPLC, *Quim. Nova* 27 (2004) 157–159, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100026>.
- [25] D.W. Malcolm, J.J. Varghese, J.E. Sorrells, C.E. Oviatt, D.S.W. Benoit, The effects of biological fluids on colloidal stability and siRNA delivery of a pH-Responsive micellar nanoparticle delivery system, *ACS Nano* 12 (2018) 187–197, <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05528>.
- [26] R.S. Fernandes, J. De Oliveira Silva, S.C.A. Lopes, S. Chondrogianis, D. Rubello, V. N. Cardoso, M.C. Oliveira, L.A.M. Ferreira, A.L.B. De Barros, Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification, *Nucl. Med. Commun.* 37 (2016) 307–312, <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000443>.
- [27] S.E. Miranda, J.A. Lemos, R.S. Fernandes, F.M. Ottoni, R.J. Alves, A. Ferretti, D. Rubello, V.N. Cardoso, A.L. Branco de Barros, Technetium-99m-labeled lapachol as an imaging probe for breast tumor identification, *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol.* 38 (2019) 167–172, <https://doi.org/10.1016/j.rem.2018.10.006>.
- [28] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 1112–1116, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- [29] E.A. Leite, C.M. Souza, A.D. Carvalho-Júnior, L.G.V. Coelho, A.M.Q. Lana, G. D. Cassali, M.C. Oliveira, Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity, *Int. J. Nanomedicine* 7 (2012) 5259–5269, <https://doi.org/10.2147/IJN.S34652>.
- [30] D.C. Litzinger, A.M.J. Buiting, N. van Rooijen, L. Huang, Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphiphilic poly(ethylene glycol)-containing liposomes, *BBA - Biomembr.* 1190 (1994) 99–107, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90038-8).
- [31] R.A. Petros, J.M. Desimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 615–627, <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- [32] D. Liu, D.T. Auguste, Cancer targeted therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles, *J. Control. Release* 219 (2015) 632–643, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.041>.
- [33] S.S. Davis, Pharmaceutical aspects of intravenous fat emulsions, *Eur. J. Hosp. Pharm. Sci. Pract. (September)* (1974) 165–171.
- [34] J. Brouwers, M.E. Brewster, P. Augustijn, Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2549–2572, <https://doi.org/10.1002/jps.21650>.
- [35] Y. Li, J. Zheng, H. Xiao, D.J. McClements, Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization, *Food Hydrocoll.* 27 (2012) 517–528, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.017>.
- [36] D.B. Warren, H. Benameur, C.J.H. Porter, C.W. Pouton, Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: a mechanistic basis for utility, *J. Drug Target.* 18 (2010) 704–731, <https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.525652>.
- [37] F. Bruxel, M. Laux, L.B. Wild, M. Fraga, L.S. Koester, H.F. Teixeira, Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos, *Quim. Nova* 35 (2012) 1827–1840, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>.
- [38] U.S.P. Convention, The United States Pharmacopeia: USP 41: The National Formulary: NF 36, 34th ed., Rockville, Md. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2018.
- [39] K. Amin, R.-M. Dannenfels, In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 1173–1176, <https://doi.org/10.1002/jps.20627>.
- [40] A. Esteves-Souza, K.A. Lucio, A.S. Da Cunha, A. Da Cunha Pinto, E.L. Da Silva Lima, C.A. Camara, M.D. Vargas, C.R. Gattass, Antitumoral activity of new polyamine-naphthoquinone conjugates, *Oncol. Rep.* 20 (2008) 225–231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575741>.
- [41] K.O. Eyoung, P.S. Kumar, V. Kuete, G.N. Folefoc, E.A. Nkengfack, S. Baskaran, Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfluranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 5387–5390, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.053>.
- [42] M.C.F. da Linardi, M.M. de Oliveira, M.R.P. Sampaio, A Lapachol Derivative Active against Mouse Lymphocytic Leukemia P-388, *J. Med. Chem.* 18 (1975) 1159–1161, <https://doi.org/10.1021/jm00245a027>.
- [43] W. Kandlioller, E. Balsano, S.M. Meier, U. Jungwirth, S. Göschl, A. Roller, M. A. Jakupec, W. Berger, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Organometallic anticancer complexes of lapachol: Metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity, *Chem. Commun.* 49 (2013) 3348–3350, <https://doi.org/10.1039/c3cc40432c>.
- [44] A. Ventura Pinto, S. Lisboa de Castro, The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review, *Molecules* 14 (2009) 4570–4590, <https://doi.org/10.3390/molecules14114570>.

- [45] C. Zhang, Y. Qu, B. Niu, Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2016) 5781–5786, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.034>.
- [46] A.J. Trevor, B.G. Katzung, M. Knudering-Hall, *Cancer chemotherapy. Katzung Trevor's Pharmacol. Exam. Board Rev., 12th ed., McGraw-Hill Medical Publishing (Ed.), 2012.*
- [47] D.F. Driscoll, Lipid Injectable Emulsions: Pharmacoepial and Safety Issues, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1959–1969, <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9092-4>.
- [48] T.U.S.P. Convention, *GLOBULE Size Distribution in Lipid Injectable Emulsions - USP32-NF27, 2012, pp. 2011–2013.*
- [49] B. Arechabala, C. Coiffard, P. Rivalland, L.J.M. Coiffard, Y. De Roeck-Holtzhauer, Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release, *J. Appl. Toxicol.* 19 (1999) 163–165, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199905/06\)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H).
- [50] R.K. Varma, R. Kaushal, A.Y. Junnarkar, G.P. Thomas, M.U. Naidu, P.P. Singh, R. M. Tripathi, D.R. Shridhar, Polysorbate 80: a pharmacological study, *Arzneimittelforschung* 35 (1985) 804–808. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4026903>.
- [51] C.Y. Lui, A.A. Ayeni, C. Gyllenhaal, M.J. Groves, Some formulation properties of lapachol, a potential oncolytic agent of natural origin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 11 (1985) 1763–1779, <https://doi.org/10.3109/03639048509057698>.
- [52] C.M.R. Oda, R.S. Fernandes, S.C. de Araújo Lopes, M.C. de Oliveira, V.N. Cardoso, D.M. Santos, A.M. de Castro Pimenta, A. Malachias, R. Paniago, D.M. Townsend, P. M. Colletti, D. Rubello, R.J. Alves, A.L.B. de Barros, E.A. Leite, Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 268–275, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.144>.
- [53] G.W. Aherne, A. Hardcastle, F. Raynaud, A.L. Jackman, Immunoreactive dUMP and TTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition; effect of tomudex (ZD1694) and a nonpolyglutamated quinazoline antifolate (CB30900) in L1210 mouse leukaemia cells, *Biochem. Pharmacol.* 51 (1996) 1293–1301, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00035-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00035-4).
- [54] S. Sindhvani, A.M. Syed, J. Ngai, B.R. Kingston, L. Maiorino, J. Rothschild, P. MacMillan, Y. Zhang, N.U. Rajesh, T. Hoang, J.L.Y. Wu, S. Wilhelm, A. Zilman, S. Gadde, A. Sulaiman, B. Ouyang, Z. Lin, L. Wang, M. Egeblad, W.C.W. Chan, The entry of nanoparticles into solid tumours, *Nat. Mater.* 19 (2020) 566–575, <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.
- [55] K.J. Chavez, S.V. Garimella, S. Lipkowitz, Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer, *Breast Dis.* 32 (2010) 35–48, <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>.
- [56] P. Kau, G.M. Nagaraja, H. Zheng, D. Gizachew, M. Galukande, S. Krishnan, A. Asea, A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease, *BMC Cancer* 12 (2012), <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-120>.
- [57] M.O.F. Goulart, P. Falkowski, T. Ossowski, A. Liwo, Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions, *Bioelectrochemistry* 59 (2003) 85–87, [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(03)00005-7).
- [58] Z. Darzynkiewicz, E. Bedner, F. Traganos, Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis, *Methods Cell Biol.* 63 (2001) 527–546, [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(01\)63028-0](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(01)63028-0).
- [59] H. Lecoeur, M.C. Prévost, M.L. Gougeon, Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: A reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay, *Cytometry* 44 (2001) 65–72, [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010501\)44:1<65::AID-CYTO1083>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010501)44:1<65::AID-CYTO1083>3.0.CO;2-Q).
- [60] H. Lecoeur, M.T. Melki, H. Saïdi, M.L. Gougeon, Chapter three analysis of apoptotic pathways by multiparametric flow cytometry: application to HIV infection, *Methods Enzymol.* 442 (2008) 51–82, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)01403-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01403-1).
- [61] H. Zhao, H. Lu, T. Gong, Z. Zhang, Nanoemulsion loaded with lycobetaine-oleic acid ionic complex: Physicochemical characteristics, in vitro, in vivo evaluation, and antitumor activity, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013) 1959–1973, <https://doi.org/10.2147/IJN.S43892>.
- [62] M. Han, C.X. He, Q.L. Fang, X.C. Yang, Y.Y. Diao, D.H. Xu, Q.J. He, Y.Z. Hu, W. Q. Liang, B. Yang, J.Q. Gao, A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo, *Pharm. Res.* 26 (2009) 926–935, <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9795-9>.