



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas de PLGA e gordura de murumuru contendo β -lapachona: preparação, caracterização e atividade citotóxica.

Anna Carolina Avelar de Araujo Pontes

BELÉM-PA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas de PLGA e gordura de murumuru contendo β -lapachona: preparação, caracterização e atividade citotóxica.

Autora: Anna Carolina Avelar de Araujo Pontes
Orientadora: Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para o título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde / UFPA

Pontes, Anna Carolina Avelar de Araujo, 1990-

Nanocápsulas de PLGA e gordura de murumuru contendo β -lapachona: preparação, caracterização e atividade citotóxica / Anna Carolina Avelar de Araujo Pontes; orientadora, Alaíde Braga de Oliveira, co-orientadora, Jaqueline Rodrigues da Silva. - 2016.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

1. *Astrocaryum murumuru* Mart. 2. Plantas medicinais. 3. Nanocápsulas.
4. Método de Nanoprecipitação. I. Título.

CDD: 22. ed. : 615.321

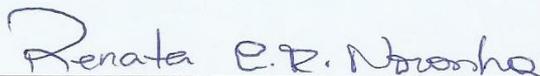
ANNA CAROLINA AVELAR DE ARAUJO PONTES

**NANOCÁPSULAS DE PLGA E GORDURA DE MURUMURU CONTENDO
β-LAPACHONA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
CITOTÓXICA.**

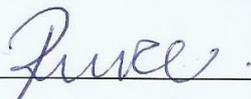
Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para o título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 30 / 09 / 2016

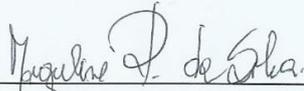
BANCA EXAMINADORA



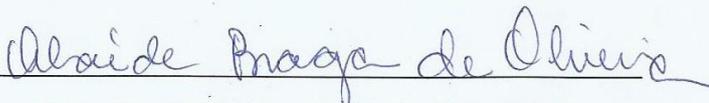
Profa. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha
Instituição: Universidade Federal do Pará



Profa. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa
Instituição: Universidade Federal do Pará



Profa. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva (Co-orientadora)
Instituição: Universidade de Brasília



Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira (Orientadora)
Instituição: Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e todos os meus esforços a Deus, meu criador, Senhor, salvador e amigo e aos meus pais, refúgio e fonte de apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor incondicional, sua graça abundante, sua misericórdia sem fim, por ser meu refúgio e fortaleza, pela sua fidelidade apesar de mim.

Aos meus pais, Deodato Pontes Junior e Rute Helena Pontes, obrigada pelo amor sempre presente de vocês, pelo apoio nas minhas decisões e encorajamento, pelos sacrifícios e investimento nesta caminhada, pela torcida e orações, por se alegrarem comigo e se orgulharem de mim. Amo vocês, essa vitória é nossa.

À minha família, pelo incentivo sempre, e por fazerem da minha alegria a de vocês.

Ao meu querido Thiago Freitas Silva, pelo seu amor e cuidado, achego, encorajamento e auxílio que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos amigos não científicos pela amizade, palavras de ânimo, momentos de alegria e descontração, por dividirem as cargas emocionais, pelas orações e torcida. Vocês são preciosos pra mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira, por aceitar o desafio de me orientar neste trabalho, pelo investimento, pelos ensinamentos na teoria e na bancada, pela paciência, compreensão, doçura no trato, ânimo e incentivo.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva, por me apresentar à nanobiotecnologia, pelo privilégio de me permitir realizar este trabalho, por me dar a oportunidade de desenvolvê-lo sob as melhores condições no Laboratório de Nanobiotecnologia/UNB, pelos ensinamentos, auxílio nos experimentos, pela paciência e encorajamento.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes Azevedo, chefe do Laboratório de Nanobiotecnologia/UNB, por me receber calorosamente e permitir o desenvolvimento da maior parte deste trabalho no seu laboratório. Aos profs. e colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia/UNB pela ajuda, ensinamentos e colaboração, e à secretária Dona Zélia Madeira por toda disponibilidade e favor.

Aos professores Fâni Dolabela (Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas/UFPA), Wagner Luiz Ramos Barbosa (Laboratório de Fitoquímica/UFPA), José Otávio Carréra Silva Júnior (Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético/UFPA) e Roseane Maria Ribeiro Costa (Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica/UFPA) pelo apoio e colaboração permitindo que etapas deste trabalho fossem realizadas nos laboratórios sob sua chefia.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas/UFPA Valdicley Vale, Nayla Pina e Rosana Sarmento pela amizade, colaboração e ajuda em momentos deste trabalho.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia/UFPA de diversos laboratórios pela convivência, amizade, ajuda, troca de conhecimento e experiências ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão (UFOP) pelas análises de Espectrometria de Massas e à doutoranda Tatiane Borgati (UFMG) pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria no Infravermelho.

Ao doutorando Diego Juscelino Dias (UNB) pela amizade, palavras de ânimo, e análises de Espectrometria no Infravermelho.

Ao doutorando Antônio Taylon Aguiar (UFPA) pelas análises de CLAE-DAD para determinação da eficiência de encapsulação.

Ao Instituto de Química/UNB e ao Projeto FINEP-CITINFRA/2006 pelos recursos financeiros que permitiram as análises termogravimétricas.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFPA, Cliciane e Dona Brasília pelo serviço, amizade e carinho durante esta trajetória.

Às agências de fomento Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Nanobiotecnologia, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

PONTES, A.C.A.A. **NANOCÁPSULAS DE PLGA E GORDURA DE MURUMURU CONTENDO β -LAPACHONA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CITOTÓXICA.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

A β -lapachona (β -lap) é uma naftoquinona natural, encontrada como constituinte minoritário em algumas espécies de ipês (gênero *Handroanthus* sp., família Bignoniaceae) com propriedades farmacológicas como atividade antimicrobiana, tripanocida e anticancerígena. Entretanto sua aplicação terapêutica é um desafio devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso e alta toxicidade. Com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade deste composto e aumentar sua segurança, diferentes sistemas carreadores com tamanhos nanométricos vêm sendo desenvolvidos. As nanocápsulas (NC's) de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru (NCMM) foram a escolha deste estudo para encapsular e carregar a β -lap. A extração e síntese da β -lap do lapachol da serragem de ipê promoveu um rendimento de 92,3%. Utilizando o método de nanoprecipitação, as nanocápsulas produzidas contendo β -lap (NCMM β -lap) apresentaram forma esférica, superfície rugosa, tamanho médio entre $132,5 \pm 2,0$ e $149 \pm 1,3$, índice de polidispersão $< 0,2$, potencial zeta entre $-0,009 \pm 0,2$ e $0,15 \pm 0,2$ e uma eficiência de encapsulação de 94,3%. As NCMM β -lap apresentaram citotoxicidade dose e tempo-dependente, para as linhagens celulares NIH/3T3 e MCF7, sendo mais tóxica que β -lap livre nas mesmas concentrações, e seletiva para linhagem tumoral MCF7. Os mecanismos de morte celular da β -lap livre e de NCMM β -lap foram muitos semelhantes, observando-se produção de ERO, fragmentação do DNA, bloqueio das células em fases de checagem, e indicação de apoptose tardia e necrose. Em suma, o encapsulamento da β -lap potencializou a atividade anticancerígena e sugeriu maior segurança na aplicação desta droga, apontando NCMM β -lap como uma alternativa promissora para viabilizar a utilização da β -lap na clínica.

Palavras-chave: *Astrocaryum murumuru* Mart.; nanocápsulas poliméricas; nanoprecipitação

ABSTRACT

PONTES, A.C.A.A. **PLGA NANOCAPSULES WITH FAT MURUMURU CONTAINING β -LAPACHONE: PREPARATION, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC ACTIVITY.** Master Thesis, Posgraduate program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2016.

The β -lapachone (β -lap) is a natural naphthoquinone, found as a minor constituent in some species of ipe (gender *Handroanthus* Mattos) with pharmacological properties such as antimicrobial, anticancer and trypanocidal activities. However, their therapeutic application is challenging due to its low aqueous solubility, and high toxicity. In order to improve the bioavailability of this compound and increase its safety, different carrier systems with nanometric sizes have been developed. The nanocapsules (NC's) PLGA with oil core of murumuru fat (NCMM) were the choice for this study to encapsulate and load the β -lap. The extraction and synthesis of β -Lap of ipe sawdust lapachol promoted a yield of 92.3%. Using the nanoprecipitation method, the produced nanocapsules containing β -lap (NCMM β -lap) showed spherical shape, surface roughness, average size between 2.0 and $132.5 \pm 1.3 \pm 149$, polydispersity <0.2 , zeta potential of -0.009 ± 0.2 and 0.15 ± 0.2 and an encapsulation efficiency of 94.3%. The NCMM β -lap cytotoxicity showed dose- and time-dependent for the cell lines NIH/3T3 and MCF7, being more toxic than free β -lap in the same concentrations, and selective for tumor cell line MCF7. The mechanisms of cell death of free β -lap and NCMM β -lap were very similar, observing ROS, DNA fragmentation, interlock of cells in check phases, and indication of late apoptosis and necrosis. In short, the encapsulation of β -lap potentiated the anticancer activity and suggested greater certainty in the application of this drug, pointing NCMM β -lap as a promising alternative to enable the use of β -lap at the clinic.

Keywords: *Astrocaryum murumuru* Mart.; polymer nanocapsule; nanoprecipitation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura química da β -lapachona. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.....22
- Figura 2.** Cristais de β -lapachona. (A) Aspecto microscópico; (B) Aspecto macroscópico. Fonte: Cunha-Filho *et al.*, 2008.....23
- Figura 3.** Ciclo redox parcial da β -lapachona. Fonte: Ferreira *et al.*, 2010.....26
- Figura 4.** Vias metabólicas da β -lapachona. (A) Formação dos metabólitos por enzimas de fase II; (B) Metabólitos formados em microssomas de fígado humano. Fonte: Adaptado de Savage *et al.*, 2008 e Lee *et al.*, 2013.....28
- Figura 5.** Linha do tempo do estudo e desenvolvimento de alguns sistemas carreadores de fármaco. Fonte: Adaptado de Shi *et al.*, 2010.31
- Figura 6.** Diferentes tipos de nanocarreadores de fármacos. Fonte: Adaptado de Wicki *et al.*, 2015.....31
- Figura 7.** Ilustração da estrutura de nanoesferas e nanocápsulas. Fonte: Adaptado de Sanna *et al.*, 2013.33
- Figura 8.** Estrutura química do PLGA. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.35
- Figura 9.** A: Formação do triglicerídeo; B: Tipos de ácidos graxos. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.40
- Figura 10.** Foto da palmeira (A), do fruto e da polpa (B); e da manteiga (C) do *Astrocaryum murumuru*, da família Arecaceae. Fonte: <https://cosmeticosararajuba.com/2015/11/20/sabonete-de-murumuru/>. Acessado em agosto/2016.....43
- Figura 11.** Esquema do desenho experimental.45
- Figura 12.** Estruturas químicas do lapachol, da β -lapachona e da α -lapachona. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.46
- Figura 13.** Esquema da preparação da suspensão de nanocápsulas. Adaptado de Santos *et al.*, 2016.55

Figura 14. Placa de CCD das amostras do lapachol extraído da serragem de ipê, da α -lapachona cedida e da β -lapachona sintetizada a partir do lapachol. Eluente: Diclometano:n-hexano 8:2; Revelador: Ácido sulfúrico a 6%.....	67
Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE-DAD, a 280 nm, e espectro no UV do lapachol.....	69
Figura 16. Cromatograma obtido por CLAE-DAD, a 350 nm, e espectro no UV da β -lapachona.....	69
Figura 17. Espectro no infravermelho do lapachol.	71
Figura 18. Espectro no infravermelho da β -lapachona	72
Figura 19. Espectro no infravermelho da α -lapachona.....	73
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H do lapachol (CDCl_3 , 200 MHz).....	75
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).	77
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).	79
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona e da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).....	81
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 do lapachol (CDCl_3 , 200 MHz).....	83
Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 da β -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz). .	83
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).	84
Figura 27. Formulações de nanocapsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru após 60 dias de armazenamento a 4°C. NCMM (nanocápsula vazia) e NCMM β -lap (nanocápsula contendo β -lapachona).	87
Figura 28. Curva de calibração para β -lapachona.....	88
Figura 29. Fotomicrografia das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona. Solução de NC a 5% em água ultrapura. Aumento de 4.000x.	90
Figura 31. Curvas TGA de nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona (NCMM β -lap) e seus constituintes (PLGA, gordura de murumuru e β -lapachona).....	93
Figura 32. Espectro de Massas da β -lap (A) e da NCMM β -lap (B) por CLUE-ESI-EM no modo positivo.	94

Figura 33. Viabilidade celular em células NIH/3T3 (A) e MCF7 (B) por MTT, após incubação de 24 horas com DMSO e NCMM e DMSO. Os valores do eixo de X são valores relativos às concentrações testadas de nanocápsulas	96
Figura 34. Viabilidade celular em células NIH/3T3 (A) e MCF7 (B) por MTT, após incubação de 24 horas com β -lapachona livre (β -lap) e β -lapachona encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap). Os dados são expressos como porcentagem da média e desvio padrão da triplicata.....	98
Figura 35. Viabilidade celular em células NIH/3T3 por MTT, após incubação de 48h (A) e 72h (B) com β -lapachona livre (β -lap) e encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap). Os dados são expressos como porcentagem da média e desvio padrão da triplicata de três experimentos independentes; usando como 100% as células incubadas apenas com meio de cultura.	99
Figura 36. Viabilidade celular em células MCF7 por MTT, após incubação de 48h (A) e 72h (B) com β -lapachona livre (β -lap) e encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap). Os dados são expressos como porcentagem da média e desvio padrão da triplicata de três experimentos independentes; usando como 100% as células incubadas apenas com meio de cultura.	100
Figura 37. Gráficos em Dot plots FSC x SSC (Tamanho x Granulosidade) em citometria de fluxo de células tumorais MCF7 e 4T1 expostas a β -lapachona livre e NCMM β -lap por 48 horas.	103
Figura 38. Avaliação do tipo de morte celular em células MCF7 (A) e 4T1 (B) expostas à β -lapachona e NCMM β -lap por 48 horas. Marcação IP (iodeto de propídio), AN (anexina V-FITC).....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade da β -lapachona em diferentes linhagens celulares.....	24
Tabela 2. Lista de medicamentos a base de PLGA aprovados pelo FDA e disponíveis no mercado.....	36
Tabela 3. Composição em ácidos graxos da gordura de murumuru.	42
Tabela 4. Bandas de absorção identificadas nos espectros de infravermelho do lapachol, β -lapachona e α -lapachona.....	70
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) do lapachol extraído da serragem do ipê e comparação com a literatura.	76
Tabela 6. Dados de RMN ^1H (200 MHz) da β -lapachona e comparação com a literatura.	78
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) da α -lapachona e comparação com a literatura.	80
Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C (200 MHz) do lapachol, β -lapachona e α -lapachona.	82
Tabela 9. Estabilidade de suspensões de nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru, em função do tempo. NCMM (nanocápsulas vazias) e NCMM β -lap (nanocápsulas contendo β -lapachona).....	87
Tabela 10. Áreas dos picos e concentrações da curva de calibração para quantificação da β -lapachona.....	89
Tabela 11. Bandas de absorção identificadas nos espectros de FTIR da β -lapachona, do PLGA e da gordura de murumuru.	92
Tabela 12. Valores de CI_{50} e índice de seletividade (IS) de NCMM β -lap e β -lapachona livre nos tempos de 24, 48 e 72 horas nas células MCF7 e NIH/3T3.....	101
Tabela 13. Fragmentação do DNA em células 4T1 expostas à β -lapachona e NCMM β -lap por 48 horas. A marcação do DNA foi realizada utilizando o iodeto de propídio.....	106
Tabela 14. Ciclo celular em células MCF7 expostas à β -lapachona e NCMM β -lap por 48 horas.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4T1	Células de carcinoma mamário murino
ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
AN/IP	Anexina V/Iodeto de propídeo
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Refletância Total Atenuada
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjos de Diôdo
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
EM	Espectometria de massas
EMA	<i>European medicin agency</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>Eletrospray Ionization</i>
FACS	Análise por citometria de fluxo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC-H	Tamanho das células analisada por citometria
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GST	Glutathiona-S tranferase
HPβ-CDβ-lap	Hidroxipropil-β-ciclodextrina com β-lapachona

IP	Iodeto de propídio
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
MCF-7	Adenocarcinoma humano de células epiteliais do tecido mamário
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NC	Nanocápsulas
NCMM	Nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) e gordura de murumuru
NCMM β -lap	β -lapachona encapsulada em nanocápsulas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) e gordura de murumuru
NIH/3T3	Células de fibroblasto de tecido embrionário de camundongos <i>Mus musculus</i>
NQO1	Quinona-oxidoreductase
PARP	Poli(adenosina difosfato) ribose-polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
PDI	Índice de polidispersão
PGA	Polímeros de ácido glicólico
PIA	Proteínas inibidoras de apoptose
PLA	Polímeros de ácido láctico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PLGA-PEG	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) – polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
RNM	Ressonância magnética nuclear
RNM ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RNM ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SSC-H	Granulosidade das células analisada por citometria
SULT	Sulfotranferase
TGA	Análise termogravimétrica
TMS	Tetrametilsilano
UGT	Uridina difosfato glucuronosiltransferase
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV	Ultravioleta
β -lap	β -lapachona

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Eficiência de encapsulação	57
Equação 2. Índice de seletividade	63
Equação 3. Concentração da β -lapachona na formulação	88

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
>	Maior
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
kN	Quilonewton
torr	Torricelli
ppm	Parte por milhão
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
g	Gramma
<i>J</i>	Acoplamento <i>J</i>
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mV/s^2	Microvolts por segundo ao quadrado
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
cm^{-1}	Número de onda
RPM	Rotação Por Minuto
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CDCL_3	Clorofórmio deuterado
CO_2	Gás carbônico
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$\text{HO}\cdot$	Radical hidroxila
NaCl	Cloreto de sódio
O_2	Oxigênio molecular
$\text{Q}\cdot-$	Ânion hidroquinona

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 β -lapachona	22
2.2 Nanotecnologia e Sistemas Carreadores de fármacos	30
2.3 Nanopartículas poliméricas	33
2.4 Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).....	35
2.5 Gordura de murumuru: Um produto natural da Amazônia	39
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Desenho experimental	45
4.2 1º Etapa: Síntese química e caracterização da β -lapachona	46
4.2.1 EQUIPAMENTOS	47
4.2.2 ADSORVENTES, REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES	47
4.2.3 VIDRARIAS E OUTROS	48
4.2.4 ETAPAS DA SÍNTESE	48
4.2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LAPACHOL E DA β -LAPACHONA....	50
4.3 2º Etapa: Preparação e caracterização das nanocápsulas (NC) de PLGA e núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona.	52
4.3.1 EQUIPAMENTOS	52
4.3.2 REAGENTES, SOLUÇÕES E SOLVENTES	53
4.3.3 VIDRARIAS E OUTROS.....	53
4.3.4 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS (NC) DE PLGA	53
4.3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS.....	55
4.4 3º Etapa: Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	60
4.4.1 EQUIPAMENTOS	60

4.4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS	60
4.4.3 LINHAGEM CELULAR.....	61
4.4.4 CULTURA DE CÉLULAS.....	61
4.4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	61
4.4.6 CITOMETRIA DE FLUXO	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 Isolamento do lapachol e Síntese da β -lapachona.....	67
5.2 Análise por CLAE-DAD	68
5.3 Análise por Espectrometria no infravermelho.....	70
5.4 Análise por RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 135.....	74
5.5 Nanocápsulas (NC) de PLGA com Núcleo Oleoso de gordura de murumuru..	85
5.6 Eficiência de encapsulação da β -lapachona em nanocápsula de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.	88
5.7 Morfologia das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.....	90
5.8 Investigação molecular das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.	91
5.9 Análise térmica nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.....	93
5.10 Identificação de íon molecular da β -lapachona nas nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.....	94
5.11 Avaliação da citotoxicidade das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona	95
5.12 Análise por citometria de fluxo	102
6 CONCLUSÕES	107
7 REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS	126

1 INTRODUÇÃO

A β -lapachona é uma naftoquinona natural, encontrada como constituinte minoritário em algumas espécies do gênero *Handroanthus* Mattos (sinonímia *Tabebuia* Gomes ex DC.), da família Bignoniaceae, conhecidas no Brasil como ipês (Ferreira *et al.*, 2010). Esta naftoquinona destaca-se nesta classe de substâncias naturais porque apresenta atividades antimicrobiana, tripanocida e anticancerígena (Cavalcante *et al.*, 2008), além de ter sido estudada em testes clínicos de fase I e II para o tratamento do câncer de tumores sólidos, pâncreas, cabeça, pescoço e leiomiosarcoma (USNIH, 2016). A β -lapachona tem a capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio (ERO), causando danos celulares irreversíveis os quais promovem a morte celular (Pink *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011). A sua citotoxicidade pode ocorrer em células cancerosas e não cancerosas, atuando em enzimas topoisomerasas, que são importantes para a replicação do DNA (Pardee *et al.*, 2002). Apesar do seu elevado potencial como possível fármaco, vários fatores limitam sua aplicação em avaliações pré-clínicas e extrapolação clínica, como: i- alta lipossolubilidade, o que acelera sua eliminação (Nasongkla *et al.*, 2003), ii- inativação por enzimas plasmáticas (Amol e Pratibha, 2014), e iii- a sua não-especificidade que pode levar a uma distribuição desigual no organismo, com baixas concentrações no tumor e alta toxicidade sistêmica (Ough *et al.*, 2005). Estas limitações provocam a necessidade de várias administrações em altas dosagens para manutenção do efeito terapêutico, o que traz implicações na qualidade de vida do paciente como aumento do risco de reações adversas.

Diante disso, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos usando a nanotecnologia para produção de nanopartículas, diferente da administração de fármacos livres, é uma alternativa para aprimoramento da biodisponibilidade, biodistribuição e das propriedades farmacológicas dos mesmos. Estes sistemas apresentam capacidade de: i- melhorar a solubilidade do fármaco em meio aquoso, por meio do encapsulamento, com aumento do tempo de meia-vida plasmática; ii- liberar o fármaco em taxas sustentadas, diminuindo o número de administrações e aumentando a biodisponibilidade; iii- especificidade, quando acoplado a um ligante, ao atingir o sítio-alvo, com diminuição do risco das reações

adversas e toxicidade (Khalil *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013). Estes sistemas incorporando biomoléculas com atividade farmacológica contribuem ainda para o aumento do valor terapêutico destas e redução dos problemas associados a moléculas extraídas de plantas medicinais que, em geral, são lipossolúveis, por promover melhora na solubilidade e na estabilidade da molécula, protegendo contra degradações físico-químicas inerentes das moléculas quando em fluídos biológicos (Amol e Pratibha, 2014).

Dentre estes sistemas, encontram-se as nanocápsulas poliméricas que são uma classe de nanocarreadores formados por um núcleo oleoso circundado por uma parede polimérica com alta capacidade de encapsulamento de fármacos hidrofóbicos (Coradini *et al.*, 2014) apresentando-se portanto, como boa escolha para encapsulamento da β -lapachona. No centro oleoso das nanopartículas podem ser utilizados óleos minerais ou vegetais de origem variada. Entretanto, óleos vegetais são preferíveis por serem orgânicos e biocompatíveis (Drozdek e Bazylińska, 2016). A utilização de óleos de origem amazônica possibilita o emprego de matérias-primas nacionais, promovendo a sustentabilidade e favorecendo a economia das populações nativas (Bezerra, 2008; Sousa *et al.*, 2004; Clement *et al.*, 2005).

Nanocápsulas são um sistema coloidal complexo, e por isso é sujeito a instabilidade com perda da homogeneidade, separação de fases e variações no tamanho por fenômenos como a agregação ou degradação (Venturini *et al.*, 2011), assim a caracterização e avaliação da estabilidade desse tipo de sistema são imprescindíveis. Além disso, para produtos biológicos se faz necessário também a avaliação biológica. A atividade biológica é a habilidade ou a capacidade específica do produto de conseguir um efeito biológico definido, assim a avaliação biológica se trata de uma medida de qualidade da “função” do produto que pode ser usada para determinar se um produto possui o nível adequado da atividade, a fim de comprovar sua eficácia como também investigar e assegurar sua segurança (Anvisa, 2011).

Neste contexto, este estudo se propõe a extrair e sintetizar a β -lapachona do lapachol da serragem de ipê; e preparar, caracterizar e avaliar *in vitro* um sistema nanoparticulado de PLGA com um núcleo oleoso de gordura de murumuru, que viabilize a utilização de forma mais segura e eficaz da β -lapachona.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 β -lapachona

A β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b] pirano-5,6-diona) (Figura 1) é uma substância natural que faz parte da família das quinonas, da classe das naftoquinonas, sendo encontrada como constituinte minoritário do cerne de árvores das famílias Verbenaceae, Proteaceae e especialmente Bignoniaceae, do gênero *Handroanthus* Mattos (sinonímia *Tabebuia* Gomes ex DC.), conhecidas no Brasil como ipês (Ferreira *et al.*, 2010).

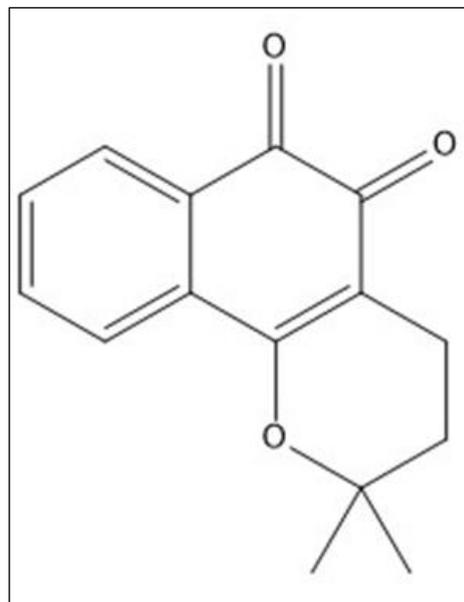


Figura 1. Estrutura química da β -lapachona. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.

A β -lapachona pode ser sintetizada facilmente em laboratório, a partir do lapachol extraído da serragem da madeira de várias espécies de ipês, por ciclização catalisada por ácido. Esta reação produz tanto β -lapachona quanto seu isômero α -lapachona, sendo a formação da primeira predominante devido ao meio ácido. Para obtenção de β -lapachona pura realiza-se processo de separação dos isômeros por

cromatográfica em coluna de sílica gel. A α -lapachona não possui atividade biológica significativa (Silva *et al.*, 2003; Rios-Luci *et al.*, 2012).

Quanto às características físico-químicas de β -lapachona, trata-se de um produto policristalino acicular (Figura 2A) de pigmentação laranja-avermelhada (Figura 2B) (Cunha-Filho *et al.*, 2008) com massa molecular de 242,3 Da, ponto de fusão entre 154,0 e 156,0°C (Alves *et al.*, 2008), estruturalmente estável entre pH 3 a 9 (Silva *et al.*, 2003), e hidrofóbica, com solubilidade em água de 0,04 mg/mL (Nasongkla *et al.*, 2003).

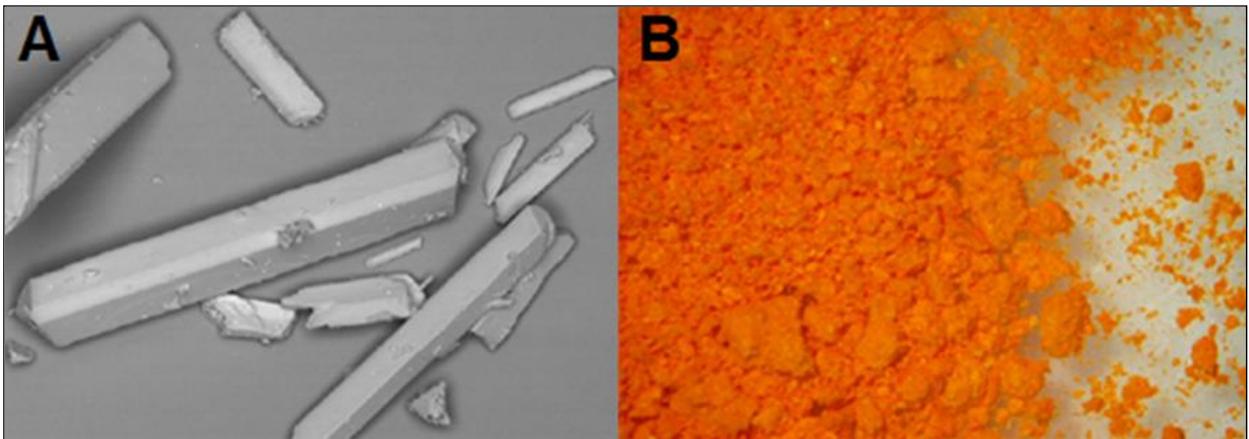


Figura 2. Cristais de β -lapachona. (A) Aspecto microscópico; (B) Aspecto macroscópico. Fonte: Cunha-Filho *et al.*, 2008.

A β -lapachona possui longa história no campo científico como potencial fármaco, e sua relevância pode ser expressa pelo alto número de patentes existentes. O trabalho de Li *et al.* (1993), demonstrando a relação da enzima Topoisomerase I de mamíferos com a reparação do DNA e ação inibidora da β -lapachona sobre esta enzima rendeu seu primeiro registro. Atualmente, a lista se estende para mais de 60 registros que incluem metodologias de análise, avaliação biológica, substâncias derivadas, terapias combinadas e composições farmacêuticas (PubChem, 2016).

O potencial valor terapêutico da β -lapachona se deve às suas inúmeras atividades farmacológicas comprovadas, como antimicrobiana (Macedo *et al.*, 2013; Guiraud *et al.*, 1994); antifúngica (Guiraud *et al.*, 1994; Medeiros *et al.*, 2010), antiplasmódio (Pérez-Sacau *et al.*, 2005), tripanocida (Salas *et al.*, 2008; Silva Júnior *et al.*, 2008), anti-viral (Li *et al.*, 1993; Daelemans *et al.*, 1999), anti-esquistossomal

(Aires *et al.*, 2014), anti-inflamatória, antiarrítmica (Sitônio *et al.*, 2013), cicatrizante (Kung *et al.*, 2008), anti-angiogênica (Kung *et al.*, 2007), e principalmente anticancerígena, apresentando atividade citotóxica para diversas linhagens de células malignas (Tabela 1), antitumoral (Pink *et al.*, 2000), antimetastase e anti-invasiva (Kim *et al.*, 2007), tendo sido avaliada em testes clínicos de fase I e II para o tratamento do câncer de tumores sólidos, pâncreas, cabeça, pescoço e leiomioma (USNIH, 2016).

Tabela 1. Citotoxicidade da β -lapachona em diferentes linhagens celulares.

Linhagem celular	CI ₅₀ (μ M)*	Referência
MCF-7 (câncer de mama)	3,2	Planchon <i>et al.</i> , 1995.
	2,5	Wuerzberger <i>et al.</i> , 1998.
	1,7	Nasongkla <i>et al.</i> , 2003.
	3,0	Bentle, <i>et al.</i> , 2007.
HBL-100 (câncer de mama)	0,69	Bonifazi <i>et al.</i> , 2010
MDAMB-231(câncer de mama)	6,6	Reinicke <i>et al.</i> , 2005
PC-3 (câncer de próstata)	3,5	Reinicke <i>et al.</i> , 2005
DU-145(câncer de próstata)	7,4	Eyong <i>et al.</i> ,2008
HL-60 (leucemia promielocítica)	1,65	Moon <i>et al.</i> ,2010
HCT-8 (câncer colo-retal)	0,83	Silva Júnior <i>et al.</i> , 2007
SF-295 (glioblastoma multiforme)	0,91	Silva Júnior <i>et al.</i> , 2007
HeLa (câncer cervical)	1,0	Flick <i>et al.</i> , 2013; Rios-Luci <i>et al.</i> , 2012.
SW1573 (câncer de pulmão)	0,84	Rios-Luci <i>et al.</i> , 2012.
WHCO1 (câncer do esôfago)	1,6	Sunasse <i>et al.</i> , 2013.
WiDr (câncer de cólon)	2,0	Rios-Luci <i>et al.</i> , 2012.
SKmel-28 (melanoma)	4,0	Li <i>et al.</i> , 1999.

*CI₅₀: Concentração do fármaco que inibe o crescimento de 50% das células testadas.

Do ponto de vista da relação estrutura-atividade, as estruturas quinonoídicas e o anel pirano presentes na β -lapachona são responsáveis pela alta atividade antiproliferativa devido à sua capacidade de induzir o ciclo redox (Bonifazi *et al.*, 2010).

Os mecanismos de morte celular associados à β -lapachona incluem processos de apoptose (Lee *et al.*, 2011), necrose (Park *et al.*, 2014) e autofagia (Park *et al.*, 2011); os quais são promovidos por efeitos dose-dependentes e estão associados principalmente ao ciclo redox catalisado por NAD(P)H e à ação inibidora sobre as topoisomerasas I e II, enzimas responsáveis pela reparação do DNA (Krishnan *et al.*, 2000).

O ciclo redox é mediado pelas enzimas NAD(P)H que possuem função determinante na atividade citotóxica da β -lapachona. Este ciclo configura-se da seguinte forma: NAD(P)H reduz pela retirada de dois elétrons o substrato quinonoídico e forma o ânion hidroquinona ($Q^{\bullet-}$). Esse ânion radical ($Q^{\bullet-}$), na presença de oxigênio molecular (O_2), transfere um elétron e gera o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), este radical, por ação da enzima superóxido desmutase, gera o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), paralelamente por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Harber-Weiss), gera o radical hidroxila (HO^{\bullet}) (Silva *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2010; Siegel *et al.*, 2012). Para eliminar estas espécies oxidantes, a célula promove mecanismos de desintoxicação através de antioxidantes intracelulares. Entretanto, a persistência do ciclo redox resulta em um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de proteção, o que leva a célula a um status pro-oxidante e a danos fatais (Silva *et al.*, 2003; Almeida, 2009) (Figura 3) como peroxidação lipídica, danificação da membrana celular, fragmentação do DNA (DoCampo *et al.*, 1979; Siegel *et al.*, 2012) e consequente hiperativação de poli(ADP-ribose)polimerase I com depleção de NAD^+ /ATP e inibição da reparação do DNA (Bentle *et al.*, 2007), aumento do cálcio intracelular, despolarização e ruptura da membrana mitocondrial (Tagliarino *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2011).

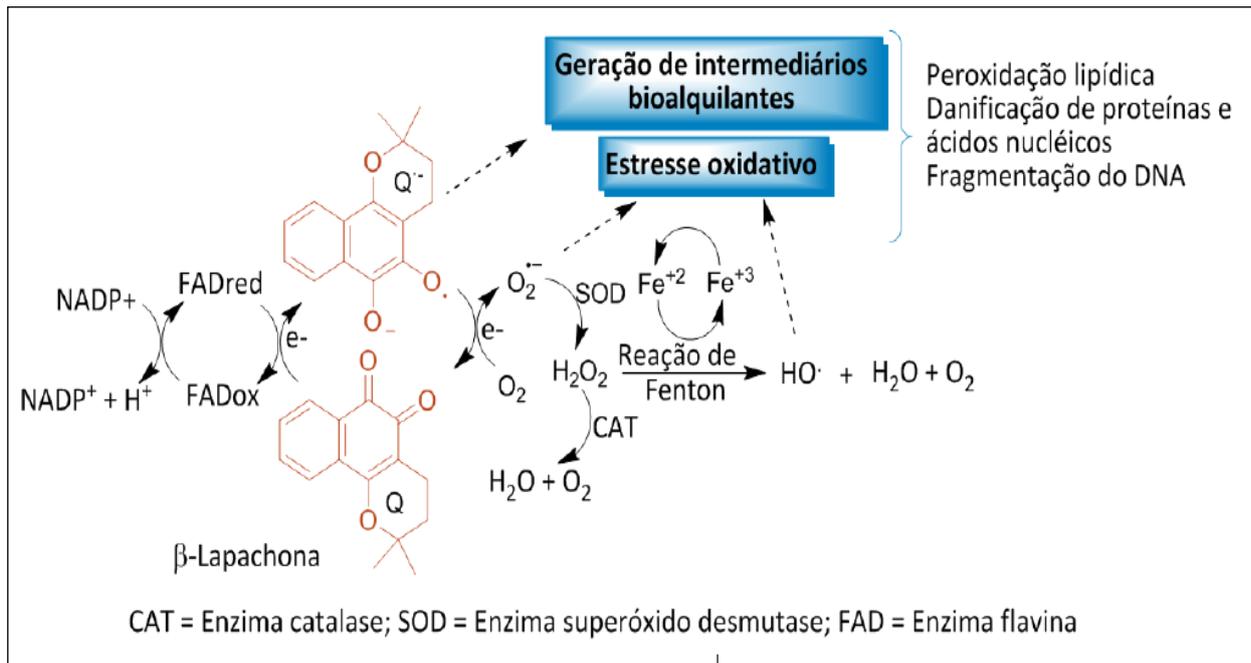


Figura 3. Ciclo redox parcial da β -lapachona. Fonte: Ferreira *et al.*, 2010.

A enzima NAD(P)H quinona-oxidorrreductase é a principal enzima associada ao ciclo redox da β -lapachona e apresenta elevada expressão em células tumorais, especialmente em linhagens de câncer de tumores sólidos como de pâncreas, pulmão e mama (Park *et al.*, 2014), considerando-se que a β -lapachona apresenta toxicidade seletiva para estes tipos de células e toxicidade mínima para células não tumorais (Reinicke *et al.*, 2005).

Observou-se ainda a que terapia combinada da β -lapachona e radiação ionizante (Choi *et al.*, 2007), terapia fotodinâmica (Lamberti *et al.* 2013), cisplatina (Terai *et al.*, 2009) e hipertermia (Park *et al.*, 2005) aumenta os efeitos anticâncer da β -lapachona pela sensibilização das células através da upregulação de NAD(P)H:quinona-oxidorrreductase (NQO1).

Efeitos sinérgicos também foram observados na quimioterapia da β -lapachona com taxol, em que cada droga atua em diferentes checkpoints do ciclo celular (Li *et al.*, 1999) e inibem proteínas inibidoras da apoptose (PIA) (D'Anneo *et al.*, 2010), a β -lapachona potencializa até 10 vezes o efeito do taxol nas células (Li *et al.*, 1999; D'Anneo *et al.*, 2010), e juntos apresentam ação antitumoral marcante (Li *et al.*, 1999). Associada a genisteína, observou-se citotoxicidade aumentada através da ativação de diferentes vias apoptóticas por ambas as drogas (Kumi-Diaka *et*

al.,2004). Em um estudo clínico de fase II, a associação de β -lapachona e gemcitabina demonstrou controle de 65% do câncer de pâncreas nos pacientes tratados (Khong *et al.*, 2007). A β -lapachona associada à cisplatina apresentou além do efeito sinérgico na atividade antitumoral, ação nefroprotetora, reduzindo os efeitos inflamatórios e nefrotóxicos da cisplatina (Gang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016).

Estudos sobre o metabolismo da β -lapachona indicaram que a metabolização ocorre principalmente por enzimas metabolizadoras de fase II, como UDP glucuronosiltransferases (UGT), sulfotransferases (SULT) e glutathione-S transferases (GST) (Figura 4A) (Savage *et al.*, 2008). Entretanto, Miao *et al.* (2008) identificaram em sangue humano, os metabólitos de fase I hidroxilato, mono e dicarboxilato, e ocorrência de descarboxilação e lactonilação no anel. Os principais metabólitos obtidos da conjugação da β -lapachona advêm de um processo de duas etapas, em que primeiro a β -lapachona é reduzida a hidroxiquinona seguida de conjugação no sítio reduzido (Savage *et al.*, 2008). Em avaliação de plasma e hepatócitos de mamíferos foram encontrados principalmente metabólitos de glucuronidação (conjugação com ácido glicurônico) e sulfatação (conjugação com sulfato) (Miao *et al.* 2008; Savage *et al.*, 2008). Savage *et al.* (2008) identificou ainda um conjugado de glicosilsulfato em plasma humano e de rato. Lee *et al.* (2013) identificaram *in vitro* em microssomas de fígado de camundongo, rato, cachorro, macaco e humano metabólitos monooxigenados, descarboxificado, dicarboxilado e um O-metilado, sendo este último predominante em microssomas humano (Figura 4B).

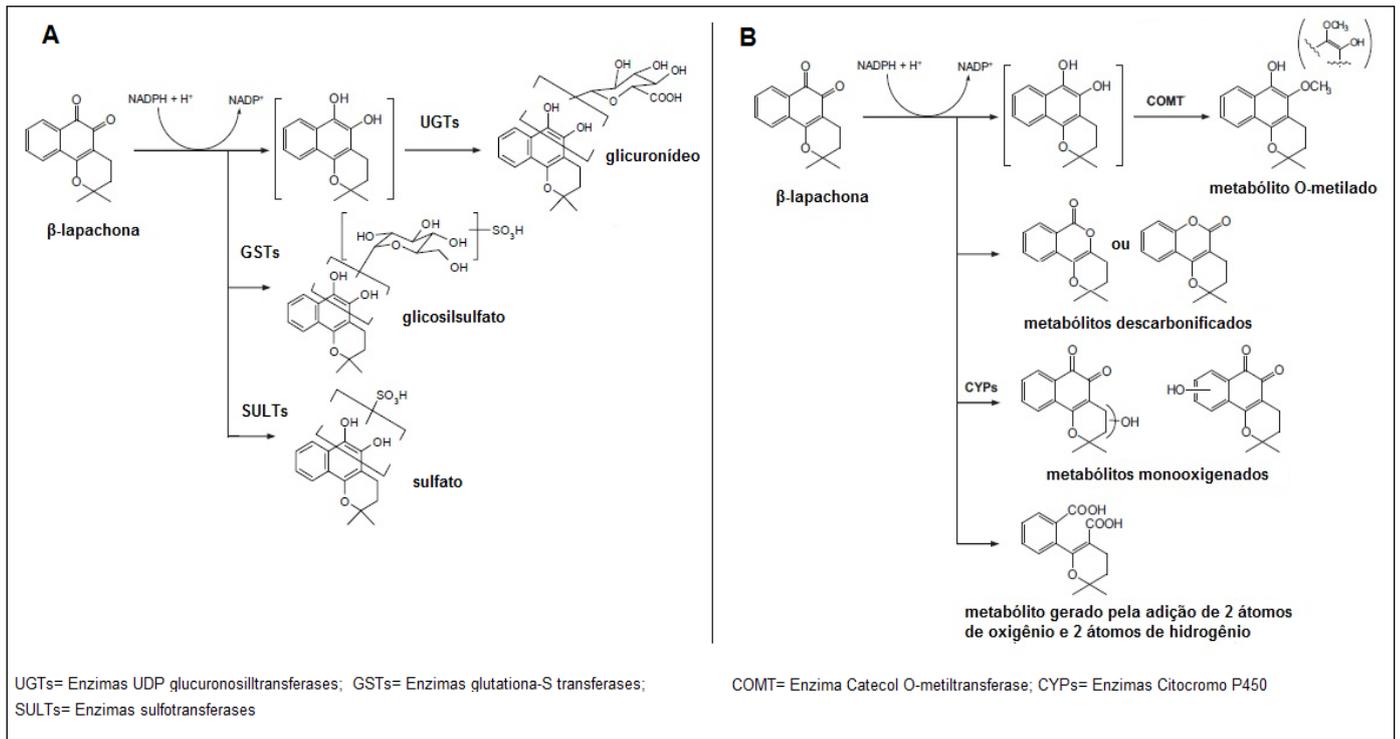


Figura 4. Vias metabólicas da β -lapachona. (A) Formação dos metabólitos por enzimas de fase II; (B) Metabólitos formados em microsomas de fígado humano. Fonte: Adaptado de Savage *et al.*, 2008 e Lee *et al.*, 2013.

Apesar do seu grande valor farmacêutico como potencial fármaco, a baixa solubilidade da β -lapachona em água (0,04 mg/ml) limita sua administração sistêmica e aplicação na clínica. Nesse sentido, buscam-se formas de aumentar a hidrossolubilidade e melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade desta droga. Nasongkla *et al.* (2003), Cunha-Filho *et al.* (2007) e Seoane *et al.* (2013) relataram um aumento significativo (até 400 vezes) da hidrossolubilidade da β -lapachona através de complexos de inclusão utilizando ciclodextrinas para administração intravenosa, oral e intratumoral, respectivamente.

Nanossistemas carreadores de fármacos também têm sido desenvolvidos a fim de viabilizar a aplicação clínica da β -lapachona, a saber, nanopartículas de quitosana-lectina para o tratamento de leishmania (Moreno, 2015), lipossomas associados a complexo de ciclodextrina (Cavalcanti, 2015) e nanopartículas de ouro contendo β -lapachona para tratamento anticâncer combinado a radioterapia, em que se observou sensibilização das células tumorais ao pré e pós-tratamento com as nanopartículas que aumentaram os efeitos da radioterapia em tumores (Jeong *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços referentes à solubilidade, a alta toxicidade da β -lapachona é outro grande desafio. Em ensaios clínicos, o complexo HP β -CD β -lap (hidroxipropil- β -ciclodextrina com β -lapachona) desenvolvido por Nasongkla *et al.* (2003) e que aumentou a hidrosolubilidade da β -lapachona em 400x demonstrou toxicidade dose-limitante com expressão de anemia hemolítica e distribuição não-específica da droga, resultando em pequena eficácia contra tumores (Hartner *et al.*, 2007). Com o objetivo de ultrapassar este desafio, novas formulações vêm sendo desenvolvidas e estudadas. Em avaliações de micelas com β -lapachona e HP β -CD β -Lap, Blanco *et al.*, (2010) comparou a porcentagem de anemia hemolítica causada por diferentes formulações e observou que HP β -CD β -lap nas concentrações de 1mg/ml e 1,5mg/ml de β -lapachona causou $47 \pm 1\%$ e $52 \pm 2\%$ de hemólise respectivamente, entretanto notou-se que HP β -CD isolado foi responsável por $94 \pm 1\%$ da hemólise observada. Em formulação de micelas com β -lapachona não se observou hemólise nas concentrações testadas (30-50 mg/kg). Estes resultados também foram observados por Ma *et al.* (2015) além de notarem que HP β -CD β -lap causa também metemoglobinemia. Na investigação da mortalidade e morbidade, a dose de 25mg/Kg de HP β -CD β -lap causou contrações musculares severas, dispneia e marcha irregular em ratos. Enquanto que, animais tratados com micelas contendo β -lapachona nesta mesma concentração apresentaram sinais bem mais suaves (Blanco *et al.*, 2010). Em estudo de farmacocinética das micelas com β -lapachona, observou-se aumento do tempo de meia vida, diminuição da eliminação, clearance lento e após 24 horas da administração 20% da dose inicial permaneceu na circulação sanguínea, além de notar-se significativo acúmulo em tecido tumoral, com aproximadamente 1,5% da dose injetada por grama de tecido (Blanco *et al.*, 2010). Entretanto, apesar dos resultados promissores, a utilização de micelas apresentou limitações como baixa eficiência de encapsulação e instabilidade físico-química no pH fisiológico (Ma *et al.*, 2015) o que estimula a busca por novos sistemas que possibilitem o uso clínico da β -lapachona.

2.2 Nanotecnologia e Sistemas Carreadores de fármacos

Nanotecnologia refere-se à criação, manipulação, estudo das propriedades de materiais em escala atômica e molecular para fins práticos. O conjunto de técnicas vem de diversas áreas da ciência, seja a física, a química, a biologia, as engenharias e a modelagem computacional. Os nanomateriais são designados como materiais de tamanho na faixa do bilionésimo (10^{-9}), ou seja, de 0,1 a 1000 nanômetros, como o tamanho de um átomo até um vírus (Bai e Liu, 2013).

Quando em nanoescala, propriedades como ponto de fusão, fluorescência, condutividade elétrica, permeabilidade magnética, reatividade química mudam em função do tamanho da partícula. A diminuição da matéria aumenta a razão superfície/volume, o que confere aos nanomateriais novas propriedades físico-químicas, tornando-os especiais (Bai e Liu, 2013).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar com aplicações na comunicação, física, química, biologia, robótica, engenharia de materiais, alimentos, informática e medicina (Kemp *et al.*, 2005). Nesta última, é designada como nanomedicina e compreende o desenvolvimento de materiais para aplicação no diagnóstico e na terapêutica (Ranganathan *et al.*, 2012).

Na terapêutica, no âmbito da indústria farmacêutica, a utilização da nanotecnologia tem especial atenção no desenvolvimento de sistemas carreadores que melhorem as propriedades terapêuticas dos fármacos. As pesquisas para o desenvolvimento desses nanocarreadores são realizadas desde a década de 70, tendo iniciado com o desenvolvimento de lipossoma pelo Dr. Gregory Gregoriadis em 1974 (Frézard *et al.*, 2005) e, desde então inúmeros sistemas foram desenvolvidos e aprovados pela agência americana de vigilância sanitária (*U.S Food and Drug Administration- FDA*) para ensaios e aplicações clínicas (Figura 5).

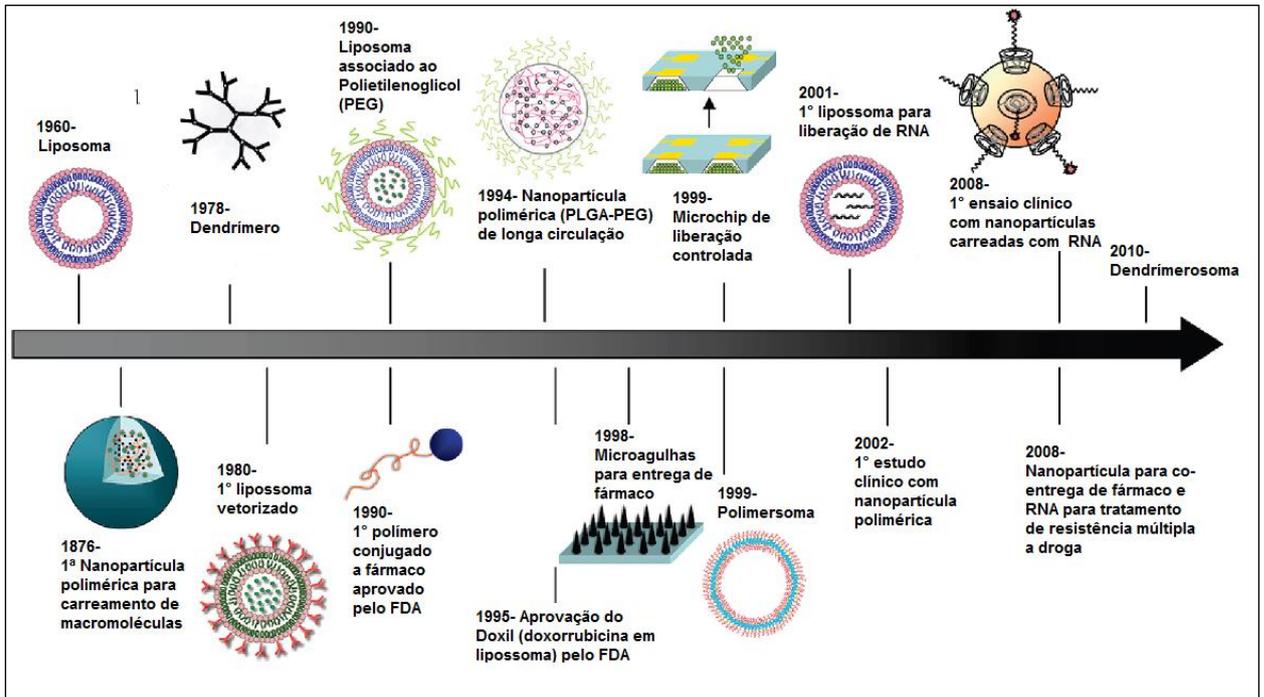


Figura 5. Linha do tempo do estudo e desenvolvimento de alguns sistemas carreadores de fármaco. Fonte: Adaptado de Shi *et al.*, 2010.

Os nanocarreadores podem ser desenvolvidos a base de diferentes compostos, que podem ser orgânicos, inorgânicos, lipídicos, poliméricos, metálicos, conjugados a proteínas e peptídeos (Wicki *et al.*, 2015), de acordo com a aplicação e alvo desejado (Figura 6). Em todos estes tipos, o fármaco pode estar adsorvido na superfície, dissolvido na cavidade interna ou na matriz polimérica (Ranganathan *et al.*, 2012).

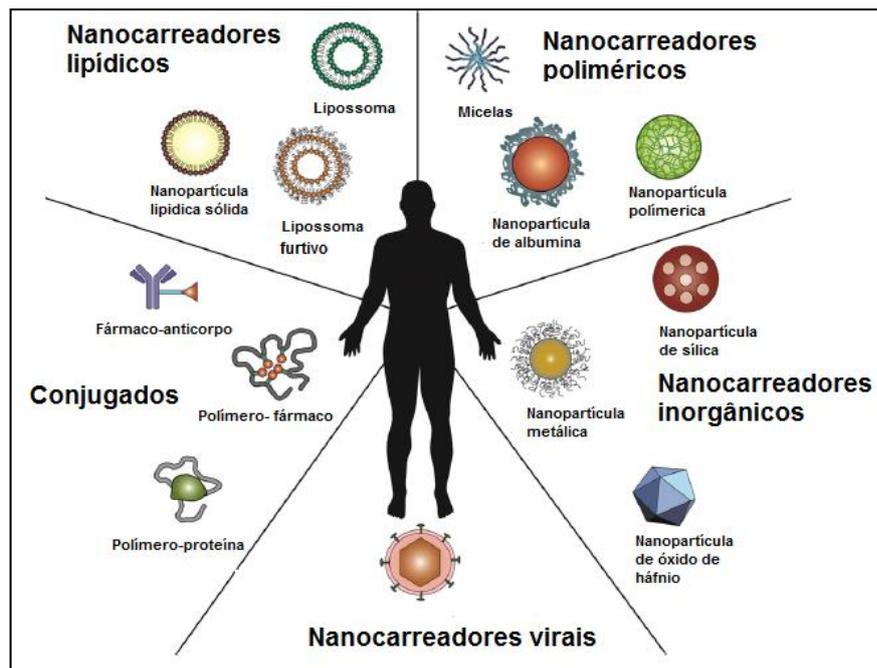


Figura 6. Diferentes tipos de nanocarreadores de fármacos. Fonte: Adaptado de Wicki *et al.*, 2015.

Nanocarreadores, através das suas propriedades físico-químicas, possuem a capacidade de ultrapassar limitações das formas farmacêuticas tradicionais e da aplicação do fármaco livre, possibilitando (Wicki *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2011):

i) Modulação do perfil da farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos aumentando o índice terapêutico;

i) Alterar a biodistribuição do fármaco permitindo que se acumule em um sítio específico, como fármacos aplicados ao câncer que se acumulam em tumores através do efeito de retenção e permeabilidade aumentadas. O tamanho em escala nanométrica facilita a entrada do fármaco pelas fenestras alargadas dos vasos sanguíneos dos tumores. A entrega específica pode dar-se também por meio de ligantes como anticorpos e proteínas receptoras;

ii) Proteção contra biodegradação da biomolécula e aumento da estabilidade no organismo;

iii) Melhora na solubilidade de fármacos hidrofóbicos com consequente melhora da absorção;

iv) Proteção contra excreção aumentando o tempo de meia-vida plasmática;

v) Liberação do fármaco em taxas sustentadas;

vi) Diminuição dos efeitos adversos;

vii) Liberação de duas ou mais substâncias visando ação sinérgica ou supressão de resistência.

2.3 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas como nanocápsulas e nanoesferas com características estruturais diferentes. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Schaffazick *et al.* 2003). As nanocápsulas são partículas constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso ou aquoso, onde o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Mora-Huertas *et al.*, 2010) (Figura 7). São sistemas coloidais com baixa viscosidade, o que permite sua administração por diferentes vias especialmente parenteral (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

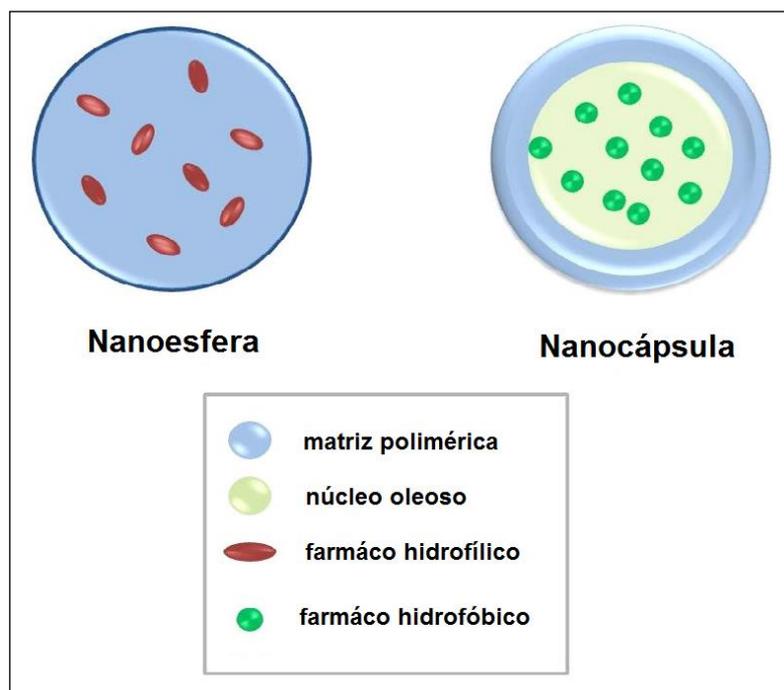


Figura 7. Ilustração da estrutura de nanoesferas e nanocápsulas.
Fonte: Adaptado de Sanna *et al.*, 2013.

Para o encapsulamento de um fármaco hidrofóbico, nanocápsulas com núcleo oleoso são preferíveis por apresentarem capacidade de encapsular uma quantidade maior de princípio ativo hidrofóbico (Couvreur *et al.*, 2002), permitindo uma melhor biodisponibilidade dos mesmos como observado com a curcumina (Zanetto-Filho *et al.*, 2013), a indometacina (Venturini *et al.*, 2011) e o resveratrol (Coradini *et al.*, 2014), os quais demonstraram um resultado melhor para o tratamento de doenças inflamatórias e câncer quando encapsulados. Nanocápsulas são capazes de estabilizar substâncias fotossensíveis resultando em sistemas com boas perspectivas para aplicação na nanomedicina (Kulkamp *et al.*, 2011).

. Os polímeros utilizados no desenvolvimento de sistemas para carreamento de fármacos e aprovados para uso clínico são classificados como naturais, como proteínas (albumina) e polissacarídeos (glicosaminoglicano, quitosana, alginato de sódio); ou sintéticos como ácido poliglutâmico, poli(alilamina hidrocloreada), poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), ϵ -policaprolactona entre outros. Os polímeros sintéticos são preferíveis por causa do seu alto grau de pureza, biocompatibilidade e biodegradação marcantes, boa absorção e interação com fluidos biológicos (Zhang *et al.*, 2008; Gref *et al.*, 2003).

2.4 Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)

O poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)-PLGA (Figura 8) é o copolímero sintético mais utilizado no desenvolvimento de sistemas para carregamento de fármacos pela sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e eficácia no encapsulamento de diversas moléculas para liberação controlada (Makadia e Siegel, 2011). Em 1999, o *Nutropin Depot* foi aprovado pelo FDA, uma formulação de microesferas de PLGA contendo o hormônio de crescimento humano como alternativa às injeções diárias (Acharya e Sahoo, 2011). Além do FDA, agências europeias como *European Medicine Agency* (EMA) aprovaram o uso deste polímero em vários sistemas de entrega de fármacos. Nesse contexto, sua aplicação é ampla e se estende a diversos fármacos para diferentes patologias, a Tabela 2 lista os principais produtos medicamentosos aprovados pelo FDA e disponíveis no mercado. No Brasil, há registro apenas de produtos correlatos (Anvisa, 2016).

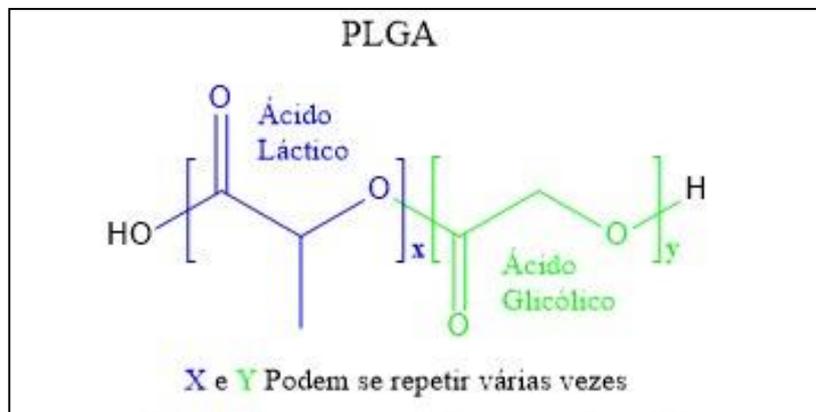


Figura 8. Estrutura química do PLGA. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.

Tabela 2. Lista de medicamentos a base de PLGA aprovados pelo FDA e disponíveis no mercado.

Medicamento	Fármaco	Sistema	Indicação
Risperdal Consta	Risperidona	Micropartícula	Esquizofrenia e Transtorno bipolar
Sandostin LAR	Octreotida	Micropartícula	Acromegalia
Zoladex	Goserelina	Implante sólido	Câncer de próstata
Lupron Depot/ Lupron Depot-PED/ Lupron	Leuprolida	Micropartícula	Câncer de próstata/ Puberdade precoce central/ Endometriose
Decapeptyl/ Trelstar/ Pamorelin	Triptorrelina	Micropartícula	Câncer de próstata
Profact Depot	Buserelina	Implante sólido	Câncer de próstata
Bydureon	Exenatida	Micropartícula	Diabetes Tipo 2
Eligard	Leuprolida	<i>Gel in situ</i>	Câncer de próstata
Vivitrol	Naltroxona	Micropartícula	Tratamento do alcoolismo
Ozurdex	Dexametasona	Implante sólido	Edema macular diabético; uveíte não infecciosa
Atridox	Doxiciclina	Gel periodontal <i>in situ</i>	Periodondite crônica em adultos
Propel	Mometasona	Implante sólido	Rinite e sinusite crônicas

Fonte: Wang *et al.*, 2016; Polyscitech Technical Blog, 2016; Schwendeman, 2014.

Quimicamente, o PLGA (Figura 8) é um copolímero, isto é, um poliéster formado por polímeros dos ácidos lático (PLA) e glicólico (PGA), é hidrofóbico e hidroliticamente instável. A sua degradação se dá por erosão matricial em meio aquoso (hidrólise) através da quebra das ligações ésteres presentes na cadeia do polímero liberando os ácidos lático e glicólico, que são monômeros endógenos facilmente eliminados do organismo pelo ciclo de Krebs na forma de gás carbônico (CO₂) e água (H₂O) (Kumari *et al.*, 2010). A taxa de degradação das nanopartículas de PLGA, e conseqüentemente a taxa de liberação do fármaco, depende de fatores como a razão entre os monômeros, cristalinidade, tamanho e distribuição das partículas, morfologia, presença/ausência de aditivos, via de administração e microambiente no tecido do organismo (Sasaki *et al.*, 2013; Shive e Anderson, 1997). A presença de grupos metila no PLA o torna mais hidrofóbico do que o PGA, assim copolímeros PLGA ricos em PLA absorvem menos água e, conseqüentemente, degradam mais lentamente. Em geral, a degradação do PLGA pode ser acelerada pela hidrofilia, aumento das interações químicas entre os grupos hidrofílicos, menor a cristalinidade (organização das cadeias poliméricas em uma estrutura regular e ordenada), e maior superfície de contato (menor tamanho de partícula) (Makadia e Siegel, 2011).

A ampla aplicação do PLGA se deve à sua degradação que produz subprodutos atóxicos (Kumari *et al.*, 2010), sua elevada permeabilidade, que pode aumentar a eficácia terapêutica pela liberação gradativa do fármaco encapsulado e por apresentar uma melhor solubilidade em solventes orgânicos (Sahoo *et al.*, 2003).

Assim, as pesquisas para o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA abrange o encapsulamento de diferentes macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA), anticorpos, peptídeos, vitaminas e fatores de crescimento humano (Mundargi *et al.*, 2008; Danhier *et al.*, 2012), fármacos para o tratamento do câncer como paclitaxel (Danhier *et al.*, 2009), doxorrubicina (Park *et al.*, 2009), cisplatina (Moreno *et al.*, 2010), dexametasona (Patil *et al.*, 2007), e para outras patologias como haloperidol (Budhian *et al.*, 2005), estradiol (Mittal *et al.*, 2007), diclofenaco (Agnihotri e Vavia, 2009), loperamida (Tosi *et al.*, 2007), gentamicina (Lecaroz *et al.*, 2007) e calcitonina (Ymamoto *et al.*, 2005). Além de já ter demonstrado eficácia para encapsulamento de princípios ativos oriundos de plantas

como a β -escina, saponina com atividade anti-inflamatória (Ven *et al.*, 2011), curcumina, composto fenólico com atividade anticancerígena (Khalil *et al.*, 2013), e extratos etanólicos de subprodutos vegetais (polpas, sementes e cascas) de acerola, maracujá e goiaba, que são ricos em quercetina, cumarina e reverastrol, respectivamente, tratando-se de compostos fenólicos com atividade antimicrobiana significativa (Silva *et al.*, 2014).

A internalização das nanopartículas de PLGA pelas células ocorre por pinocitose e endocitose mediada por clatrina, sendo rapidamente absorvidas pelos endo-lisossomos e atingindo o citoplasma em apenas 10 minutos de incubação (Vasir e Labhasetwar, 2007). A biodistribuição e a farmacocinética destas partículas seguem um perfil não linear e dose-dependente (Panagi *et al.*, 2001). Estudos indicam que o clearance e a fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário dependem da composição (proporção ácido láctico: ácido glicólico) e da quantidade de PLGA, e que as nanopartículas de PLGA se acumulam rapidamente no fígado, medula óssea, gânglios linfáticos, baço e macrófagos peritoneais (Bazile *et al.*, 1992).

Quanto à toxicidade, PLGA apresenta um menor tempo para sua degradação completa, implicando menor probabilidade de reações adversas, diferente de polímeros com fragmentos cristalinos com tempo de degradação longo (Silva, 2015). Alguns estudos indicam que podem ocorrer reações adversas ao tecido, porém suaves e PLGA tem se mostrado extremamente seguro para aplicação em biomateriais (Makadia e Siegel, 2011).

2.5 Gordura de murumuru: Um produto natural da Amazônia

Plantas representam um grande reservatório de potenciais novos fármacos e insumos farmacêuticos (Khosla *et al.*, 2003). Por serem fontes de substâncias bioativas são extremamente importantes para saúde humana, sendo largamente utilizadas na medicina convencional (Balbani *et al.*, 2009).

A Amazônia possui a maior biodiversidade do mundo, e no Brasil diversas plantas e seus derivados são objeto de pesquisa e desenvolvimento desde o período colonial, quando com a chegada dos portugueses e cientistas de diversos países viajaram pelo país mapeando as espécies da flora e seus respectivos usos na medicina indígena (Breitbach *et al.*, 2013). Atualmente, são catalogadas 46086 espécies da flora brasileira (Flora do Brasil 2020, 2016). Segundo levantamento, feito considerando as plantas catalogadas por Carl Friedrich Phillip von Martius, 92 espécies das plantas encontradas na Amazônia brasileira são indicadas como medicinais, destas, 33 espécies foram estudadas e tiveram atividade terapêutica comprovada (Breitbach *et al.*, 2013).

Além do grande potencial na medicina, os recursos naturais da Amazônia são considerados renováveis, de economia limpa, a sua utilização promove o desenvolvimento sustentável e a economia das comunidades locais (Sousa *et al.*, 2004; Clement *et al.*, 2005; Bezerra, 2008). Nesse sentido, sua utilização na indústria se expandiu e hoje se tem vários produtos no mercado, especialmente nas áreas de alimentação e cosmética, que utilizam matérias-primas da Amazônia. Dentre os recursos naturais, destacam-se os óleos e gorduras das palmeiras amazônicas. A atenção às espécies oleaginosas se dá pelo potencial econômico que seus óleos e gorduras oferecem devido às suas propriedades nutricionais; como emolientes, são utilizados na cosmética para produção de sabão, cremes hidratantes e produtos capilares; muito importante é o seu potencial para produção do biodiesel; nas indústrias químicas passam por modificações para produção de surfactantes, lubrificantes, detergentes; e na farmacêutica como insumo (Saraiva *et al.*, 2009; Clement *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2004; Biermann *et al.*, 2011).

A diferença entre óleos e gorduras é quanto às suas propriedades físico-químicas. Ambos são constituídos principalmente por lipídeos do tipo triglicerídeo que são formados pela reação de esterificação entre uma molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol) e três moléculas de ácidos graxos (Figura 9A). Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos que podem apresentar de 4 a 36 átomos de carbono na sua cadeia, podendo ser saturados (ligações simples), monoinsaturados (uma ligação dupla) ou poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas) (Figura 9B). É o grau de instauração dos ácidos graxos que influencia diretamente nas propriedades dos óleos e gorduras. Quanto maior o número de instaurações, maior o ponto de fusão, assim ácidos graxos com muitas insaturações são líquidos e aqueles com poucas insaturações são sólidos. Portanto, óleos são ricos em ácidos graxos insaturados, apresentando-se líquidos à temperatura ambiente, enquanto que gorduras tem predominância de ácidos graxos saturados e são sólidas à temperatura ambiente (Unesp, 2016).

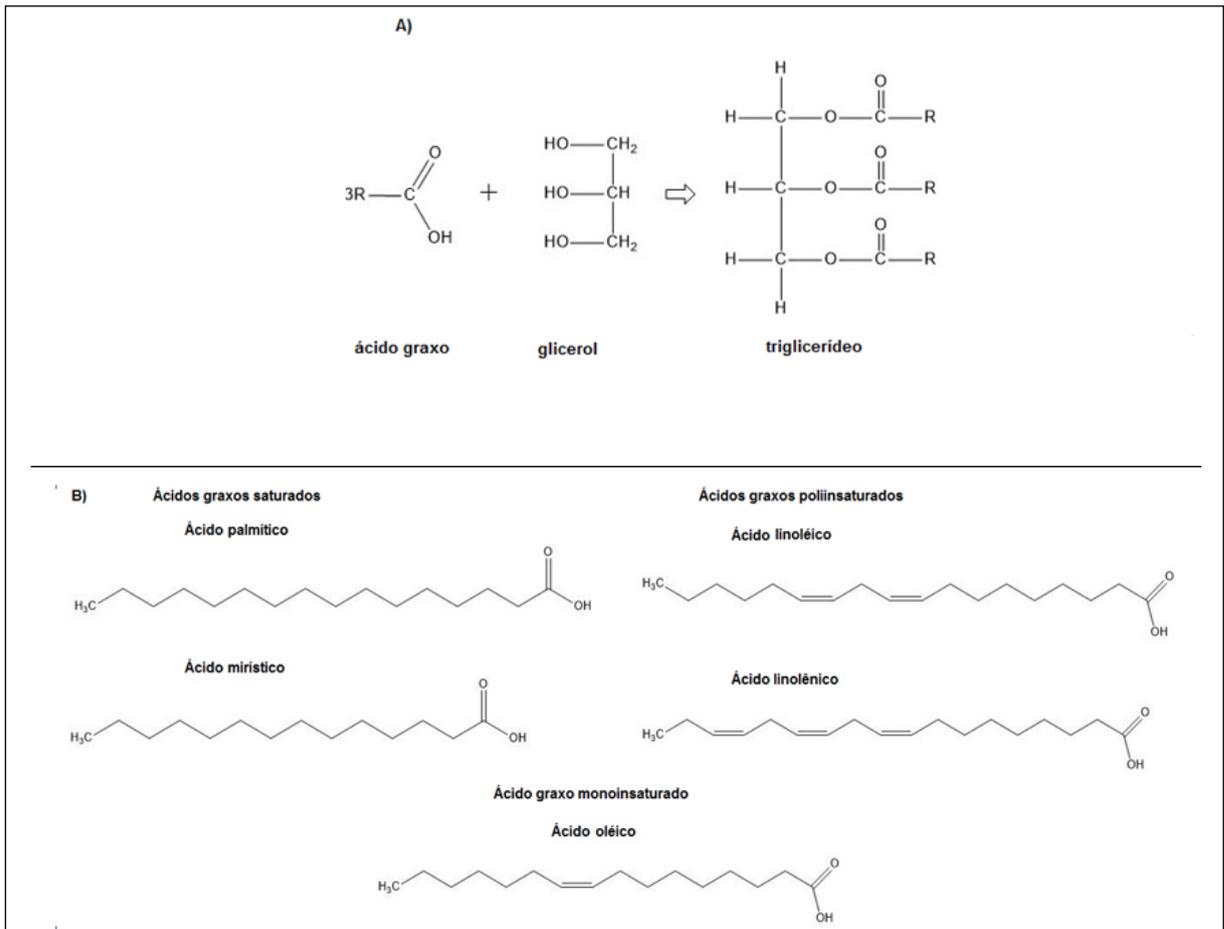


Figura 9. A: Formação do triglicerídeo; B: Tipos de ácidos graxos. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.

Na área farmacêutica, no âmbito da nanomedicina, os óleos e gorduras vegetais tem papel significativo como componente oleoso no desenvolvimento de carreadores de fármaco, apresentando vantagens por serem orgânicos, biocompatíveis, não tóxicos, possuírem alguma atividade farmacológica, matéria-prima de baixo custo e abundante, além de já existirem estudos demonstrando sua eficácia em nanoformulações, como a utilização de óleo de soja (Teixeira, 2007), melaleuca (Bruschi, 2010) e de açaí em nanocápsulas (Santos, 2014).

Vários óleos e gorduras estão em estudos para utilização como fármacos ou excipientes (Drozdek e Bazylińska, 2016), dentre os quais a gordura de murumuru, utilizada neste trabalho.

A palmeira *Astrocaryum murumuru*, da família Arecaceae, que origina a gordura de murumuru, é uma espécie perene, abundante na região amazônica especialmente em áreas periodicamente inundadas, de floresta densa ou semiaberta (Lorenzi *et al.*, 1995). No Brasil, é encontrada principalmente no estuário do rio Amazonas (Silva, 1996) e afluentes (Altman, 1958). Possui altura de 10 a 15 m, seu caule apresenta bainhas persistentes que formam placas, recobertas de espinhos longos e pretos, folha pinada com pêlos marrons na face abaxial das pinas (Sousa *et al.*, 2004) (Figura 10A).

Os seus frutos maduros tem forma oblonga a ovoide, com cocos em formatos comprido, aboleado e redondos, medindo entre 30 a 85 mm e peso de 17 a 80 g, com polpa branca (Queiroz *et al.*, 2008), podem apresentar coloração marrom-clara ou amarelo-ouro com ou sem espínolos (pequenos espinhos) e casca lenhosa (Sousa *et al.*, 2004) (Figura 10B), sendo muito utilizados pelas populações locais para fins alimentícios.

Esta palmeira possui inúmeras utilidades como produção de fibra, forragem, uso do fruto, madeira comercial, palha de cobertura, artesanato, plantas ornamentais, sombra, adubo (Franke, 1999) e na indústria de papel e celulose (Rocha e Potiguara, 2007).

A gordura extraída das suas amêndoas tem aspecto semissólido e é conhecida como manteiga de murumuru (Figura 10C), sendo utilizada na indústria

de cosméticos para produção de sabonetes, cremes e xampus, na indústria de tintas como secativo, na produção de margarina (Sousa *et al.*, 2004), além de pesquisas realizadas para produção do biodiesel (Lopes, 2007; Teixeira, 2010).

A gordura de murumuru é rica em ácidos graxos (Tabela 3), sendo os principais o ácido oléico presente na polpa e o ácido láurico presente no óleo da amêndoa (Clement *et al.*, 2006; Bezerra, 2012), além disso, devido às altas concentrações de ácidos graxos saturados de cadeia curta, como o láurico e o mirístico apresenta a vantagem de não sofrer rancificação facilmente (Lopes *et al.*, 2007). A aplicação desta gordura na indústria farmacêutica é principalmente na produção de cosméticos devido a suas propriedades altamente nutritivas, hidratantes e emolientes que são atribuídas às altas concentrações de ácido láurico (Silva, 2002). Na nanomedicina já se dispõe de formulações que utilizam a gordura de murumuru como componente oleoso, a saber, em nanoemulsão para produção de nanocápsulas poliméricas de poli(acrilato de 2 etilhexila) (Goto, 2011) e carreadores lipídicos nanoestruturados (Sena, 2016), que são sistemas para veiculação de fármacos e agentes cosméticos de característica lipofílica.

Tabela 3. Composição em ácidos graxos da gordura de murumuru.

Ácidos graxos	Silva <i>et al.</i>,2009 (%)	Teixeira, 2010 (%)	Mambrim e Barrera-Arellano, 1997. (%)
Ácido caprílico (C 8:0)	0,5	0,9	2,7
Ácido cáprico (C 10:0)	1,0	2,2	2,0
Ácido láurico (C 12:0)	44,0	49,3	51,6
Ácido mirístico (C 14:0)	27,0	31,2	25,8
Ácido palmítico (C 16:0)	9,0	6,6	6,0
Ácido esteárico (C 18:0)	3,0	0,01	2,9
Ácido oleico (C 18:1)	11,0	6,09	5,7
Ácido linoleico (C 18:2)	4,4	3,3	3,0

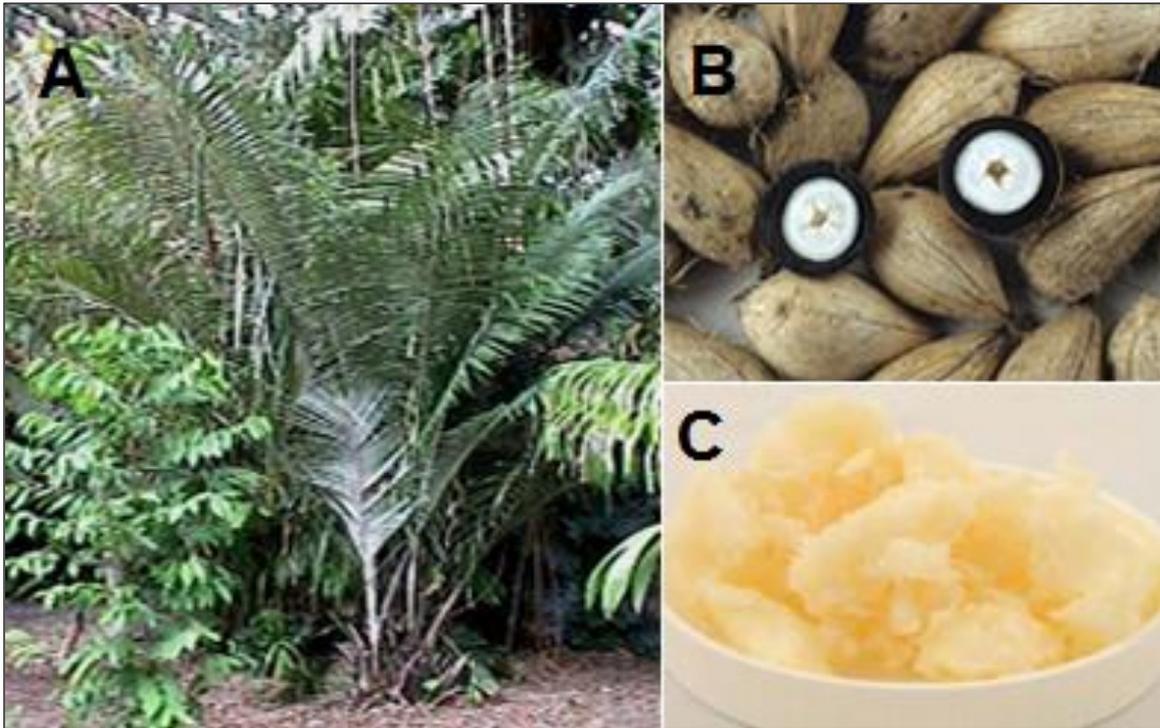


Figura 10. Foto da palmeira (A), do fruto e da polpa (B); e da manteiga (C) do *Astrocaryum murumuru*, da família *Arecaceae*. Fonte: <https://cosmeticosararajuba.com/2015/11/20/sabonete-de-murumuru/>. Acessado em agosto/2016.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Preparar nanocápsulas à base de PLGA e núcleo oleoso de gordura extraída da planta da Amazônia *Astrocaryum murumuru* contendo β -lapachona como fármaco.

3.2 Objetivos específicos

- a. Isolar e purificar o lapachol extraído da serragem do ipê;
- b. Sintetizar a β -lapachona a partir do lapachol;
- c. Avaliar o grau de pureza e caracterizar físico-quimicamente a β -lapachona;
- d. Preparar nanocápsulas de PLGA tendo como núcleo oleoso a gordura de murumuru na presença ou ausência da β -lapachona sintetizada;
- e. Caracterizar físico-quimicamente as nanocápsulas obtidas;
- f. Determinar a quantidade da β -lapachona encapsulada nas nanocápsulas preparadas;
- g. Avaliar a citotoxicidade em células tumorais e não tumorais da β -lapachona sintetizada livre e encapsulada em nanocápsulas;
- h. Avaliar em células tumorais o tipo de morte celular, efeitos sobre o ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) da β -lapachona sintetizada livre e encapsulada em nanocápsulas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Este trabalho é constituído de três etapas: 1) Síntese e caracterização química da β -lapachona; 2) Preparação e caracterização físico-química das nanocápsulas de PLGA e gordura de murumuru contendo β -lapachona; 3) Avaliação biológica *in vitro*. A Figura 11 mostra o esquema do desenho experimental.

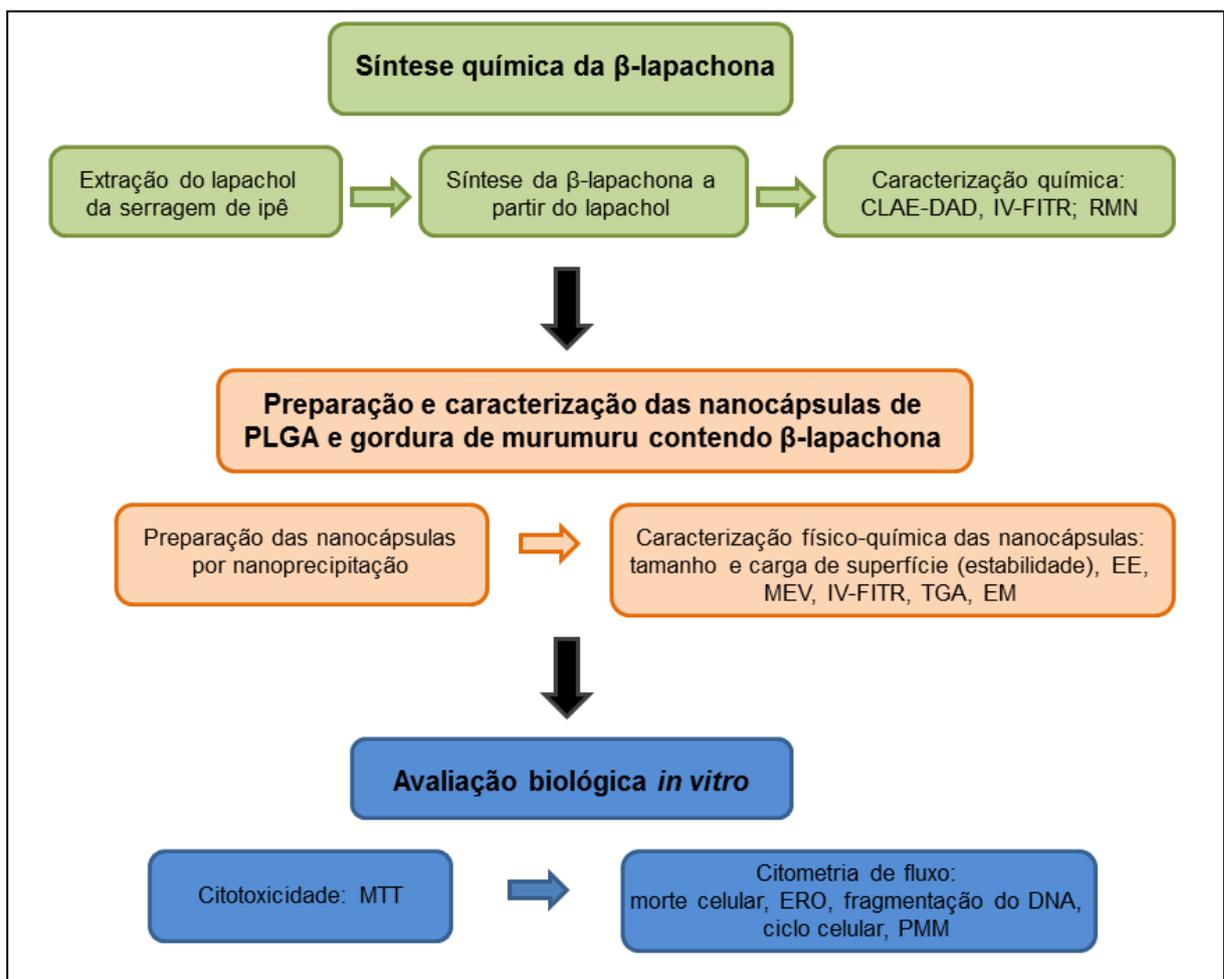


Figura 11. Esquema do desenho experimental.

4.2 1º Etapa: Síntese química e caracterização da β -lapachona

A β -lapachona é obtida em pequena quantidade da natureza, enquanto que o lapachol, utilizado como matéria prima para síntese da β -lapachona, é encontrado abundantemente em serragem da madeira dos ipês. Assim, diversos protocolos de síntese da β -lapachona a partir do lapachol foram desenvolvidos (Ferreira *et al.*, 2010). Neste trabalho, a síntese da β -lapachona foi feita por ciclização do lapachol catalisada por ácido sulfúrico segundo Hooker *et al.* (1936), trata-se do primeiro método desenvolvido, sendo muito simples e com alto rendimento. Além disso, a reação de ciclização do lapachol por catálise ácida origina tanto a β -lapachona como seu isômero α -lapachona, entretanto, o emprego do ácido clorídrico concentrado favorece a formação da primeira. Os cristais de lapachol e β -lapachona obtidos foram analisados por cromatografia e métodos espectrométricos para determinação da pureza e confirmação da identidade química dos compostos. Para comparação e garantia da identidade química da β -lapachona obtida, análise espectral da α -lapachona também foi realizada. Na Figura 12, constam as estruturas químicas do lapachol, da β -lapachona e da α -lapachona.

O isômero α -lapachona foi cedido pela Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira, do Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Minas Gerais.

A serragem foi material de reaproveitamento vegetal obtida em uma serraria em Benfica, Pará.

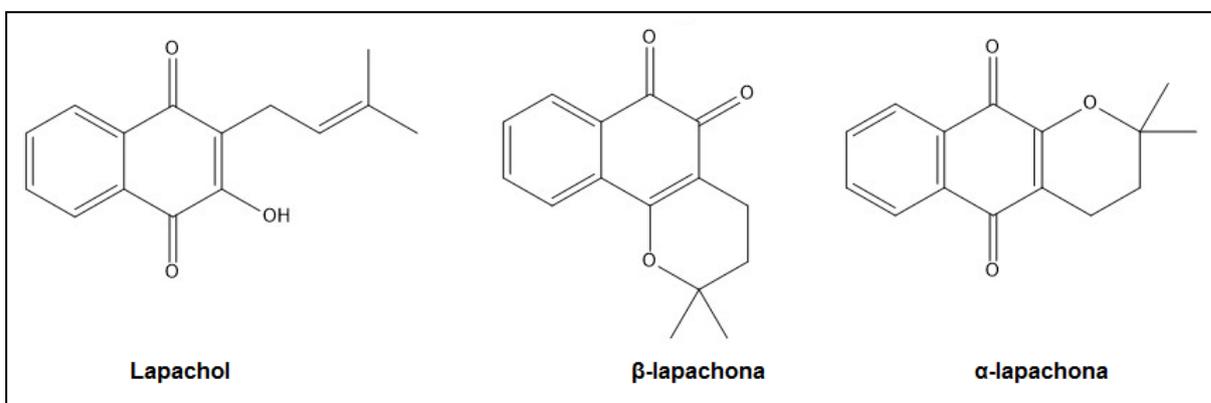


Figura 12. Estruturas químicas do lapachol, da β -lapachona e da α -lapachona. Fonte: Acervo do autor, desenhada no Programa ChemBioDraw Ultra. Versão: 14.0.0.117.

4.2.1 EQUIPAMENTOS

Para o procedimento de síntese e caracterização da β -lapachona foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica, modelo BK 600 (Gehaka);
- Balança analítica, modelo AUJ 220 (Shimadzu);
- Evaporador rotatório, modelo RII (Buchi);
- Cromatógrafo Waters Alliance 2695 Separations Module (equipado com bomba quaternária e autoinjetores) e detector PDA Waters 2996;
- Coluna de fase reversa (12,5 x 4,5 cm, LiChroCART[®] RP 18 – 5 μ m coluna n^o 317473 Lot.: L750917);
- Espectrômetro, modelo DPX200 (Bruker Avance).

4.2.2 ADSORVENTES, REAGENTES, SOLVENTES E SOLUÇÕES

- Adsorventes: Sílica gel para cromatografia em camada delgada (Machaery-Nagel), sílica gel para cromatografia em coluna 40-63 μ m e 230-400 mesh (Fluka Analytical).
- Reagentes: Ácido clorídrico e ácido sulfúrico (Isofar[®]);
- Solventes: Acetona, acetato de etila, diclorometano, *n*-hexano (Isofar[®]); metanol e acetonitrila grau CLAE (AppliChem Panreac); clorofórmio deuterado (Tedia[®]), tetrametilsilano (TMS) (Tedia[®]); água ultrapura (Milli-Q[®]).
- Soluções: Soluções aquosas de carbonato de sódio a 2,5% e ácido sulfúrico a 6%.

4.2.3 VIDRARIAS E OUTROS

- Proveta de 1000 ml;
- Balão de fundo chato de 50 ml;
- Balão de fundo redondo de 250 ml;
- Erlenmeyer de 1000 ml;
- Béquer de 1000 ml;
- Funil de separação de 1500 ml;
- Funil de Buchner;
- Coluna de vidro 100 x 2,5 cm para cromatografia;
- Placas cromatográficas de vidro 10 x 5 cm;
- Fita de pH (Machery-Nagel);

4.2.4 ETAPAS DA SÍNTESE

4.2.4.1 Extração do lapachol da serragem de ipê

- 1) Colocou-se 500 g de serragem de ipê em um recipiente de plástico com capacidade de 14 L, adicionou-se a solução de carbonato de sódio a 2,5% q.s.p e agitou-se por 15 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes.
- 2) Em seguida, a solução aquosa alcalina foi filtrada através de algodão e adicionou-se ácido clorídrico concentrado até pH 1, agitando-se continuamente.
- 3) A solução de extração obtida ficou em repouso por 18 horas; o precipitado formado foi separado por filtração em funil de Buchner sob vácuo a temperatura ambiente.
- 4) O precipitado seco formado foi transferido para um béquer e adicionou-se sílica gel 60G 0,04-0,063 mm e diclorometano q.s.p até consistência de pó à temperatura ambiente.

- 5) Em seguida, este preparado foi transferido para coluna cromatográfica com 30g de sílica gel 0,04-0,063 mm, via seca. Eluiu-se com diclorometano e o eluato foi concentrado em evaporador rotatório.
- 6) O resíduo obtido foi transferido para um Erlenmeyer e adicionou-se *n*-hexano q.s.p até solubilização a quente. Esta solução foi transferida para um frasco de vidro e deixada em repouso durante 18 horas na geladeira para cristalização do lapachol.
- 7) O material cristalizado foi filtrado, dissolvido em metanol e clorofórmio, em banho-maria a 60°C e a solução foi deixada em geladeira por 18 horas para recristalização.
 - 6) Após este período, o material foi filtrado sob vácuo, levado ao dessecador e deixado sob vácuo por 5 dias, sendo pesado, permanecendo no vácuo até obtenção de peso constante da amostra.
- 8) Por fim, os cristais foram transferidos para um frasco de vidro e o rendimento calculado.

4.2.4.2 Síntese da β -lapachona a partir do lapachol

Os procedimentos abaixo foram repetidos até utilização total de 2,6 g de lapachol, sendo realizado 13 vezes.

- 1) Em um balão de fundo redondo com capacidade de 50 ml adicionaram-se 200 mg de lapachol, e depois 4 ml de ácido sulfúrico concentrado, sob agitação magnética por 2 minutos, em banho de gelo.
- 2) Em seguida, adicionou-se água destilada e a mistura foi transferida para um funil de separação.
- 3) No funil de separação foi feita extração com diclorometano (2x 100 ml), as fases orgânicas foram combinadas e lavou-se com água destilada (2x100 ml).
- 4) A solução em diclorometano foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório.

5) Ao material obtido adicionou-se sílica gel 60G 0,04-0,063 mm e diclorometano q.s.p até consistência de pó, em seguida a esta mistura foi transferida para coluna cromatográfica com 30g de sílica gel 0,04-0,063 mm, via seca, e eluiu-se sucessivamente com *n*-hexano:diclorometano 1:1, diclorometano e diclorometano:acetato de etila 8:2. As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório, comparadas por CCD e aquelas contendo β -lapachona foram reunidas.

5) Os cristais obtidos foram recristalizados em metanol-clorofórmio, por dissolução em banho maria a 60°C, seguindo-se repouso em geladeira por 18 horas.

6) Após filtração sob vácuo, os cristais foram deixados em dessecador, sob vácuo por 15 minutos, em seguida pesou-se e repetiu-se o ciclo até peso constante da amostra. Os cristais foram transferidos para um frasco de vidro e o rendimento calculado.

7) O lapachol e a β -lapachona foram comparados por cromatografia em camada delgada (fase móvel diclorometano:*n*-hexano 8:2) e revelação com ácido sulfúrico a 6%.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LAPACHOL E DA β -LAPACHONA

4.2.5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diódos (CLAE-DAD)

Pesou-se 1 mg de amostra que foi dissolvida em 1 ml de metanol grau CLAE. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante analisado por CLAE-Fase reversa. Para análise no cromatógrafo, 20 μ L da amostra foram injetados no equipamento, a eluição foi em gradiente com água ultrapura + 0,1% ácido fosfórico/acetonitrila, compreendendo um período de eluição linear (5 – 95% de acetonitrila de 0 a 40 min), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% de acetonitrila de 40 a 45 min), retornando a

condição de eluição inicial 45 a 50 min (5% de acetonitrila). A leitura foi feita em detector arranjo de diodos, nos comprimentos de onda na faixa de 220-400 nm, registrando-se cromatogramas em comprimentos de onda de 280 e 350 nm. Protocolo padronizado do Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2.5.2 Análise por Espectrometria no Infravermelho (IV-FTIR)

Para análise por espectrometria no infravermelho 2 mg da amostra foi colocada em uma superfície de diamante, pressionada a 50 torr, com objetivo de quebrar os cristais da amostra e levada ao aparelho para leitura. A análise foi feita em espectrômetro FTIR, Spectrum One, Perkin-Elmer com sistema de Refletância Atenuada Total (ATR) (Adaptado de Cunha-Filho *et al.*, 2007).

4.2.5.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para as análises por espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono 13 (RMN¹³C) pesou-se 40 mg de cada uma das amostras de lapachol, β -lapachona e α -lapachona que foram dissolvidas, separadamente, em clorofórmio deuterado (CDCl₃), empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. A leitura foi feita em espectrômetro a 200 MHz. Para o processamento dos dados espectrais utilizou-se o programa TOPSPIN 3.0 - Bruker.

4.3 2º Etapa: Preparação e caracterização das nanocápsulas (NC) de PLGA e núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona.

4.3.1 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica (Denver Instrument Company);
- Ultra Turrax[®] T25 Digital (IKA[®]);
- Evaporador rotatório, modelo RII (Buchi);
- pHmetro (Digimed);
- Centrifuga Mikro, modelo 220R (Hettich);
- Zetasizer[®], modelo Nano-ZS90 (Malvern);
- Microscópio eletrônico JEOL JSM-700 1F (JEOL, Japan) com câmera UltraScan[®], sistema de deposição por pulverização catódica Balzers SCD 050[®] Sputter Coater (Balzers Union AG, Liechtenstein);
- Espectrofotômetro FTIR (*Fourier Transform Infrared*) IR, modelo Prestige 21 (Shimadzu[®]);
- Cromatógrafo Alliance Waters 2695, Waters 2998 acoplado a detector de Arranjo de Diodos Separations Module PhotoDiode Array Detector Waters 2465 Electrochemical Detector;
- Coluna de fase reversa X BridgeTM C18 5 μ m (4.6 x 250mm) e pré coluna X Bridge[®] C 18 5 μ m (4.6 X 20mm) GuardCartridge (2 PK);
- Espectrômetro de Massas TQ Detector Acquity Waters com ionização por Eletronspray (+ e -) acoplado a Cromatógrafo Acquity UPLC Waters com coluna Acquity UPLC HSS C18 SB 1,8 μ m 2,1x50 mm e detector Acquity PDA Waters.

4.3.2 REAGENTES, SOLUÇÕES E SOLVENTES

Reagentes:

- β -lapachona sintetizada a partir do lapachol, conforme descrito no item 4.1.;
- Gordura de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) da Amazon Oil Industry (Lote: AMO 012/2012). Este lote foi caracterizado físico-quimicamente por Sena (2016), que atestou que os índices avaliados encontram-se dentro dos limites recomendados, os dados da avaliação e o perfil de ácidos graxos constam nos Anexos A e B;
- Polímero Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)-PLGA 50:50 (Sigma-Aldrich);
- Surfactante Fosfatidilcolina de soja (Epikuron 200[®]);
- Surfactante Poloxamer[®] 407 (Sigma-Aldrich).

Soluções: solução de tampão fosfato de sódio monobásico/bibásico P.A (Laborclin), água ultrapura (Milli-Q[®]).

Solventes: Acetona e metanol (J.T Baker[®]); ácido fórmico (Isofar[®]); acetonitrila e metanol grau CLAE (J.T Baker[®]).

4.3.3 VIDRARIAS E OUTROS

- Béqueres de 10, 50 e 100 ml;
- Balão de evaporação de 250 ml;
- Provetas de 10, 50 e 1000 ml;
- Balão volumétrico de 1000 ml;
- Membrana filtrante Millex GN 0,22 μ m (Millipore[®]) para soluções orgânicas.

4.3.4 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS (NC) DE PLGA

As nanocápsulas (NC) foram preparadas segundo o método de deposição interfacial de polímero e evaporação de solvente (nanoprecipitação) descrito por Fessi *et al.* (1989).

A nanoprecipitação consiste em gotejar a fase oleosa na fase aquosa contendo o surfactante sob agitação. Neste processo a deposição do polímero na interface água/óleo ocorre instantaneamente devido a rápida difusão do solvente orgânico (miscível em água) levando à formação imediata das nanocápsulas. Por fim, o solvente orgânico é removido por evaporação sob pressão reduzida.

A fase oleosa foi constituída de:

- PLGA 50:50 (150 mg) dissolvido em 6 ml de acetona;
- Gordura de murumuru (150 mg) dissolvida em 6 ml de acetona, filtrada com membrana filtrante Millex GN 0,22 μm (Millipore[®]) e misturada a 1 mg de β -lapachona;
- Epikuron (150 mg) dissolvido em 2 ml de acetona e 1 ml de metanol.

A fase aquosa foi constituída de Poloxamer[®] 407 (150 mg) dissolvido em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 (45 ml).

Os constituintes da fase oleosa foram dissolvidos no solvente separadamente sob agitação magnética por 10 minutos, e depois foram misturados entre si. Em seguida, fez-se a mistura de fases, em que a fase oleosa foi gotejada com auxílio de uma seringa na fase aquosa em equipamento de dispersão Ultra Turrax[®], utilizando-se velocidade de 3.000 rpm, em seguida a emulsão formada foi mantida em agitação no Ultra Turrax[®] por 10 minutos a 5.000 rpm, e mais 30 minutos sob agitação magnética. Logo após, a acetona e o metanol foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotatório, onde a suspensão de nanocápsulas foi concentrada ao volume final de 10 ml. Na figura 13 consta esquema da preparação da suspensão das NC.

As suspensões de nanocápsulas preparadas foram:

- *NCMM* - nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru (nanocápsulas vazias).
- *NCMM β -lap* - nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona.

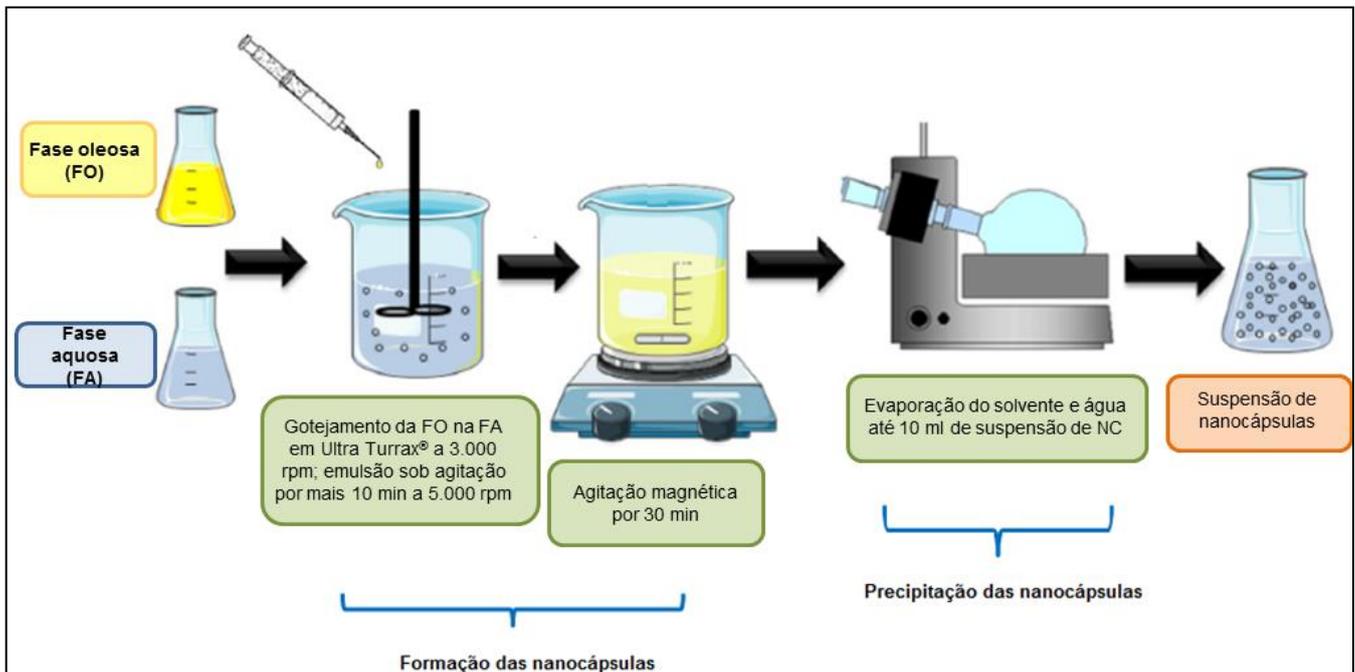


Figura 13. Esquema da preparação da suspensão de nanocápsulas. Adaptado de Santos *et al.*, 2016.

4.3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

A caracterização físico-química das nanocápsulas foi realizada avaliando-se os aspectos macroscópicos (alteração de cor, formação de cremagem e presença de agregados), pH, tamanho das partículas (z-average), índice de polidispersão (PDI), carga da superfície (potencial zeta), morfologia, quantificação da β -lapachona na formulação, análise térmica e interações químicas.

4.3.5.1 Análise macroscópica

As análises macroscópicas foram realizadas imediatamente após a retirada da suspensão do evaporador rotatório. Inicialmente foram observados os aspectos organolépticos, e em seguida alíquotas de 1 ml de cada formulação foram

centrifugadas a 2.000 rpm por 20 minutos, à temperatura de 4°C, e foi observada a ocorrência de separação de fases, presença de cremagem e precipitados.

4.3.5.2 Medida do pH

A medida do pH de cada formulação foi efetuada diretamente nas suspensões logo após a preparação utilizando-se o pHmetro.

4.3.5.3 Determinação do tamanho das partículas, da carga de superfície e do índice de polidispersão.

A determinação do tamanho (z-average), da carga de superfície (potencial zeta) e do índice de polidispersão (PDI) das partículas em suspensão foi feita através de espalhamento dinâmico de luz, mobilidade eletroforética e anemometria laser Doppler eletroforética, respectivamente, utilizando-se o Zetasizer[®]. Cada suspensão foi diluída 20 vezes em água ultrapura e, em seguida, levadas ao equipamento Zetasizer[®] para leitura. Todas as análises foram feitas em triplicata. Para construção gráfica dos dados, utilizou-se o programa GraphPad Prism 6.0[®].

4.3.5.4 Avaliação da estabilidade

Para estudo de estabilidade, as suspensões de cada nanocápsulas preparadas foram monitoradas inicialmente logo após o preparo e por períodos determinados, em um total de 60 dias, armazenadas em geladeira a 4°C sendo avaliados os aspectos macroscópicos, tamanho, carga de superfície e índice de polidispersão (PDI).

4.3.5.5 Quantificação da β -lapachona na formulação

A β -lapachona foi quantificada na formulação de nanocápsulas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diódos (CLAE-DAD) de acordo com o método isocrático descrito por Cunha Filho *et al*, 2005. Utilizou-se coluna de fase reversa C18, fase móvel metanol/água 80:20, volume de injeção de 20 μ l, fluxo de 1ml/min, comprimento de onda de 296 nm. A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque de β -lapachona em metanol, na concentração de 100 μ g/ml, utilizando-se concentrações de 40 a 0,125 μ g/ml. Para quantificação da β -lapachona, a formulação foi centrifugada a 2.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente, em seguida 100 μ l do sobrenadante foram dissolvidos em 1,9 ml de acetonitrila sob ação do ultrassom. As soluções foram filtradas e injetadas no equipamento, cada análise foi realizada em triplicata. Usando a curva de calibração, foi então calculado a quantidade da β -lapachona na amostra e a eficiência de encapsulação (EE) foi calculada conforme a fórmula:

$$EE = \beta\text{-lapachona quantificada} / \beta\text{-lapachona adicionada na formulação} \times 100$$

(Equação 1)(Ankrum *et al.*, 2014)

Para construção do gráfico da curva de calibração foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0[®].

4.3.5.6 Morfologia

A análise da forma e da morfologia de superfície das nanocápsulas preparadas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico. Logo após a preparação das nanocápsulas, a formulação foi diluída em água ultrapura em uma concentração de 5%, e 40 μ l da solução foram adicionados diretamente em suportes de latão (“stubs”), previamente limpos com

acetona. Para fixação e contraste do material, foi usado um ambiente contendo tetróxido de ósmio a 1% (40 µl de tetróxido de ósmio colocados diretamente em uma placa de vidro Petri fechada e no escuro), onde os suportes de latão foram mantidos por 1 hora. Após vaporização com tetróxido de ósmio, os “stubs” foram mantidos a temperatura ambiente por 24 horas, as amostras foram metalizadas com ouro utilizando sistema de deposição por pulverização catódica e observadas em MEV com câmera UltraScan[®] conectada ao programa Digital Micrograph 3.6.5[®] (Gatan, USA).

4.3.5.7 Investigação molecular

As interações químicas entre a β -lapachona e os componentes das nanocápsulas foram analisadas por espectrometria no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR). Foram obtidos espectros de cada componente, separadamente, e das nanocápsulas. Para leitura, utilizaram-se pastilhas de brometo de potássio (KBr, Shimadzu[®]) com massa média de 30,0 mg preparadas com aproximadamente 5,0% de amostra, prensadas a 80,0 kN por 3,0 minutos. Para cada leitura foram obtidos 45,0 registros, com resolução de 4,0 cm⁻¹ na região c entre 4.000,0 e 400,0 cm⁻¹ no modo de porcentagem de transmitância. Realizaram-se também análises utilizando o módulo de Refletância Total Atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*) (Dias, 2012). Os dados foram tratados com o software IR Solution 1.50[®] e os gráficos construídos no programa GraphPad Prism 6.0[®].

4.3.5.8 Análise térmica

A análise da perda de massa e decomposição térmica da formulação e de seus constituintes foi realizada por análise térmica por termogravimetria (TGA). Para obtenção das curvas de TGA, utilizou-se entre 2,5 e 11,8 mg das amostras em cadinhos de platina. Os ensaios foram realizados em sistema de Análise Térmica

Diferencial e Termogravimétrica Shimadzu DTG-60H[®] sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 30 a 50 ml.min⁻¹ e razão de aquecimento de 5,0^o C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 35 a 600^o C (Adaptado de Erbeta *et al.*, 2011 e Alves *et al.*, 2008). As curvas obtidas foram tratadas usando o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 6.0[®].

4.3.5.9 Análise por Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM)

A presença da β -lapachona na formulação foi determinada por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à espectrometria de massa com electrospray (CLUE-ESI-EM). Uma amostra das nanocápsulas (5,0 mg) foi dissolvida em 1 ml de acetonitrila, filtrada e injetada no equipamento para leitura. A eluição foi em gradiente linear com 5% da fase móvel A (Acetonitrila 0,1% Ácido fórmico) e 95% de fase móvel B (H₂O 0,1% Ác. Fórmico) por 11 minutos, com fluxo de 0,3 ml/min a 40°C (Adaptado de Miao *et al.*, 2008).

4.4 3º Etapa: Avaliação Biológica *in vitro*

4.4.1 EQUIPAMENTOS

- Estufa de CO₂ (THERMO Scientific);
- Fluxo unidirecional (VECO);
- Microscópio invertido (Leica);
- Capela química (Oxicamp);
- Centrífuga Mikro 220R (Hettich);
- Espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices);
- Citômetro BD FACSVerse™ Universal Loader.

4.4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Para os ensaios *in vitro* foram utilizados Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM- Gibco®), tripsina-EDTA (0,05%) (Gibco®), soro fetal bovino (Life Technologies™), penicilina/estreptomicina 100 UG/ml (Life Technologies™), azul de tripan (Sigma-Aldrich®), tampão fosfato-salino (PBS), solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila) 2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Life Technologies™), dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T Baker®), corante Cell Rox® Green (ThermoFisher), rodamina 123 (ThermoFisher), solução de anexina V (BD Pharmingen™), solução de Iodeto de propídio (BD Pharmingen™), solução de RNase (Ludwig Biotec).

4.4.3 LINHAGEM CELULAR

As células NIH/3T3 (fibroblasto de tecido embrionário de camundongos *Mus musculus*); MCF7 (adenocarcinoma humano de células epiteliais do tecido mamário) e 4T1 (carcinoma mamário murino) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC,USA). As linhagens de células tumorais de câncer de mama MCF7 e 4T1 foram escolhidas para estudo devido à alta citotoxicidade de β -lapachona comprovada sobre estas células, e a projeção de estudos em modelo animal de câncer de mama utilizando células 4T1.

4.4.4 CULTURA DE CÉLULAS

As células NIH/3T3, MCF7 e 4T1 foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultura celular contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina 100 UG/ml) em estufa umidificada (95% de umidade) a 37 °C com 5% CO₂.

4.4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila) 2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Mossman *et al.*, 1983).

As amostras-teste foram β -lapachona livre (β -Lap) sintetizada conforme descrito no item 4.1 e a β -lapachona encapsulada em nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru e β -lapachona (NCMM β -lap). O preparo das amostras-teste foi realizado da seguinte forma: i) **β -lap livre** foi dissolvida em DMSO (0,2 mg/ml) e diluída em meio de cultura DMEM suplementado a uma concentração inicial de 0,01 mg/ml. ii) 200 μ l de **NCMM β -lap** foi diluída em 1,8 ml de meio de

cultura. A partir destas soluções de β -lap livre e NCMM β -lap foram preparadas as concentrações de trabalho (0,06 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de β -lap). Foram realizados testes também com NCMM e o DMSO para assegurar que a presença destes componentes nas amostras-teste não causaram citotoxicidade.

Para o plaqueamento em placas de poliestireno com 96 poços (TPP, USA), as células foram retiradas da garrafa de cultura com auxílio da solução de tripsina-EDTA (0,05%), coradas com azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer utilizando um microscópio invertido. A concentração celular utilizada foi de $2,5 \times 10^4$ células/poço para os ensaios de 24 horas, e 1×10^4 células/poço para os ensaios de 48 e 72 horas, sendo adicionados 200 μl de suspensão celular em cada poço. Após esta etapa, as células foram mantidas por 24h em estufa úmida a 37 °C com 5% CO_2 até a adição das amostras-teste.

Após 24h do plaqueamento, o meio de cada poço foi descartado e as amostras-teste foram adicionadas nos poços designados e apenas meio de cultura foi adicionado nos poços controles. As placas foram recolocadas na estufa por mais 24, 48 ou 72h. Após esse período, o meio contendo as amostras-teste foi descartado e adicionou-se 150 μl de solução de MTT em meio de cultura (10% de MTT em PBS a 5 mg/ml e 90% DMEM) em cada poço, mantendo a placa na estufa por duas horas. Ao final do tempo de incubação, a solução de MTT foi descartada e adicionou-se 100 μl de DMSO em cada poço, as placas foram mantidas na estufa por 5 min para dissolução dos cristais de formazano, e em seguida foi realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 595 nm. Cada análise foi realizada em triplicata e a porcentagem das células viáveis foi calculada como médias de três experimentos independentes utilizando as células controle como 100%.

O cálculo dos valores do CI_{50} (concentração da droga que causa 50% de inibição da viabilidade celular) e a construção dos gráficos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism 5.0®.

O índice de seletividade (IS) indica a seletividade de uma substância entre uma linhagem tumoral e não tumoral e foi calculado segundo a fórmula:

$$IS = CI_{50} \text{ em células não tumorais} / CI_{50} \text{ em células tumorais}$$

(Equação 2) (Suffness e Pezzuto, 1990)

Sendo considerados significativos valores de IS igual ou maior que 2,0 (Suffness e Pezzuto, 1990), em que este valor indica que a substância é duas vezes ou mais ativa na linhagem tumoral do que na linhagem não tumoral.

4.4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Na análise por citometria de fluxo utilizou-se células 4T1 e MCF7, não foi realizado MTT com as células 4T1 por indisponibilidade destas no período em que os testes foram realizados.

Na análise por citometria de fluxo, as células foram semeadas em placa de 12 poços numa concentração 1×10^5 de células por poço, mantidas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após as 24 horas, a placa foi retirada da estufa, o meio de cultivo foi descartado e as amostras-teste em meio de cultura foram adicionadas, em uma concentração de 4,7 µg/ml de β-lapachona, conforme descrito no item anterior. A placa foi então incubada por 48 horas antes das análises no citômetro.

Como controle positivo de morte celular, no dia da análise foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é um agente oxidante que age na membrana lipídica e no DNA, levando a ruptura da membrana, ocasionando morte celular.

Antes do tempo final de 48 horas, adicionou-se 100 µL da solução H₂O₂ (0,34 M de H₂O₂) nos poços especificados por 30 minutos. Após este período, coletou-se o sobrenadante de cada poço em microtubos de polipropileno (Eppendorf®) de 1,5 ml. As células foram retiradas com auxílio de 400 µl tripsina-EDTA e a placa foi incubada na estufa por 5 minutos. Em seguida, colocou-se o sobrenadante coletado previamente em cada poço correspondente para neutralizar o efeito da tripsina. As

células foram ressuspensas e coletadas novamente nos microtubos correspondentes para centrifugação a 2.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 µl PBS e centrifugadas novamente para retirar o excesso de meio de cultura e amostra-teste.

Sucessivamente, as células foram processadas de acordo com cada análise conforme descrições nos itens a seguir. Durante as análises por citometria de fluxo, 10.000 eventos foram adquiridos para cada amostra e cada experimento. Para processamento dos dados utilizou-se o programa FlowJo OSX 10.6.8.

4.4.6.1 Tipo de morte celular

A morte celular pode ser avaliada observando alterações morfológicas e bioquímicas nas células, como mudanças na membrana plasmática e exposição de material genético como o DNA. Na citometria de fluxo dois marcadores são utilizados para definir se as células possuem alteração de membrana (anexina-V) e se o ácido nucléico (DNA) está exposto (iodeto de propídio - IP). É descrito que a anexina-V é uma proteína que se liga a fosfolipídios e possui alta afinidade por fosfatidilserina, e é utilizada para marcação de células em fase inicial de apoptose. O IP é um corante vital com afinidade por DNA, o qual depende da permeabilidade da membrana plasmática para se ligar ao DNA, permeabilidade acentuada que a membrana apresenta nos estágios finais da apoptose. A conjugação dos dois marcadores permite diferenciar células viáveis (não marcadas), células em apoptose inicial (marcadas apenas por anexina V), células necróticas (marcadas apenas por IP) e células em apoptose tardia (marcadas por ambos marcadores) (Li *et.al*, 1999; Rieger *et.al*, 2011)

Após o tempo de incubação com as amostra-teste e H₂O₂ e lavagem com PBS, as células foram ressuspensas com 100 µL do tampão de ligação (0,1 M de HEPES (pH 7,4), 1,4 M de NaCl e 25 mM de CaCl₂) e 5 µl de solução de anexina V por 10 minutos. Em seguida, 10 µl de solução de iodeto de propídio (20 µg/ml) foram acrescentados em cada microtubo por 5 minutos, à temperatura ambiente e

protegidos da luz. Em seguida, 300 µl de tampão de ligação foram adicionados e amostras mantidas em gelo até análise no citômetro.

4.4.6.2 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O marcador de ERO intracelular utilizado nos estudos foi o CellROX™ Green (ThermoFisher Scientific).

A solução de trabalho contendo o marcador numa concentração de 5 nM foi preparada em PBS seguindo as instruções do fabricante. As células foram então incubadas por 30 minutos com 250 µL desta solução, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, os microtubos com as amostras foram colocados em gelo até análise no citômetro.

4.4.6.3 Fragmentação do DNA e Ciclo celular

Para esta avaliação as células foram tratadas com o corante vital iodeto de propídio (IP) que se intercala proporcionalmente a quantidade de DNA nas células permitindo a identificação das fases do ciclo celular (Planchon, *et al.*, 1995).

Com o objetivo de evitar a intercalação do IP em RNA, uma solução de RNase foi preparada em PBS na concentração de 50 µg/ml e 200 µL adicionados a células por 30 minutos a 37°C. Em seguida, adicionou-se 200 µl da solução de tampão de lise contendo iodeto de propídio (IP) (10 µg/mL) por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram analisadas no citômetro.

4.4.6.4 Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

A determinação do potencial de membrana mitocondrial é utilizada para indicar viabilidade celular e apoptose. A Rodamina 123 é um composto catiônico de fluorescência verde que se associa às membranas das mitocôndrias saudáveis (Li *et.al*, 1999).

Uma solução estoque de Rodamina 123 foi preparada em etanol na concentração de 5 mg/mL e em PBS para solução de trabalho numa concentração de 5µg/mL. O volume de 300 µl da solução de trabalho foi adicionado às células, incubado por 15 minutos, protegido da luz e a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionados 300 µl de PBS. Este processo de lavagem foi realizado duas vezes para retirar o excesso de Rodamina 123. Os microtubos com as amostras foram colocados em gelo até análise por citometria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento do lapachol e Síntese da β -lapachona

A partir de 500 g de serragem de ipê obtiveram-se 4,6 g de lapachol, com um rendimento de 0,92%. Para síntese da β -lapachona, foram utilizados 2,6 g de lapachol, obtendo-se 2,4 g de β -lapachona, com um rendimento de 92,3%. Na Figura 14 consta a placa de CCD feita ao final do processo com o lapachol, β -lapachona e α -lapachona, não se observa rastro do lapachol ou de α -lapachona o que sugere bom grau de pureza dos cristais de β -lapachona, o que foi confirmado pela análise por CLAE, espectrometria no infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135.

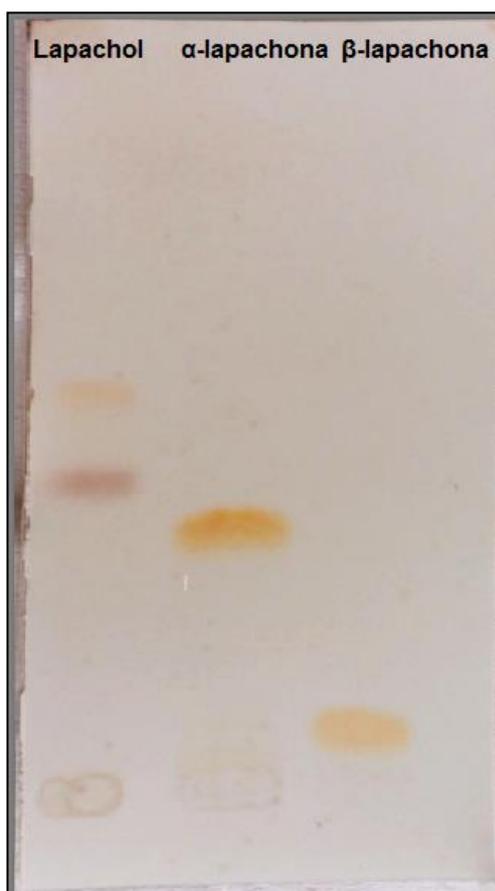


Figura 14. Placa de CCD das amostras do lapachol extraído da serragem de ipê, da α -lapachona cedida e da β -lapachona sintetizada a partir do lapachol. Eluente: Diclometano:n-hexano 8:2; Revelador: Ácido sulfúrico a 6%.

5.2 Análise por CLAE-DAD

Os cromatogramas mostrados nas Figuras 15 e 16 foram obtidos por CLAE-DAD para o lapachol e a β -lapachona obtidos, respectivamente. No cromatograma mostrado na Figura 15 aparece pico predominante referente ao lapachol, com área de 88,64% e tempo de retenção de 27,7 minutos. No espectro no UV obtido online (Figura 15) observaram-se bandas de absorção com máximos de absorção (λ_{\max}) de 250,8, 281,6 e 335,2 características do lapachol (O'Neil; 1996). No cromatograma mostrado na Figura 16, observa-se apenas o pico característico da β -lapachona, com área de 100% e tempo de retenção de 27,4 minutos. No espectro no UV obtido online (Figura 16) observaram-se as bandas de absorção com máximos de absorção (λ_{\max}) de 212,0, 256,8 e 290,0 nm, características da β -lapachona (Cunha-Filho *et al.*, 2007).

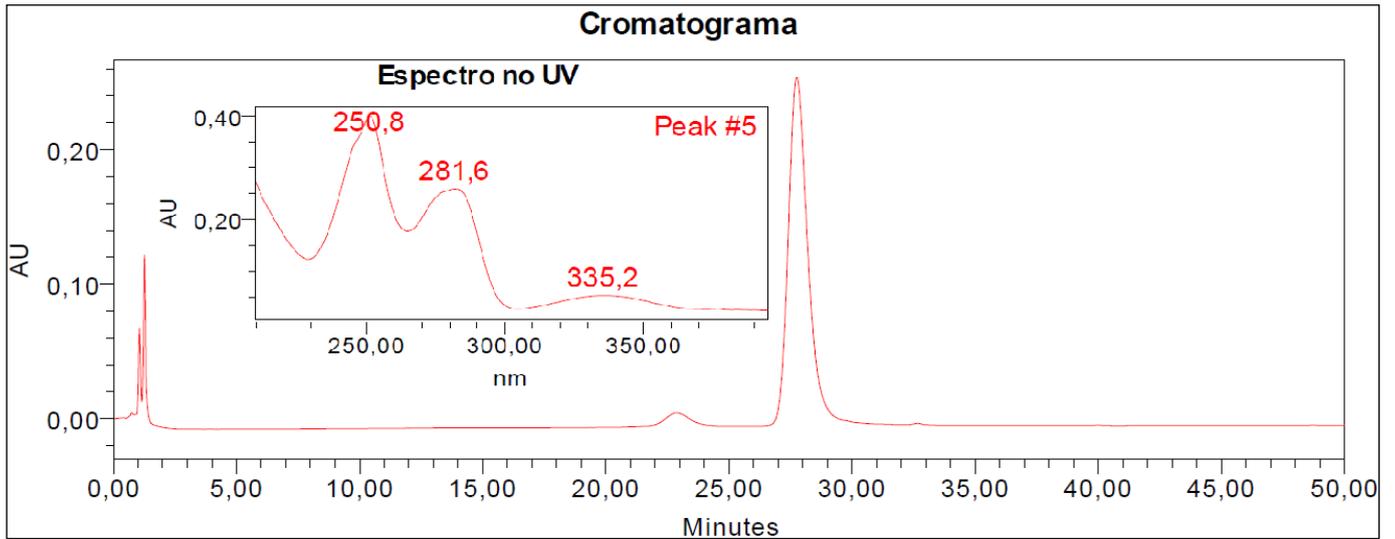


Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE-DAD, a 280 nm, e espectro no UV do lapachol.

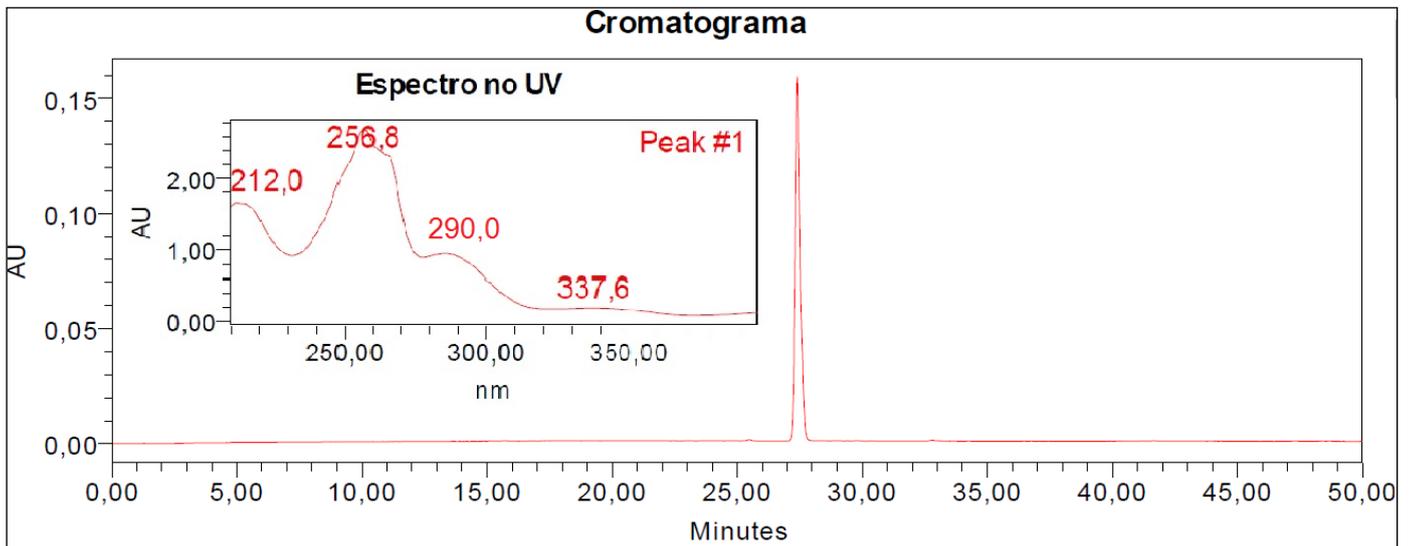


Figura 16. Cromatograma obtido por CLAE-DAD, a 350 nm, e espectro no UV da β -lapahona.

5.3 Análise por Espectrometria no infravermelho

Na análise por espectrometria no infravermelho foi possível realizar a caracterização vibracional e a identificação dos grupos funcionais presentes nos três compostos. As bandas diagnósticas da estrutura química do lapachol, β -lapachona e α -lapachona constam na Tabela 4 e nas Figuras 17, 18 e 19.

Tabela 4. Bandas de absorção identificadas nos espectros de infravermelho do lapachol, β -lapachona e α -lapachona.

Lapachol		β -lapachona		α -lapachona	
Banda (cm^{-1})	Vibração molecular	Banda (cm^{-1})	Vibração molecular	Banda (cm^{-1})	Vibração molecular
3349 e 3079	Deformação axial em O-H	3022	Deformação axial em C-H aromático	2975	Deformação axial C-H das metilas
2852	Deformação axial em C-H das metilas	2972 e 2914	Deformação axial assimétrica em C-H das metilas	1682	Deformação axial em C=O conjugado a C=C
1659 e 1638	Deformação axial em C=O conjugado a C=C	1649 e 1693	Deformação axial das carbonilas (C=O)	1610, 1575 e 1454	Deformação axial em C=C do anel aromático
769	Anel aromático com 4H adjacentes	1604	Deformação axial em C=C-O	1160 e 1118	Deformação axial C-O-C adjacente a ramificação
-	-	1566	Deformação axial em C=C do anel aromático	734	Anel aromático com 4H adjacentes
-	-	1093	Deformação axial simétrica em C-O	-	-
-	-	769	Anel aromático com 4H adjacentes	-	-

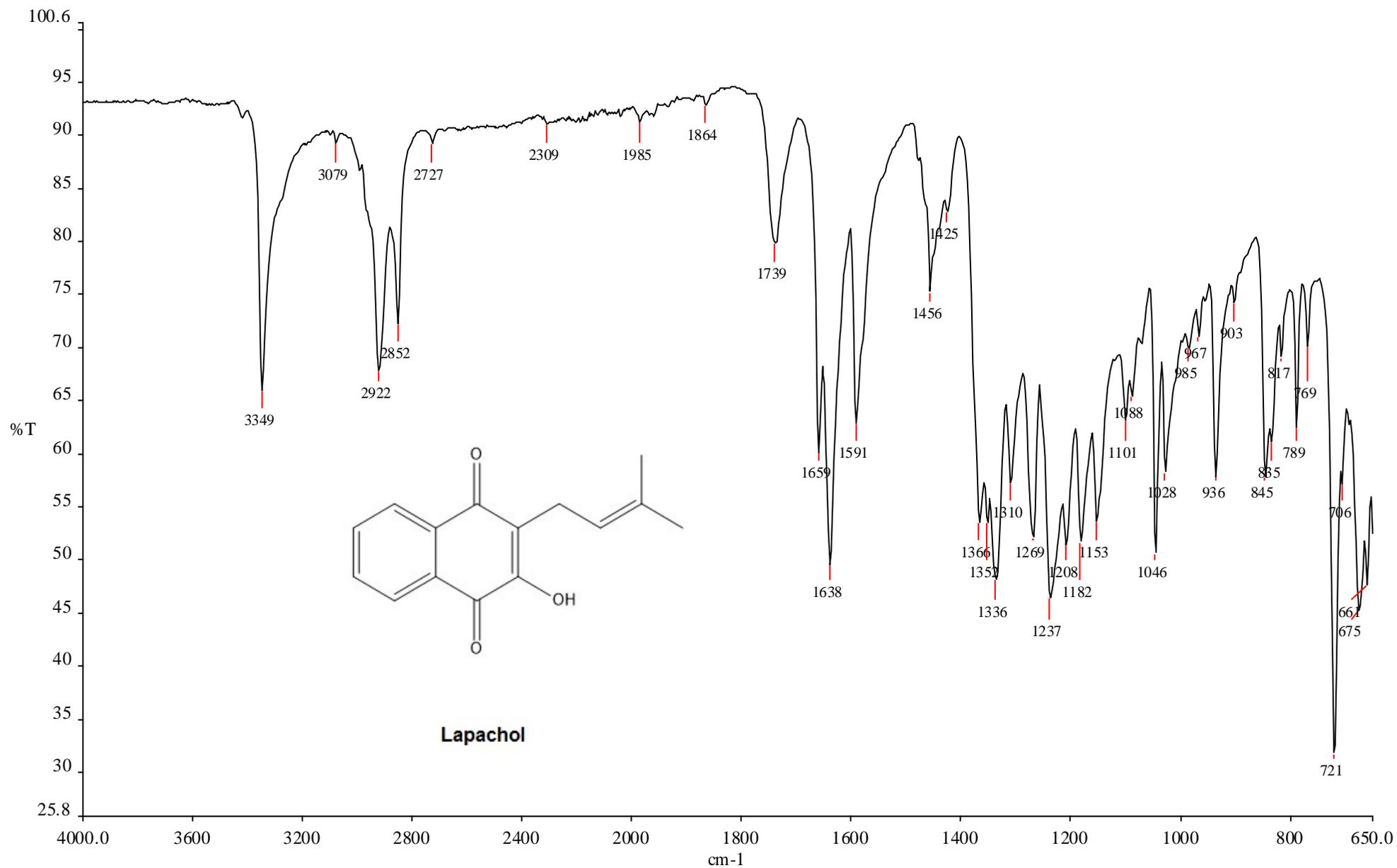


Figura 17. Espectro no infravermelho do lapachol.

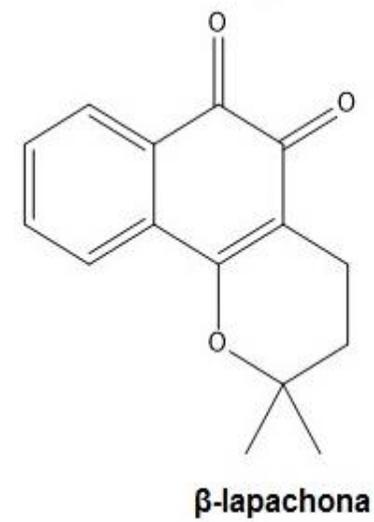
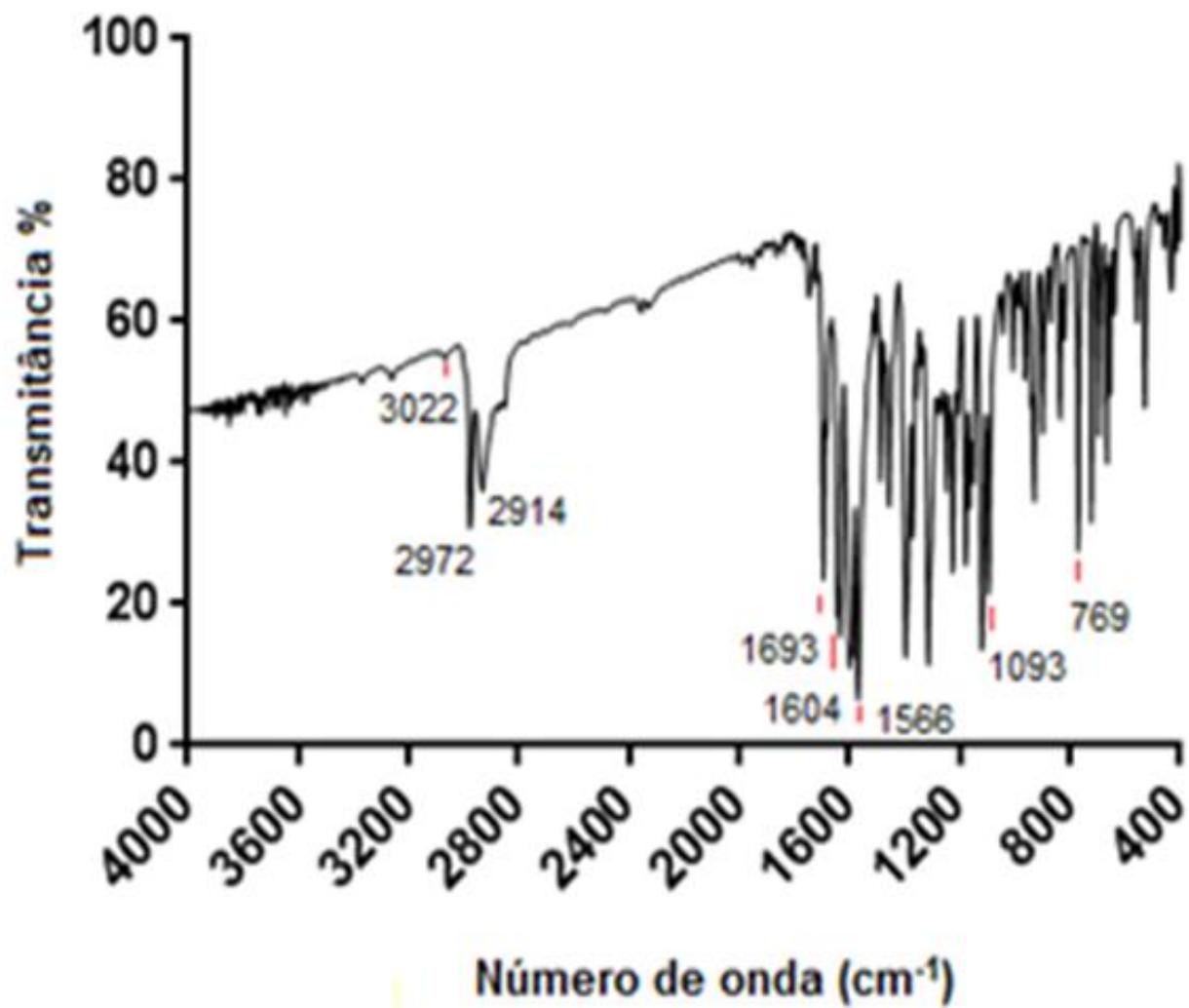
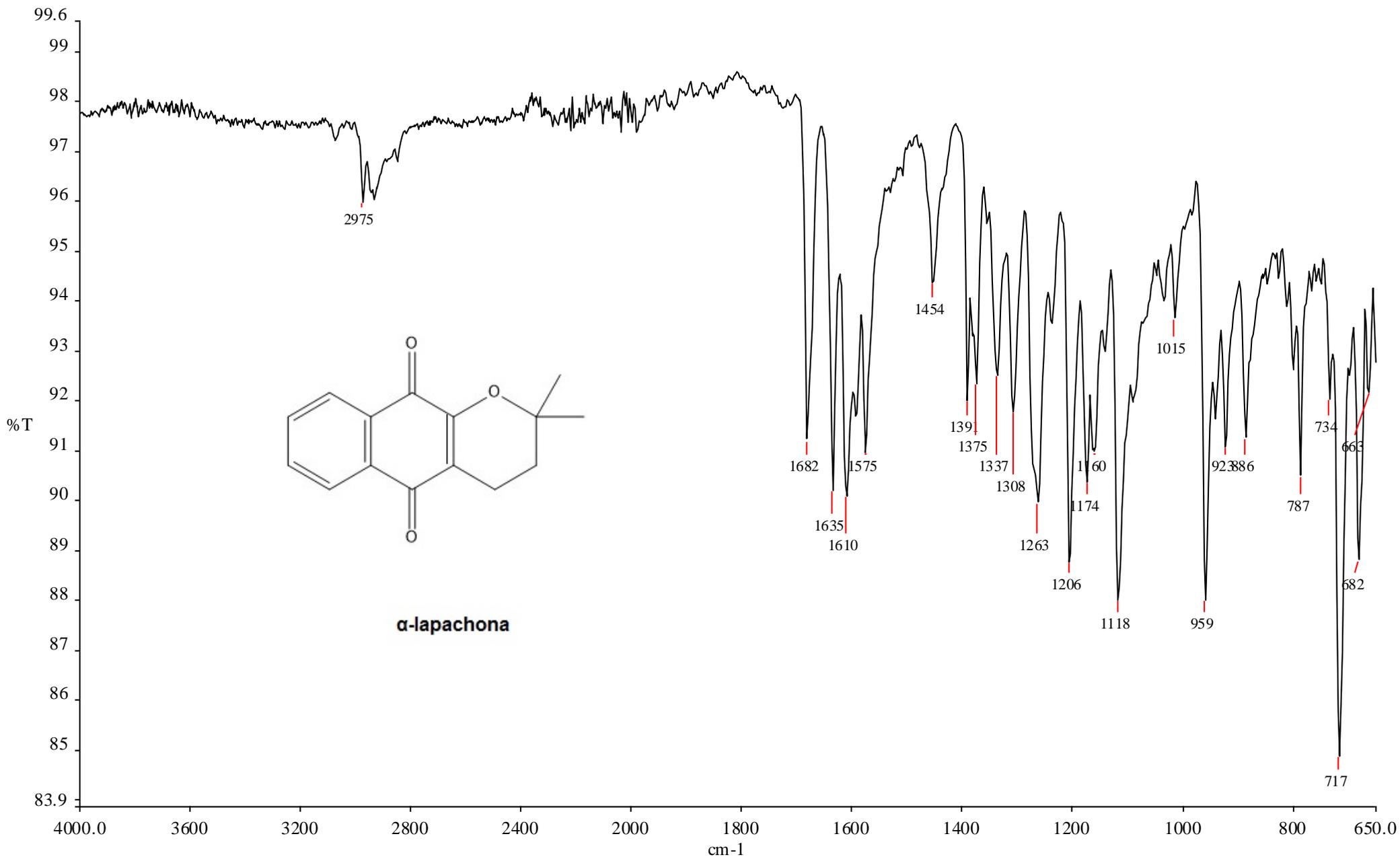


Figura 18. Espectro no infravermelho da β -lapachona

Figura 19. Espectro no infravermelho da α -lapachona.

5.4 Análise por RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 135

Para confirmação identidade química da β -lapachona obtida, compararam-se seus espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 135 com espectros do lapachol e da α -lapachona (Figuras 20 a 27). Nas Tabelas 6 a 8 se observam os deslocamentos químicos (ppm), as multiplicidades e as constantes de acoplamento (J).

No espectro RMN de ^1H do lapachol (Figura 20) observam-se dois simpletos, em $\delta 1,6$ e $\delta 1,7$, para os quais se tem uma integração correspondente a seis hidrogênios, e que, portanto, são atribuídos aos hidrogênios dos dois grupos metila, 3H-4' e 3H-5'. O hidrogênio do carbono sp^2 (H-2') origina um tripleto em $\delta 5,2$ ($J 7,2$) sendo sua multiplicidade devida ao acoplamento com os dois hidrogênios vicinais (2H-1'). Estes (2H-1'), por sua vez, são vistos como um duplete em $\delta 3,3$ ($J 7,2$). O hidrogênio da hidroxila origina um simpleto em $\delta 7,4$. Os quatro hidrogênios do anel aromático originam dois multipletos, um em $\delta 8,0$ referente aos hidrogênios H-5 e H-8, e outro em $\delta 7,7$, de H-6 e H-7.

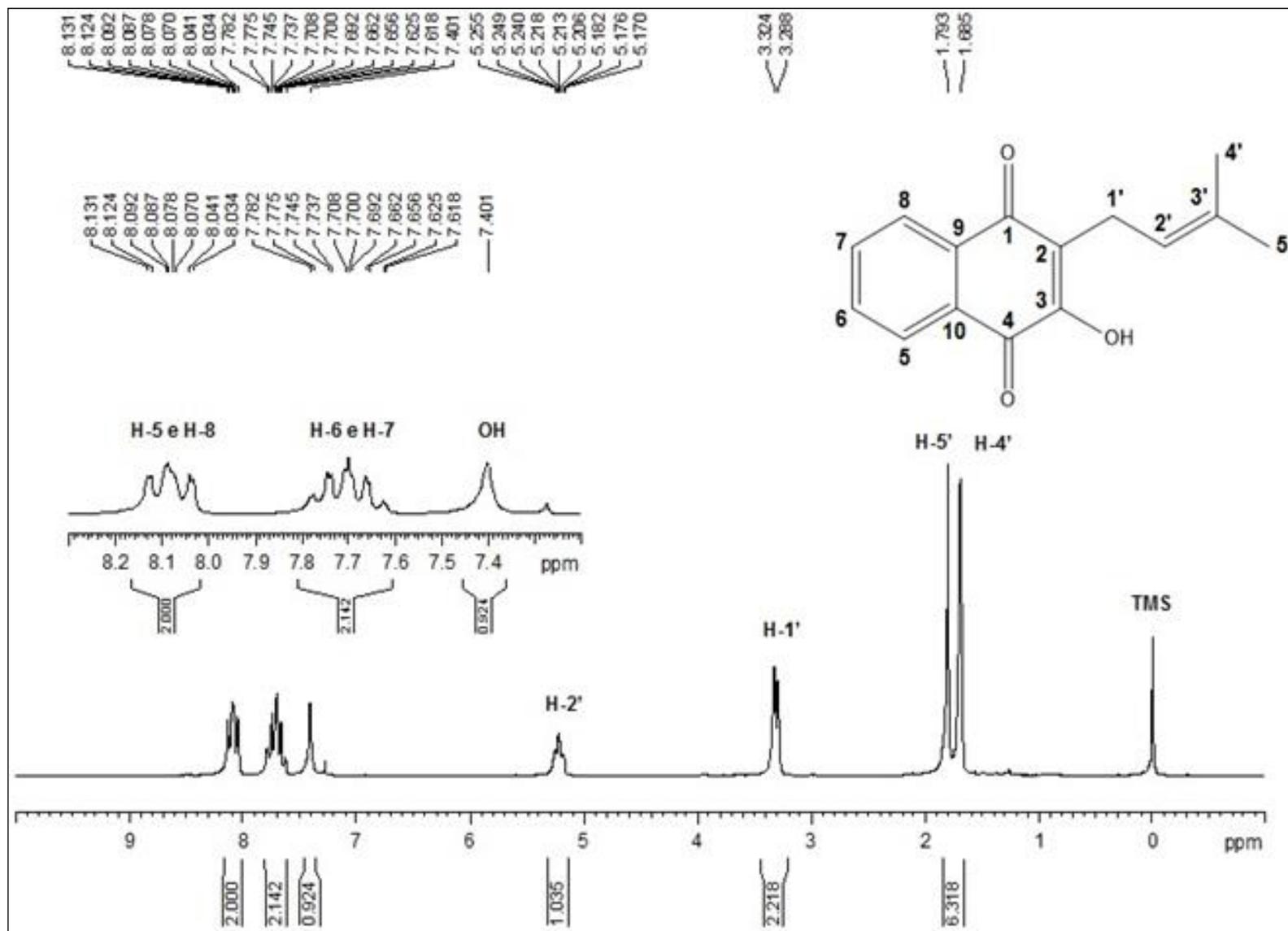


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H do lapachol (CDCl₃, 200 MHz).

Na Tabela 5, constam os dados referentes ao RMN de ^1H do lapachol. Em comparação com a literatura, há pequenas diferenças em relação aos hidrogênios do anel aromático, o que se deve, possivelmente, às condições diferentes de análise empregadas.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) do lapachol extraído da serragem do ipê e comparação com a literatura.

Posição	Presente Trabalho(*) (CDCL ₃ e 200 MHz)	Delarmelina <i>et al.</i> , 2016(*) (CDCL ₃ e 400 MHz)	Posição	Silva, 2009(*) (CDCL ₃ e 200 MHz)
5 e 8	8,0 (2H) / m	8,0 (2H) / m	5	8,1 (1H) / dd / 7,4; 1,1
6 e 7	7,7 (2H) / m	7,6 (2H) / m	8	8,0 (1H) / dd / 7,7; 1,1
1'	3,3 (2H) / d / 7,2	3,2 (2H) / d	6	7,6 (1H) / td / 7,4; 1,1
2'	5,2 / t / 7,2	5,1 / m	7	7,7 (1H) / dd / 7,7; 1,3
4'	1,6 (3H) / s	1,6 (3H) / s	1'	3,2 (1H) / d / 7,3
5'	1,7 (3H) / s	1,7 (3H) / s	2'	5,1 (1H) / m
OH	7,4 / s	-	4'	1,6 (3H) / s
-	-	-	5'	1,7 (3H) / s
-	-	-	OH	7,3 / s

(*) δ ppm / multiplicidade / *J* (Hz)

No espectro RMN de ^1H da β -lapachona (Figura 21) observa-se um simpleto em δ 1,4 que é referente aos seis hidrogênios dos dois grupos metila (3H-1' e 3H-2'). Os prótons dos dois grupos metilênicos do anel pirânico (2H-3 e 2H-4) originam dois tripletos em δ 1,8 e em δ 2,5. O primeiro destes tripletos é atribuído aos hidrogênios metilênicos do C-4. O segundo tripleto é relativo aos hidrogênios de C-3 que são magneticamente mais desprotegidos devido à sua vizinhança com o oxigênio do anel heterocíclico. Os quatro hidrogênios referentes ao anel aromático são vistos como dois dupletos duplos, um deles em δ 8,0 correspondente ao H-9, mais desblindado pela proximidade com a carbonila, e em δ 7,8 referente ao H-12 enquanto que ao H-10 e H-11 são atribuídos os dois tripletos duplos em δ 7,5 e em δ 7,6, respectivamente, sendo H-11 o mais desblindado pela conjugação com o grupo carbonila (C=O).

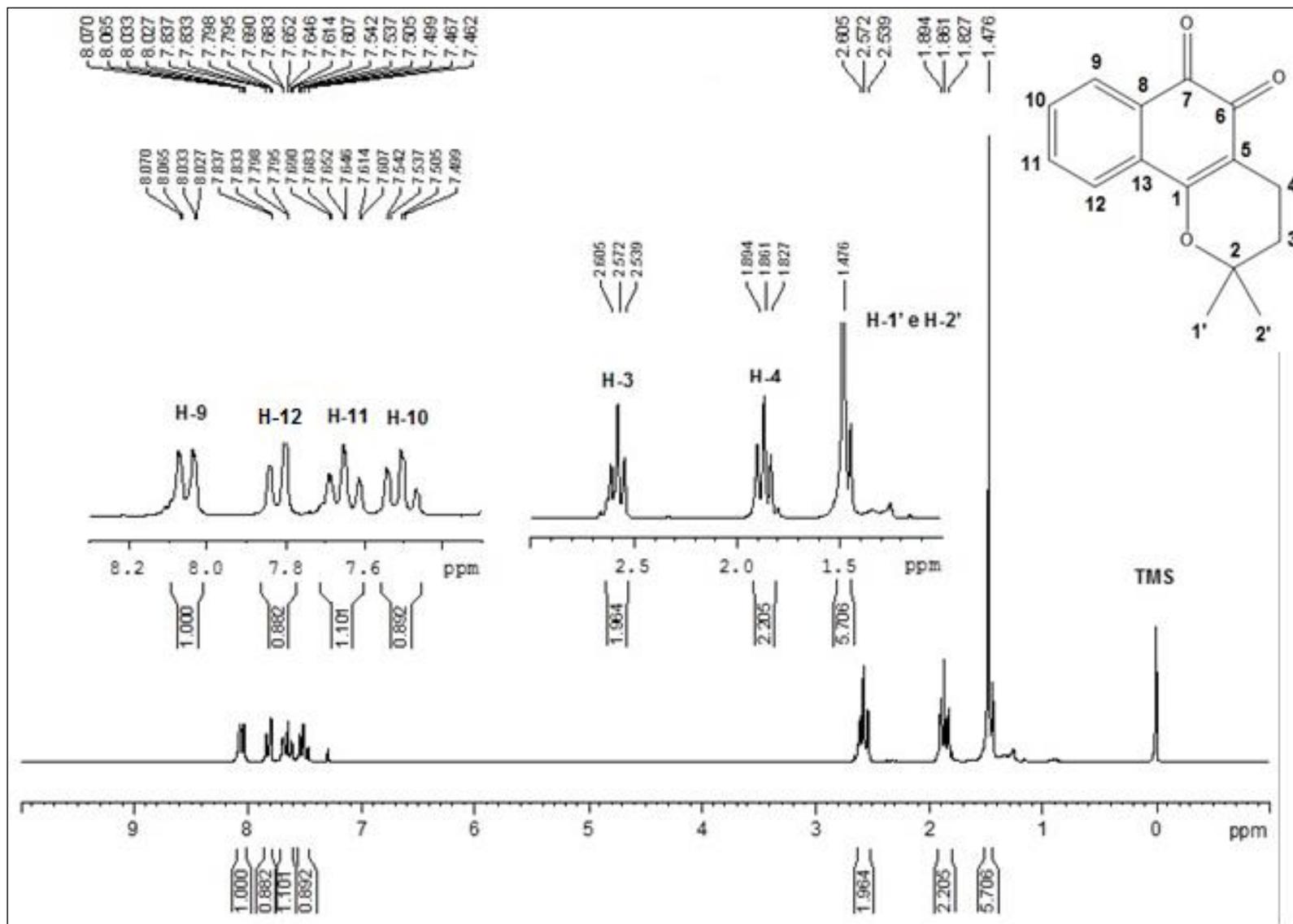


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).

Na Tabela 6, estão mostrados os deslocamentos químicos (ppm), as multiplicidades e as constantes de acoplamento (J) para a β -lapachona. Em comparação com a literatura observam-se resultados muito semelhantes.

Tabela 6. Dados de RMN ^1H (200 MHz) da β -lapachona e comparação com a literatura.

Posição	Presente Trabalho (*) (CDCl_3 e 200 MHz)	Silva, 2009(*) (CDCl_3 e 200 MHz)	Claessens 2010(**) (CDCl_3 e 300 MHz)	Paludo 2013(**) (CDCl_3 e 300 MHz)
1' e 2'	1,4 (6H) / s	1,4 (6H) / s	1,4	1,4
3	1,8 (2H) / t / 6,8	1,8 (2H) / t / 6,7	1,8	1,8
4	2,5 (2H) / t / 6,8	2,5 (2H) / t / 6,7	2,5	2,5
9	8,0 (1H) / dd / 7,6; 1,2	8,0 (1H) / dd / 7,4; 1,1	8,0	8,0
10	7,5 (1H) / td / 8,0; 1,2	7,5 (1H) / td / 7,4; 1,1	7,5	7,5
11	7,6 (1H) / td / 7,8; 1,4	7,6 (1H) / td / 7,4; 1,3	7,6	7,6
12	7,8 (1H) / dd / 7,6; 0,8	7,8 (1H) / dd / 7,7; 1,1	7,8	7,8

(*) δ ppm / multiplicidade / J (Hz) e (**) δ ppm

No espectro RMN de ^1H da α -lapachona (Figura 22) observa-se um simpleto referente aos hidrogênios metílicos (H-1' e H-2') em δ 1,4. Dois tripletos referentes aos hidrogênios dos grupos metilênicos do anel pirano, um em δ 1,8 relativo à 2H-3, e o outro em δ 2,6 referente à 2H-4, este último sendo mais desprotegido pelo efeito anisotrópico da carbonila no anel vizinho. Quanto aos hidrogênios aromáticos, observa-se um multiplete em δ 7,6 referente ao H-9 e H-10, e um triplete em δ 8,0 referente ao H-8 e H-11, mais desprotegidos devido à vizinhança com a carbonila.

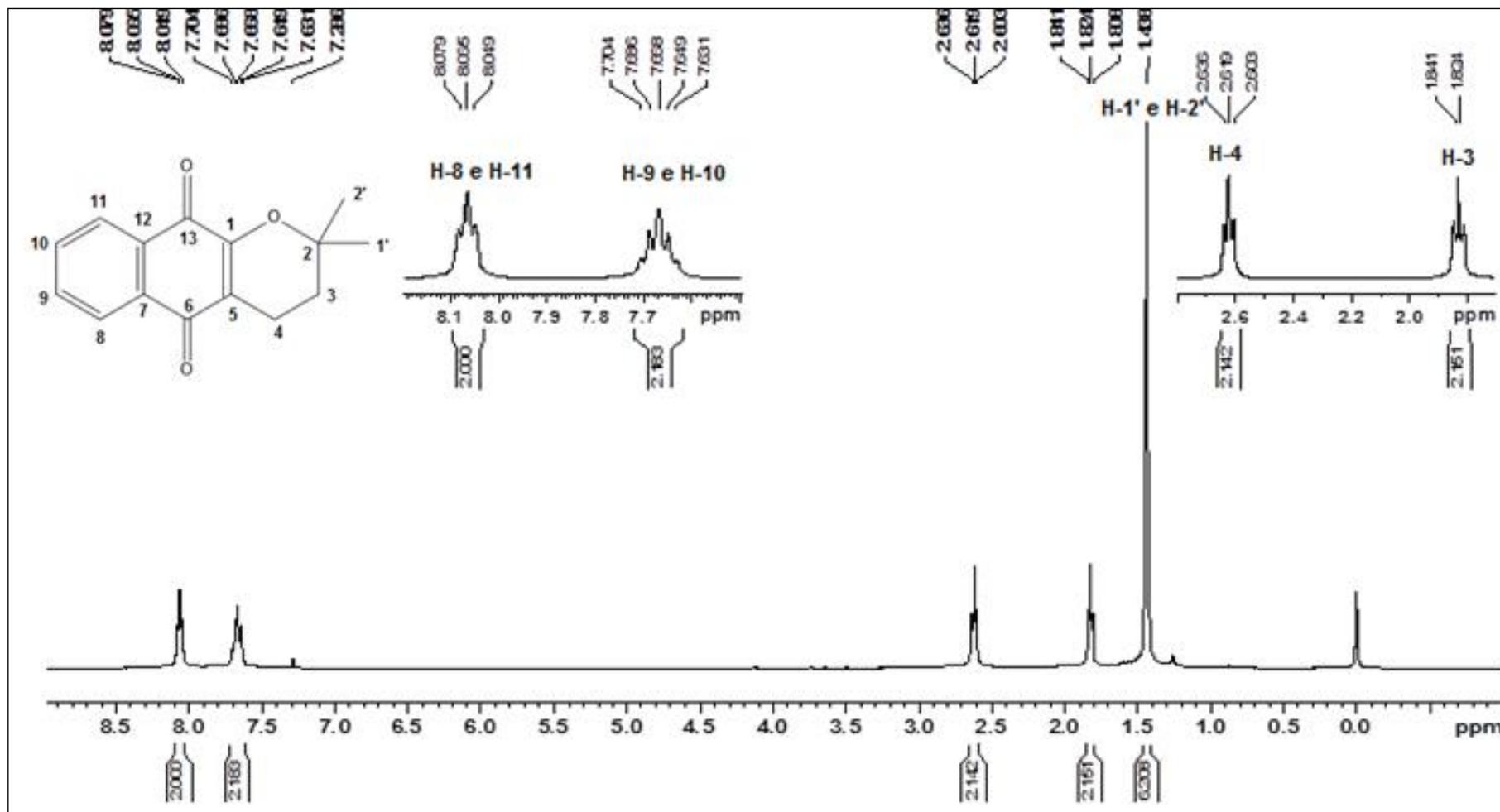


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).

Na Tabela 7, se observam os deslocamentos químicos (ppm), as multiplicidades e as constantes de acoplamento (J) para a α -lapachona. Em comparação com a literatura, observam-se resultados muito semelhantes.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) da α -lapachona e comparação com a literatura.

Posição	Presente Trabalho(*) (CDCL₃ e 200 MHz)	Delarmelina <i>et.al</i>, 2016(*) (CDCL₃ e 400 MHz)
1' e 2'	1,4 (6H) / s	1,3 (6H) / s
3	1,8 (2H) / t / 6,6	1,7 (2H) / t
4	2,6 (2H) / t / 6,6	2,5 (2H) / t
9 e 10	7,6 (2H) / m	7,6 (2H) / m
8 e 11	8,0 (2H) / t / 6,0	8,0 (2H) / m

(*) δ ppm / multiplicidade / J (Hz) e (**) δ ppm / multiplicidade

A diferença entre os espectros de RMN de ^1H de β -lapachona e α -lapachona (Figura 23) é notável quanto aos hidrogênios aromáticos devido à posição destes em relação às carbonilas. Na α -lapachona, os hidrogênios possuem posições bem semelhantes em relação às carbonilas, já na β -lapachona, os hidrogênios são bem distintos entre si, pois cada um está a uma distância da carbonila, o que torna o ambiente químico notavelmente diferente pela influência do campo magnético gerado sobre os hidrogênios aromáticos da β -lapachona o que se expressa nos diferentes deslocamentos químicos observados para cada hidrogênio.

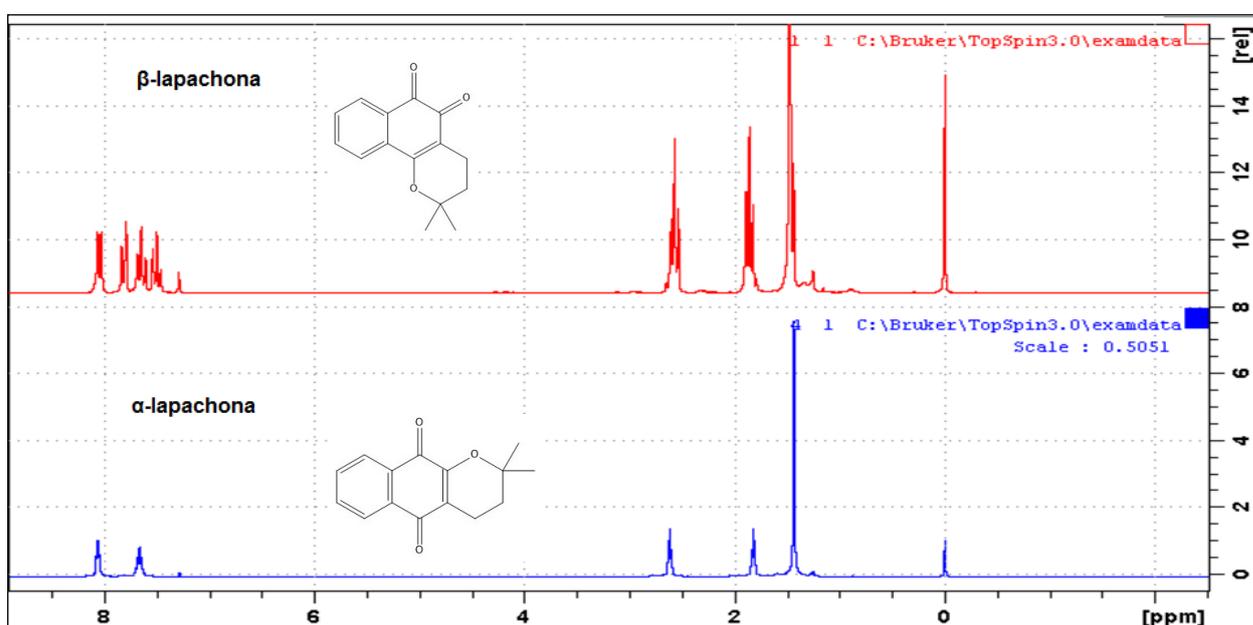


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da β -lapachona e da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 do lapachol, β -lapachona e α -lapachona constam nas Figuras 24, 25 e 26 respectivamente. Os carbonos presentes nas moléculas são indicados nos espectros. Na Tabela 8 estão listados os deslocamentos químicos encontrados para cada carbono das substâncias. A análise dos dados de ressonância confirma a identidade química das quinonas deste trabalho, indicando ainda alto grau de pureza dos cristais por não se observarem nos espectros picos não esperados.

Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C (200 MHz) do lapachol, β -lapachona e α -lapachona.

Lapachol		β -lapachona		α -lapachona	
Carbono	δ (ppm) em CDCl_3 200 MHz	Carbono	δ (ppm) em CDCl_3 200 MHz	Carbono	δ (ppm) em CDCl_3 200 MHz
C-4'	18,0	C-1' e C-2'	26,9	C-1' e C-2'	26,6
C-1'	22,7	C-3	16,3	C-3	16,8
C-5'	25,9	C-4	32,7	C-4	31,6
C-2'	119,8	C-2	112,8	C-5	120,3
C-3'	123,6	C-12	124,2	C-2	132,2
C-7	126,2	C-10	128,8	C-7	126,1
C-6	126,9	C-13	130,2	C-12	126,4
C-2	129,5	C-11	130,7	C-2	132,2
C-5	133,0	C-5 e C-8	132,7	C-9 e C-10	133,0
C-8	133,5	C-9	134,9	C-8 e C-11	133,9
C-9	135,0	C-1	162,3	C-6	180,1
C-10	152,8	C-6	178,8	C-13	184,4
C-4	181,8	C-7	183,0	-	-
C-1	184,7	-	-	-	-

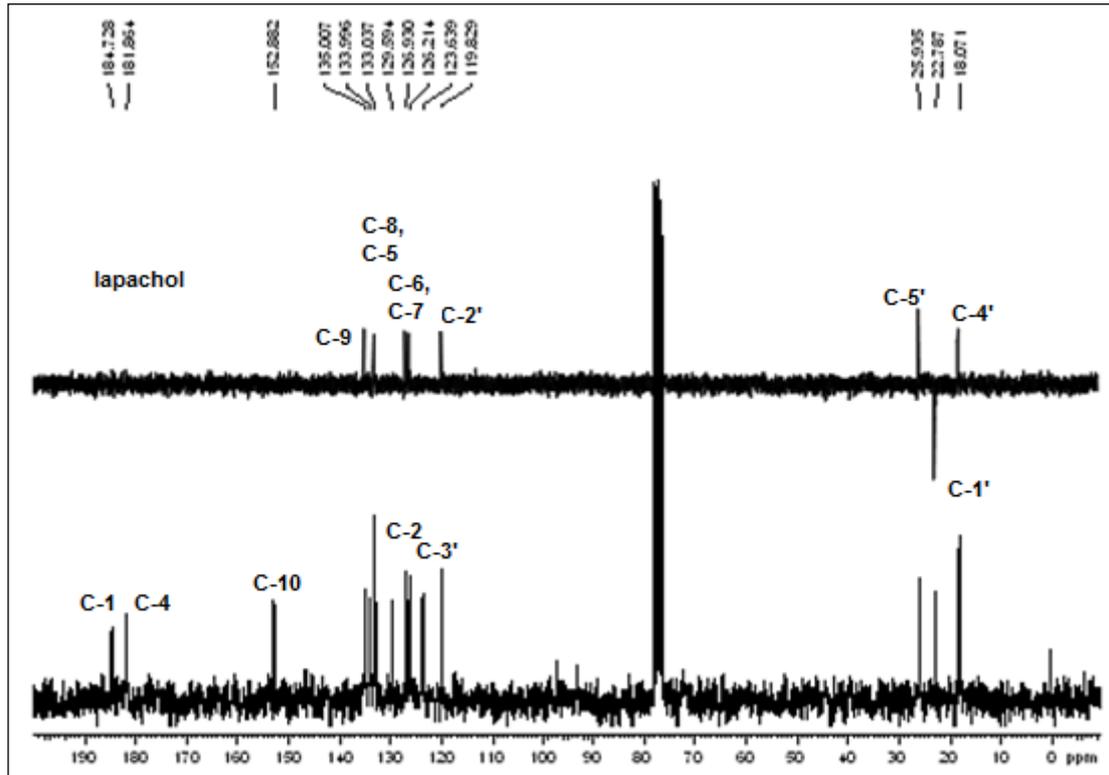


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 do lapachol (CDCl_3 , 200 MHz).

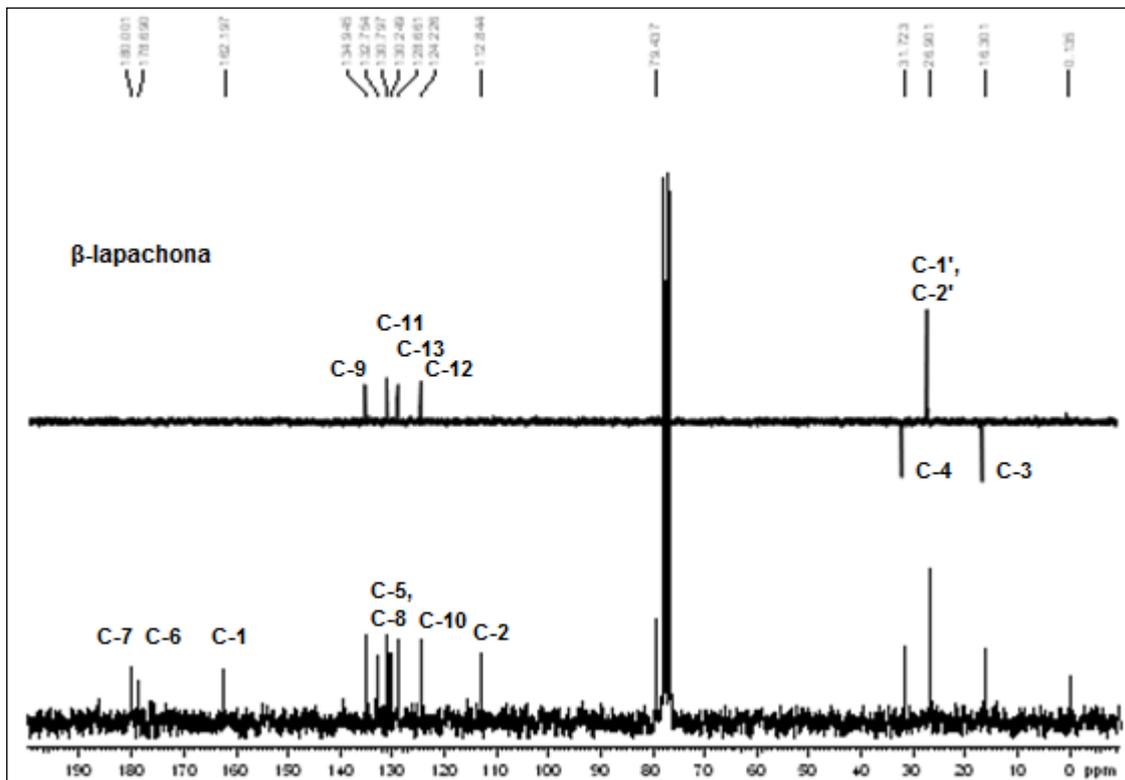


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135 da β -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).

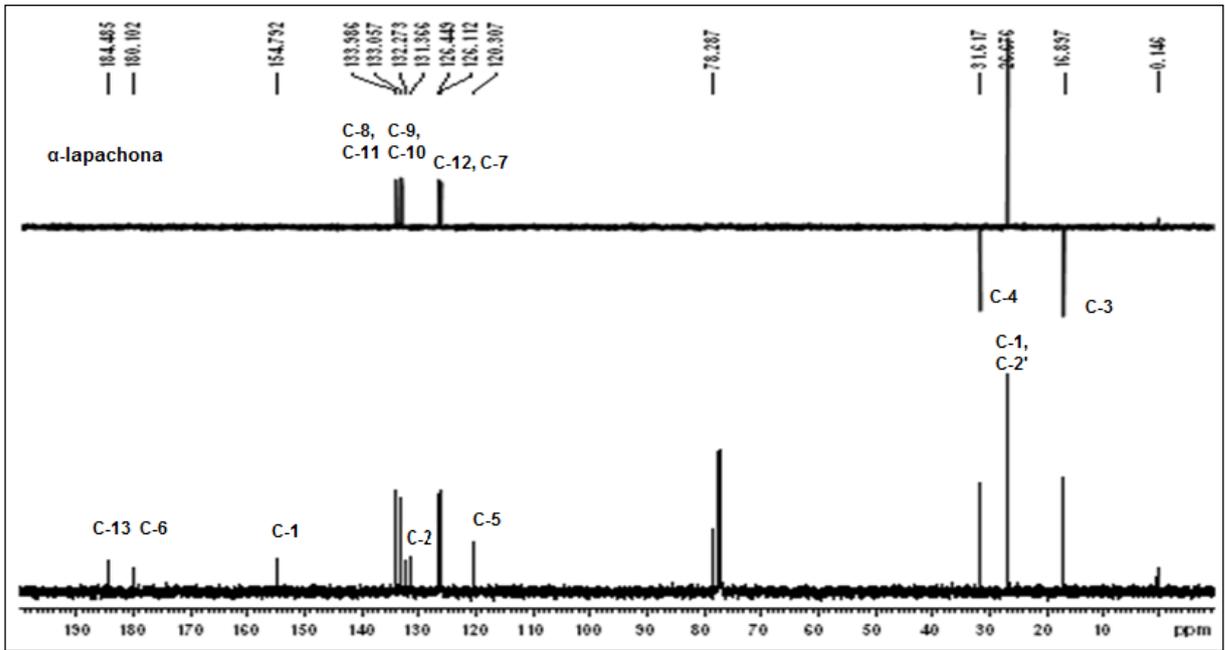


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da α -lapachona (CDCl_3 , 200 MHz).

5.5 Nanocápsulas (NC) de PLGA com Núcleo Oleoso de gordura de murumuru

Foram preparadas nanopartículas para carreamento de β -lapachona do tipo nanocápsula, constituída de PLGA e núcleo oleoso de gordura de murumuru. O método utilizado produziu nanocápsulas com população monodispersa ($PDI < 0,2$), tamanho médio (z-average) de $132,5 \pm 2,0$ nm para NCMM e $149 \pm 1,3$ nm para NCMM β -lap; o potencial zeta ficou próximo ao isoeletrico com valores de $-0,009 \pm 0,2$ mV para NCMM e de $0,15 \pm 0,2$ mV para NCMM β -lap e valor de pH próximos ao fisiológico de 6,78 e 6,82 para NCMM e NCMM β -lap, respectivamente.

O método de nanoprecipitação, utilizado neste trabalho, é largamente utilizado para preparação de sistemas nanoestruturados com diferentes polímeros e copolímeros devido à sua simplicidade e reprodutibilidade (Chin *et al.*, 2011; Mora Huertas *et al.*, 2012; Yordanov *et al.*, 2012; Alshamsan, 2014), tratar-se de um método simples, rápido e eficaz para carregamento de espécies hidrofóbicas com alta eficiência de encapsulamento (Drozdek e Bazylińska, 2016) e melhora da hidrossolubilidade (Lebouille *et al.*, 2014), e que sob condições apropriadas, como concentração adequada do surfactante (2 a 5% da fase aquosa) (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Chin *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2015) e acertada velocidade de agitação mecânica durante a mistura das fases, origina nanopartículas com distribuição de tamanho unimodal entre 50-300 nm (Lepeltier *et al.*, 2014).

A carga de superfície (potencial zeta) das nanocápsulas está associada à natureza química e concentração do polímero, do surfactante, da droga encapsulada e do pH do meio (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Mora-Huertas *et al.*, 2012; Yordanov *et al.*, 2012). Quando em nanoformulação utiliza-se surfactante não iônico e meio tamponado, a carga da superfície das nanopartículas estará relacionada às cargas expostas pelo polímero. Polímeros, do tipo poliéster, como o PLGA, conferem carga negativa à superfície devido aos grupos carboxílicos terminais da sua cadeia (Mora-Huertas *et al.*, 2010), mas a presença do surfactante pode mascarar estes valores (Ankrum *et al.*, 2014) reduzindo a quantidade de cargas negativas na superfície da partícula. O baixo valor do potencial zeta observado nas formulações de nanocápsulas contendo β -lapachona não foi diferente dos apresentados pelas

nanocápsulas vazias, sugerindo que a β -lapachona está contida no meio oleoso interno.

O tamanho da partícula e a carga de superfície são dois importantes parâmetros para avaliação da estabilidade das nanopartículas. O aumento no tamanho das partículas indica fusão dos glóbulos, processo de coalescência, e início de desestabilização ao longo do tempo; e a diminuição do tamanho indica degradação (Tadros *et al.*, 2004).

Quanto à carga de superfície, quanto maior o seu valor, maior as forças de repulsão entre as partículas prevenindo a agregação e propiciando uma formulação mais estável (Ankrum *et al.*, 2014). A extensão dos valores de carga da superfície é de ± 10 a ± 30 mV (Vila *et al.*, 2002; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

O índice de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos e segundo Zhang e colaboradores (2008), um valor adequado seria $< 0,3$.

As nanocápsulas produzidas neste estudo, apesar do baixo valor de carga da superfície, mantiveram-se estáveis quando armazenadas por 60 dias a 4°C, sem apresentar sinais de instabilidade como turvação, precipitados, cremagem e floculação (Figura 27), com valores constantes de tamanho, carga de superfície e PDI (Tabela 9).

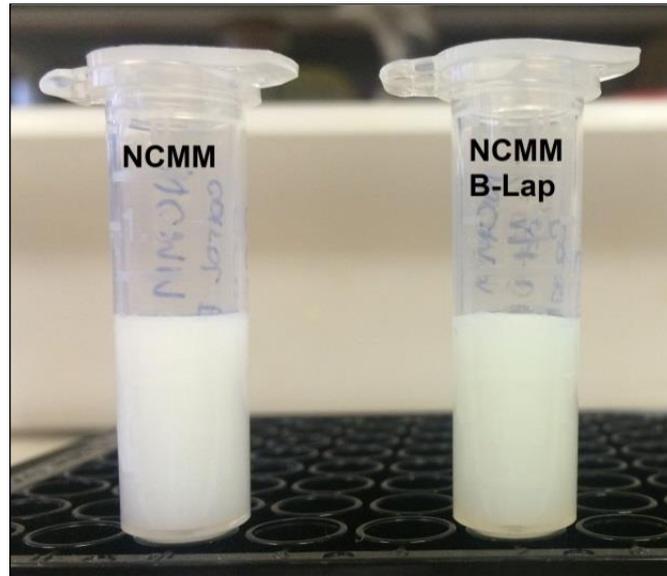


Figura 27. Formulações de nanocapsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru após 60 dias de armazenamento a 4°C. NCMM (nanocápsula vazia) e NCMM β -lap (nanocápsula contendo β -lapachona).

Tabela 9. Estabilidade de suspensões de nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru, em função do tempo. NCMM (nanocápsulas vazias) e NCMM β -lap (nanocápsulas contendo β -lapachona).

Formulações	Tempo (dias)	Z-ave (nm) \pm D.P	PDI \pm D.P	P.Z (mV) \pm D.P
NCMM	1	132,5 \pm 2,0	0,145 \pm 0,02	-0,009 \pm 0,2
	30	151 \pm 0,4	0,16 \pm 0,2	-0,4 \pm 0,3
	60	155 \pm 1,4	0,17 \pm 0,02	-1,7 \pm 0,3
NCMMβ-lap	1	149 \pm 1,3	0,18 \pm 0,04	0,15 \pm 0,2
	30	169 \pm 2,2	0,16 \pm 0,04	-0,5 \pm 0,4
	60	171 \pm 2,5	0,18 \pm 0,03	-0,8 \pm 0,7

Legenda: Z-ave: Z-average; P.Z: potencial zeta; D.P: desvio padrão.

5.6 Eficiência de encapsulação da β -lapachona em nanocápsula de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.

Para determinar a eficiência de encapsulação (EE) fez-se uma curva de calibração (Figura 28) conforme descrito no item 4.2.5.5, os valores das áreas dos picos de cada concentração constam na Tabela 10. O índice de correlação (r^2) obtido para esta curva foi de 0,9997, a Equação 3 foi utilizada para determinação da concentração de β -lapachona.

$$\text{Concentração de } \beta\text{-lapachona } (\mu\text{g/ml}) = \text{área do pico} - 6331/29043$$

(Equação 3)

A quantidade da β -lapachona na formulação foi $9,4 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$, com uma eficiência de encapsulação (EE) de 94, 3%. O núcleo oleoso das nanocápsulas favorece a alta eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos (Carreno *et al.*, 2016; Alshamsan, 2014).

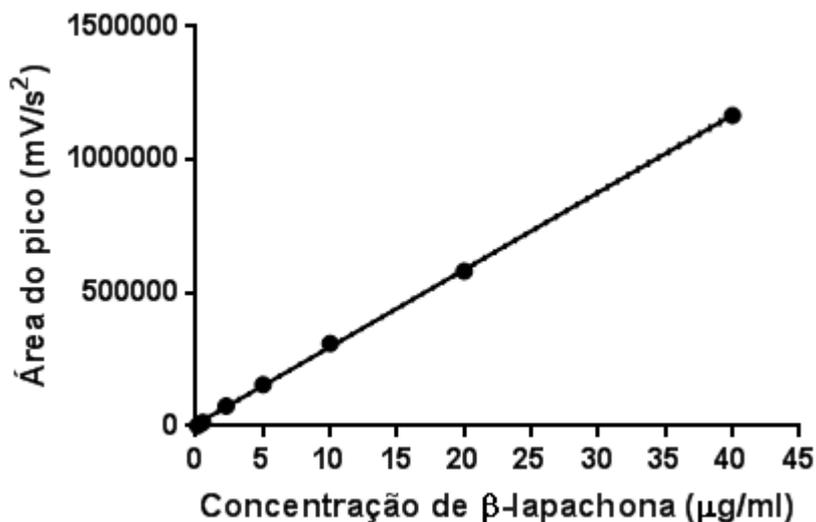


Figura 28. Curva de calibração para β -lapachona.

Tabela 10. Áreas dos picos e concentrações da curva de calibração para quantificação da β -lapachona.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Área do pico (mV/s^2)			Média	Desvio padrão
0,125	2166	2399	2069	2211,333	169,6064
0,5	14548	14301	14361	14403,33	128,8268
2,25	76354	75877	74968	75733	704,1314
5,0	155599	155102	155372	155357,7	248,8098
10,0	309497	310430	311241	310389,3	872,7109
20,0	572285	595574	577034	581631	12306,25
40,0	1162087	1167807	1171181	1167025	4597,157

5.7 Morfologia das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.

As imagens obtidas em MEV das NC mostraram as formas esféricas (Figura 29). A característica esférica ou globular é explicada pela nucleação que ocorre na mistura de fases (Teoria Clássica da Nucleação), em que a fase oleosa, por ser imiscível na fase aquosa, quando gotejada nesta forma gotículas esféricas devido à tensão superficial existente no sistema (Lepeltier *et al.*, 2014).

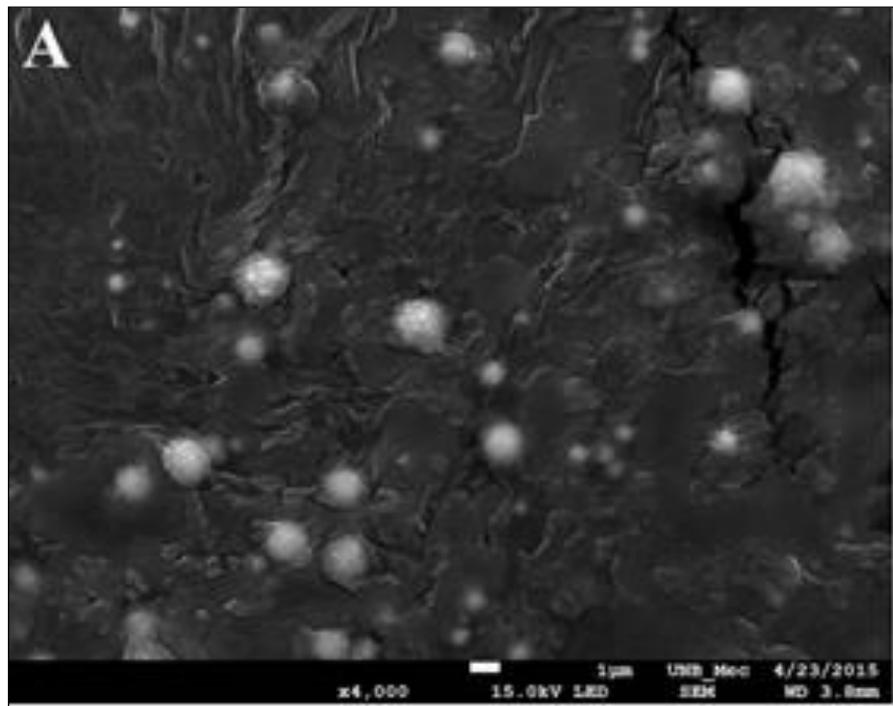


Figura 29. Fotomicrografia das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona. Solução de NC a 5% em água ultrapura. Aumento de 4.000x.

5.8 Investigação molecular das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.

A espectrometria FTIR foi utilizada fim de investigar possíveis interações químicas e estruturais entre o PLGA, a gordura de murumuru e a β -lapachona para confirmação da composição qualitativa das nanocápsulas formuladas. Os espectros de infravermelho dos constituintes das NCMM β -lap são apresentados na Figura 30, as principais bandas identificadas nos espectros das amostras e as vibrações moleculares constam na Tabela 11. As bandas observadas correspondem às reportadas na literatura para o PLGA (Stevanovic *et al.*, 2008) e para β -lapachona (Cunha-Filho *et al.*, 2007). No espectro de NCMM β -lap é possível observar as bandas características do PLGA e da gordura de murumuru e prováveis sobreposições destas bandas em 2845, 1737 e 1064 cm^{-1} , sendo possível inferir que não há interação química, mas apenas estrutural entre os constituintes com forças intermoleculares fracas como ligações de hidrogênio. As bandas de absorção específicas da β -lapachona não são bem evidenciadas, o que se justifica pela razão entre PLGA:Gordura: β -lapachona utilizada na formulação das nanocápsulas, em que apenas 0,4% corresponde à β -lapachona.

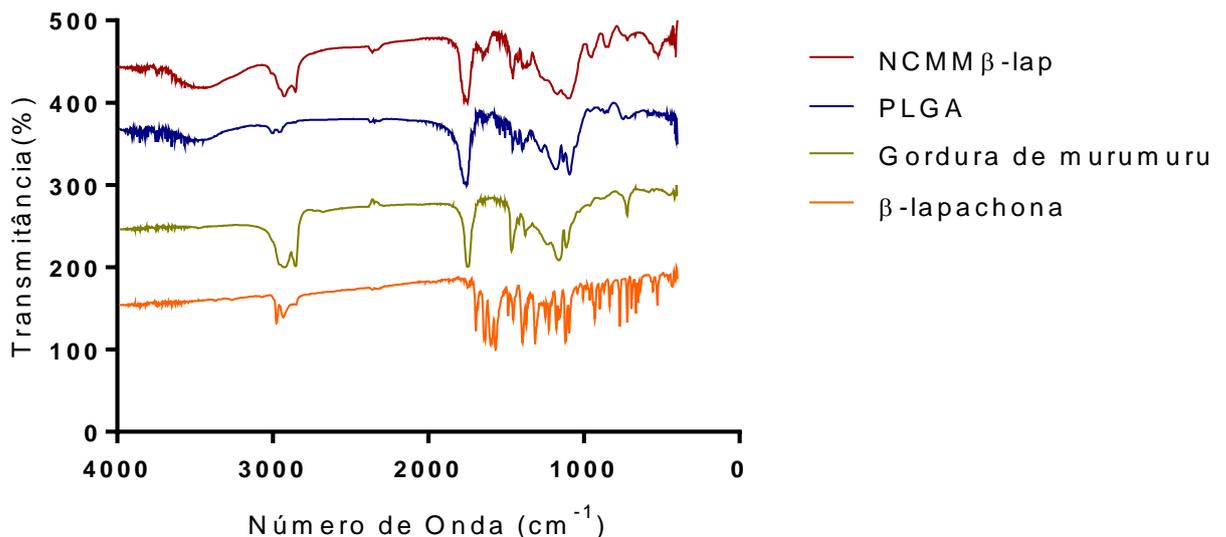


Figura 30. Espectros FTIR das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru (NCMM β -lap) e seus constituintes (PLGA, gordura de murumuru e β -lapachona) em pastilha de KBr.

Tabela 11. Bandas de absorção identificadas nos espectros de FTIR da β -lapachona, do PLGA e da gordura de murumuru.

β -lapachona		PLGA		Gordura de murumuru	
Banda (cm ⁻¹)	Vibração molecular	Banda (cm ⁻¹)	Vibração molecular	Banda (cm ⁻¹)	Vibração molecular
3022	Deformação axial em C-H aromático	2931	Deformação axial nos grupos CH, CH ₂ e CH ₃	2848, 2914 e 2902	Deformação axial em CH ₂ e CH ₃
2972 e 2924	Deformação axial assimétrica em C-H das metilas	1747	Deformação axial de C=O	1737	Deformação axial em C=O
1649 e 1693	Deformação axial das carbonilas (C=O)	1419	Deformação angular em O-H no plano	1458	Deformação angular assimétrica em C-H
1604	Deformação axial em C=C-O	1381	Deformação angular simétrica em CH ₃	1375 e 1386	Deformação angular simétrica da ligação C-H de CH ₃
1566	Deformação axial em C=C do anel aromático	1159	Deformação axial em C-O	1107, 1147 e 1195	Deformação axial assimétricas acopladas de R-CO ₂ -R
1093	Deformação axial simétrica em C-O	1134	Deformação axial assimétrica em C-C-O	719	Deformação angular de cadeia
769	Anel aromático com 4H adjacente	1506 e 1228	Deformações nos grupos CH ₃ e CH ₂	-	-

5.9 Análise térmica nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.

A avaliação da perda de massa e decomposição das amostras foi realizada através da análise térmica por termogravimetria (TGA) a fim de identificar os eventos térmicos característicos de cada constituinte das nanocápsulas, observar possíveis eventos consequentes da interação entre os constituintes e confirmar a composição qualitativa das nanocápsulas. As curvas de TGA constam na Figura 31. De acordo com os resultados, as amostras são termicamente estáveis até 233°C (NCMM β -lap), 243°C (PLGA), 283°C (gordura de murumuru) e 200°C (β -lapachona). No termograma de PLGA observa-se perda de massa de 100% em um único estágio a 340°C, como descrito na literatura (Erbetta *et al.*, 2011). Da mesma forma na gordura de murumuru, com apenas um evento de perda de massa a 420°C. A curva de β -lapachona indica perda de massa em uma única etapa a 270°C com perda percentual de massa de 65,2% e processo de decomposição entre 210 e 270°C, dados que corroboram com encontrados na literatura (Freitas Neto *et al.*, 2014). O termograma da nanocápsula (NCMM β -lap) apresentou um perfil térmico misto, com as características dos seus constituintes, havendo perda de massa em três etapas: i) em 270°C à β -lapachona; ii) em 389°C em que se observa um desvio da temperatura de perda da massa da gordura de murumuru, possivelmente devido a interação desta com a matriz polimérica; iii) em 783°C, decomposição total da amostra.

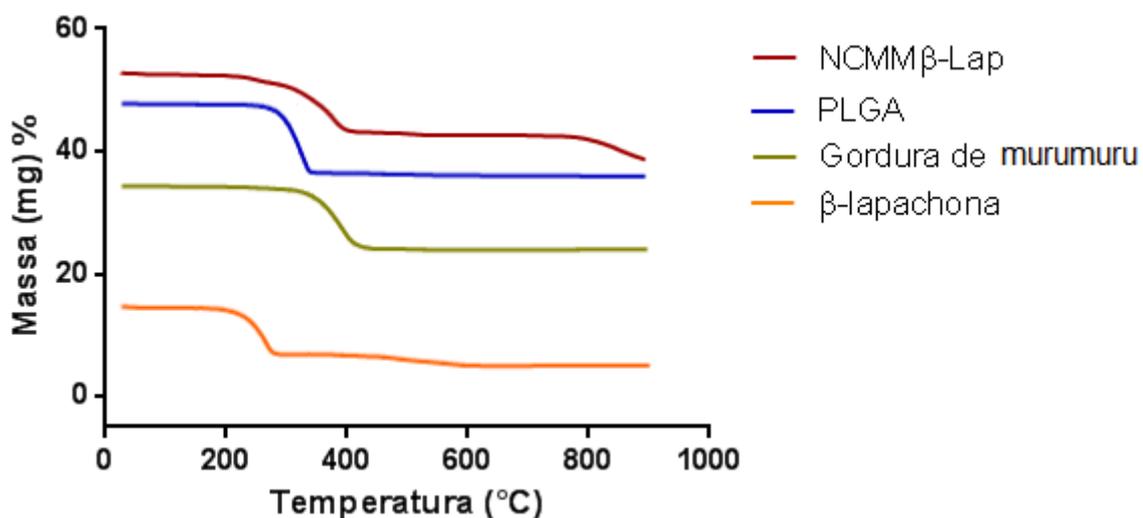


Figura 31. Curvas TGA de nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona (NCMM β -lap) e seus constituintes (PLGA, gordura de murumuru e β -lapachona).

5.10 Identificação de íon molecular da β -lapachona nas nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru.

Nos espectros de massas abaixo (Figura 32A e 32B), obtido por CLUE-ESI-EM no modo positivo, se observa o pico do íon $[M+H]^+$ da β -lapachona em m/z 243 da amostra da β -lapachona sintetizada (circulado na Figura 32A) e em NCM β -lap (circulado na Figura 32B), confirmando o encapsulamento desta na nanocápsula. Os outros picos observados no espectro da β -lap são prováveis adutos, e no espectro de NCM β -lap fragmentos dos outros constituintes de NCM β -lap que não foram investigados.

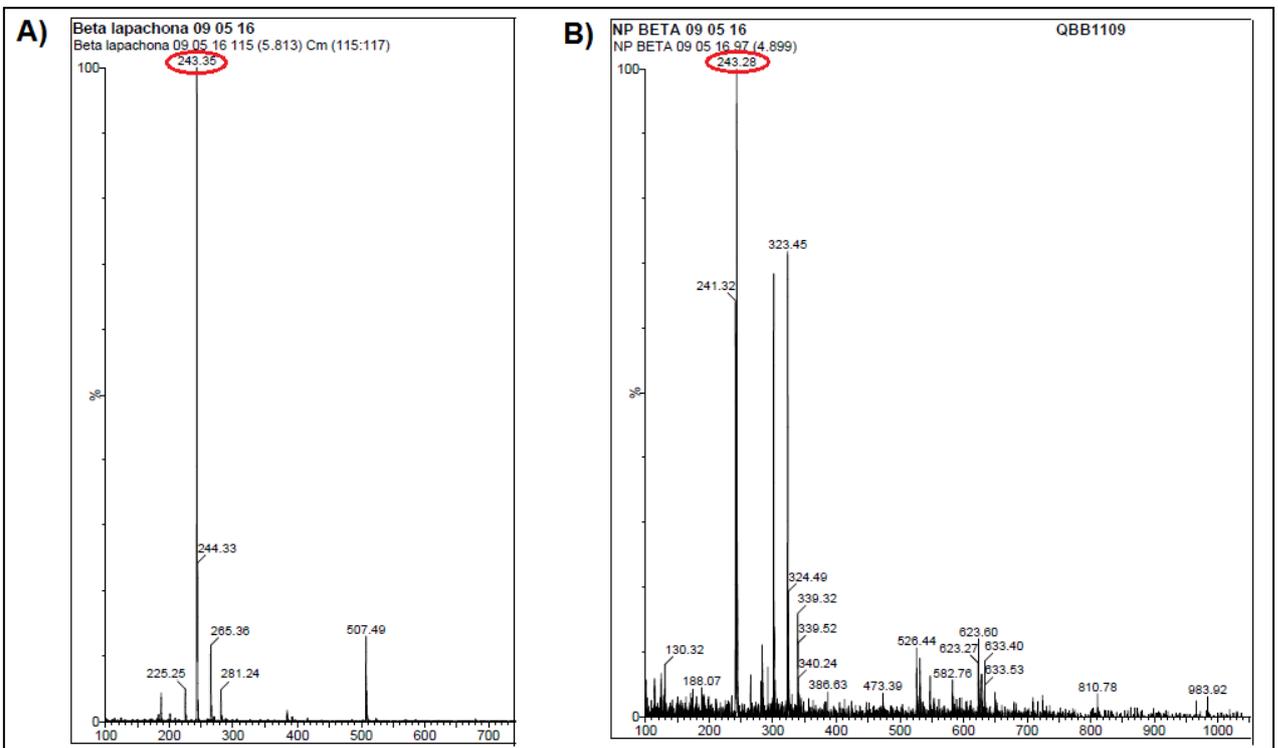


Figura 32. Espectro de Massas da β -lap (A) e da NCM β -lap (B) por CLUE-ESI-EM no modo positivo.

5.11 Avaliação da citotoxicidade das nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru contendo β -lapachona

Com a avaliação da citotoxicidade da NCMM foi possível avaliar a segurança da formulação, observar se os constituintes das nanocápsulas não causavam a morte celular e assim confirmar que a citotoxicidade observada pelas NCMM β -lap era relacionada apenas ao efeito da β -lapachona. Testou-se também o diluente DMSO, utilizado na solução de β -lapachona livre.

Na Figura 33 temos os gráficos da avaliação da citotoxicidade em células não tumoral (NIH/3T3) e tumoral (MCF7) na presença do diluente (DMSO) e de nanocápsulas vazias (NCMM), salientando que foram colocadas as mesmas quantidades destes para que no final tivéssemos as mesmas concentrações de DMSO e NC quando dos testes com a β -lapachona livre (β -lap) e nanocápsulas contendo β -lapachona (NCMM β -lap). Observamos que após 24h de exposição o DMSO e as NCMM não causaram citotoxicidade significativa em todos os volumes testados para as células NIH/3T3 (Figura 33A) e MCF7 (Figura 33B), com alta viabilidade celular (>70%), havendo inclusive aumento da atividade mitocondrial em algumas concentrações. É reportado na literatura que o PLGA é facilmente metabolizado no organismo pelo ciclo de Krebs, por isso possui toxicidade sistêmica mínima (Danhier *et al*, 2012; Kumari *et al*, 2010) o que também é observado em testes em cultura de células (Park, 2014; Chereddy, 2014), indicando sua segurança. Da mesma forma, foi demonstrado por Muller *et al.*, 1996; Scholer *et al.*, 2001 a seguridade do surfactante Poloxamer, além de avaliações que utilizaram PLGA e Poloxamer em nanoformulação nas linhagens celulares C3 (células hepáticas) e MCF7 e não apontaram citotoxicidade (Angelo *et al.*, 2010; Csba *et al.*, 2005). Nanopartículas que continham Epikuron avaliadas por Ampuero *et al*, 2013, não diminuíram a viabilidade celular de células da linhagem NCI-H460 (carcinoma de pulmão). Estes dados corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, além de indicar que a toxicidade observada em NCMM β -lap é relativa à β -lapachona liberada com sucesso da nanocápsula à célula.

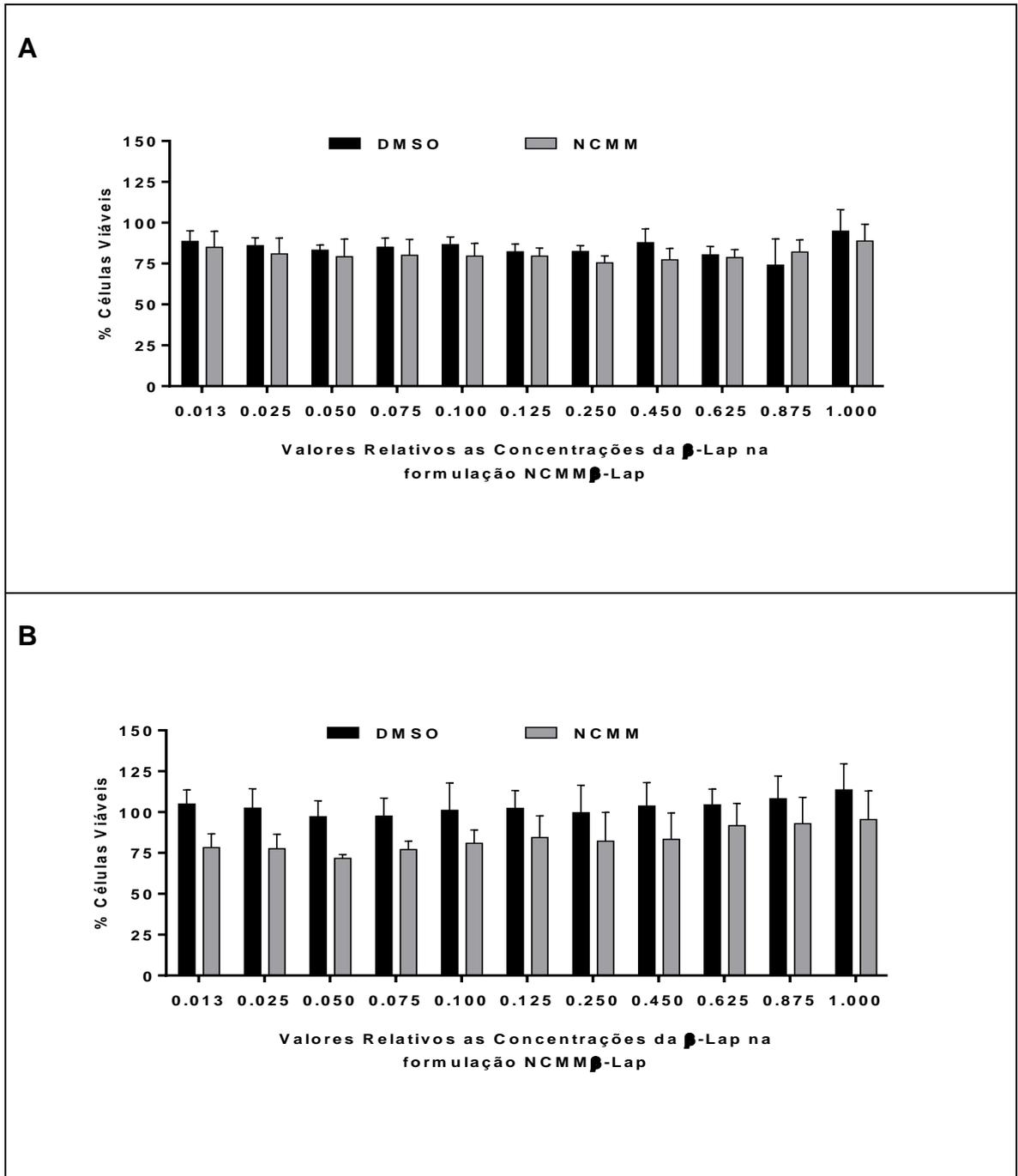


Figura 33. Viabilidade celular em células NIH/3T3 (A) e MCF7 (B) por MTT, após incubação de 24 horas com DMSO e NCMM e DMSO. Os valores do eixo de X são valores relativos às concentrações testadas de nanocápsulas

Com os resultados negativos da não toxicidade do diluente utilizado e da nanopartícula vazia, foi avaliado então a citotoxicidade da β -lapachona livre (β -lap) e encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap) nas duas linhagens celulares, onde podemos perceber um comportamento diferente entre as linhagens celulares testadas a partir do tempo de 48 horas.

Em 24 horas (Figura 34), NCMM β -lap e β -lap apresentaram citotoxicidade com perfis muito semelhantes. As concentrações maiores que 0,589 $\mu\text{g/ml}$ provocaram elevada toxicidade às células não tumorais (NIH/3T3) (Figura 34A) com viabilidade celular entre 8- 2% para ambas as amostras-teste. Dessa forma, na avaliação por 48 e 72 horas foram utilizadas concentrações de 0,06 a 0,589 $\mu\text{g/ml}$.

A incubação das células com as menores concentrações e por tempos superiores a 24 horas, mostrou uma maior sensibilidade pelas células tumorais (MCF7). Nas células NIH/3T3 (Figura 35A) foi observada toxicidade nas concentrações de β -lap livre ou encapsulada superiores a 0,4 $\mu\text{g/ml}$ e após 72 horas de exposição, com viabilidade celular de 20% e 87% na concentração de 0,471 $\mu\text{g/ml}$ de β -lap livre e encapsulada, respectivamente; 12% e 52% na concentração de 0,589 $\mu\text{g/ml}$ de β -lap livre e encapsulada, respectivamente (Figura 35B). Nas células MCF7, a toxicidade foi observada num comportamento dose-dependente nos três tempos avaliados, mas como diferenças entre β -lap livre ou encapsulada apenas após 48 horas (Figura 36A).

Em 48 horas, NCMM β -lap apresentou maior citotoxicidade que β -lap a partir da concentração de 0,12 $\mu\text{g/ml}$, com viabilidade celular de 77% frente a 99% das células incubadas com β -lap; 10% frente a 59% de β -lap na concentração de 0,47 $\mu\text{g/ml}$; e 9% frente a 40% de β -lap na maior concentração (0,589 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 36A).

No ensaio de 72 horas, o perfil de citotoxicidade de ambas amostras-teste foi muito similar, porém com uma intensidade maior devido ao maior tempo de exposição (Figura 36B).

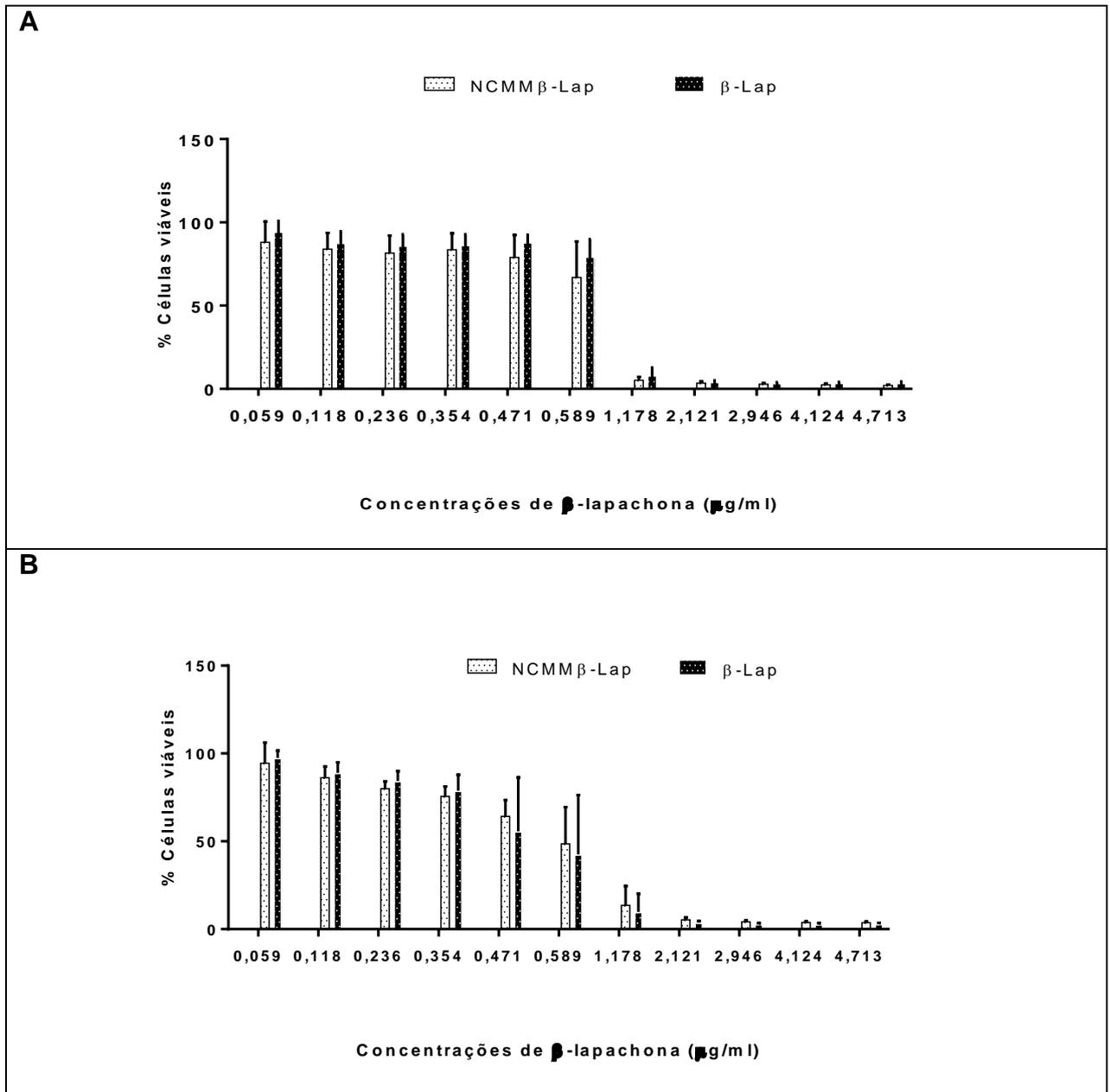


Figura 34. Viabilidade celular em células NIH/3T3 (A) e MCF7 (B) por MTT, após incubação de 24 horas com β -lapachona livre (β -lap) e β -lapachona encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap). Os dados são expressos como porcentagem da média e desvio padrão da triplicata

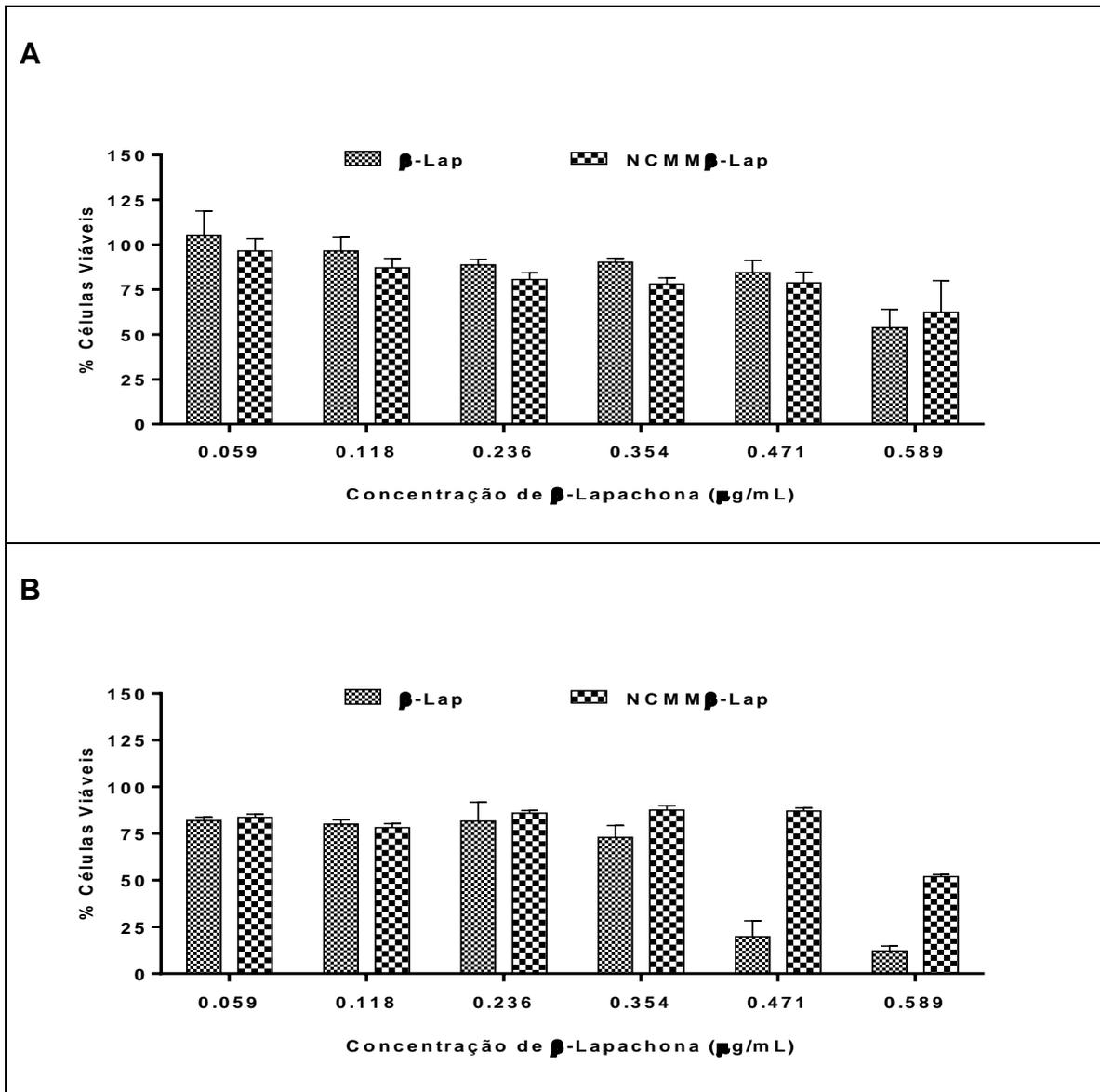


Figura 35. Viabilidade celular em células NIH/3T3 por MTT, após incubação de 48h (A) e 72h (B) com β -lapachona livre (β -lap) e encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap). Os dados são expressos como porcentagem da média e desvio padrão da triplicata de três experimentos independentes; usando como 100% as células incubadas apenas com meio de cultura.

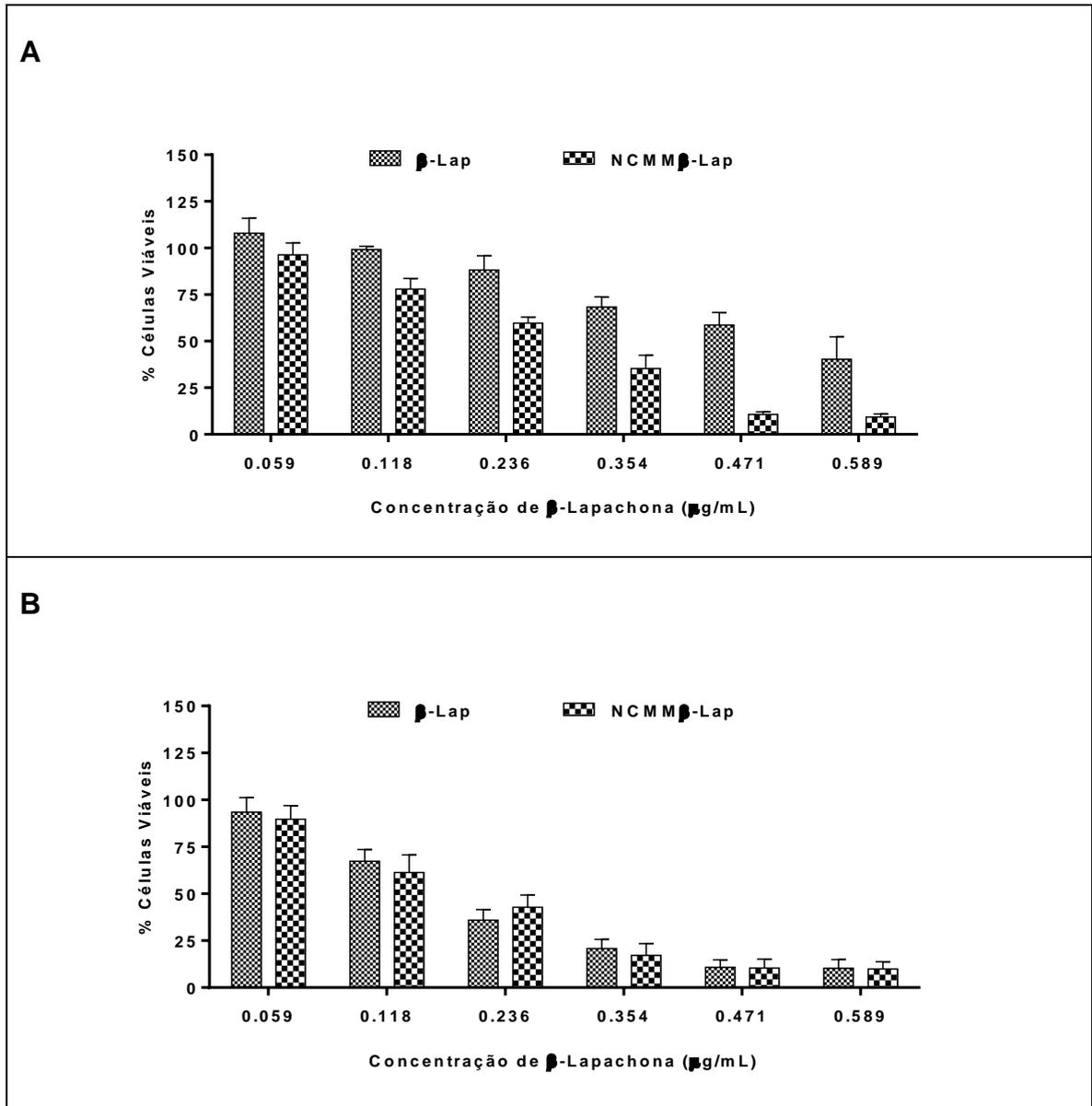


Figura 36. Viabilidade celular em células MCF7 por MTT, após incubação de 48h (A) e 72h (B) com β -lapachona livre (β -lap) e encapsulada em nanocápsula (NCMM β -lap). Os dados são expressos como porcentagem da média e desvio padrão da triplicata de três experimentos independentes; usando como 100% as células incubadas apenas com meio de cultura.

Na Tabela 12 encontram-se os valores de CI_{50} em MCF7 e NIH/3T3 e o índice de seletividade da NCMM β -lap e da β -lapachona nos diferentes tempos de tratamento.

Tabela 12. Valores de CI_{50} e índice de seletividade (IS) de NCMM β -lap e β -lapachona livre nos tempos de 24, 48 e 72 horas nas células MCF7 e NIH/3T3.

Tempo de Incubação (Horas)	NCMM β -lap			β -lapachona		
	CI_{50} MCF7 \pm D.P (µg/ml)	CI_{50} NIH/3T3 \pm D.P (µg/ml)	IS \pm D.P	CI_{50} MCF7 \pm D.P (µg/ml)	CI_{50} NIH/3T3 \pm D.P (µg/ml)	IS \pm D.P
24	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,06	1,4 \pm 0,6
48	0,25 \pm 0,02	1,4 \pm 1,1	6,0 \pm 5,2	0,55 \pm 0,08	0,65 \pm 0,04	1,2 \pm 0,2
72	0,15 \pm 0,01	3,0 \pm 0,05	19,6 \pm 2,1	0,2 \pm 0,03	0,4 \pm 0,03	2,2 \pm 0,2

Os resultados do CI_{50} após incubação com suspensão de NCMM β -lap e da β -lapachona livre, indicam uma citotoxicidade tempo-dependente. O valor de CI_{50} menor de NCMM β -lap frente a β -lapachona no tempo de 48 e 72 horas sugere potencialização do efeito da droga por meio do encapsulamento. Este comportamento é descrito na literatura para outras drogas encapsuladas como docetaxel em nanocápsulas de ácido hialurônico (Ampuero *et al.*, 2013), luteína em nanocápsulas de PLGA-PEG (Arukunmar *et al.*, 2015) e curcumina em nanolipossomas (Hasan *et al.*, 2014). O aumento da citotoxicidade por substâncias encapsuladas pode ser explicado devido às características das nanopartículas poliméricas como o filme polimérico que pela sua propriedade adesiva facilitaria a adesão das partículas na membrana celular (Lemarchand *et al.*, 2006), o tamanho em escala nanométrica (>200 nm) que aumenta a superfície de contato e favorece a endocitose (Chrastina *et al.*, 2011), presença de grupos polares e apolares do PLGA na superfície que facilita a interação com as células, diferente da característica hidrofóbica da β -lapachona livre, proteção de degradação pelo filme polimérico,

aumento da solubilidade da droga por meio do encapsulamento e liberação controlada da β -lapachona pelas nanocápsulas que levam a uma atividade citotóxica por um período de tempo maior (Arunkumar *et al.* 2015).

Na avaliação da seletividade, NCMM β -lap apresentou maior seletividade para as células tumorais que a β -lapachona livre nos tempos de 48 e 72 horas. O índice de seletividade de NCMM β -lap foi seis (em 48 horas) e 19,6 vezes (em 72 horas) maior em MCF7 do que em NIH/3T3 enquanto que β -lapachona livre só apresentou $IS \geq 2$ no tempo de 72 horas. A alta seletividade da nanocápsulas pelas células tumorais (MCF7) pode ser atribuída às características físico-químicas das nanopartículas, morfológicas e fisiológicas desse tipo de célula. A solubilidade e o nanotamanho das nanocápsulas promovem maior captação e acúmulo nas células. Células tumorais têm o metabolismo acelerado comparado a células não tumorais devido à proliferação aumentada e maior necessidade de energia internalizando mais os nutrientes e partículas do meio, além de terem seus mecanismos de reparo danificados expondo-as a efeitos citotóxicos maiores (Faraji e Wipf, 2009; Xu *et al.*, 2015). Este resultado indica maior segurança na aplicação de NCMM β -lap para as células normais do que de β -lapachona livre.

5.12 Análise por citometria de fluxo

Nos ensaios de citotoxicidade utilizando as células NIH/3T3 foi observado a não ou baixa toxicidade das amostras testes (β -lap livre e NCMM β -lap); assim as análises por citometria de fluxo foram realizadas apenas em linhagens tumorais (MCF7 e 4T1), utilizando a concentração de 4,7 μ g/ml de β -lapachona.

Inicialmente foi avaliado se a presença das amostras-teste, descritas no item de materiais e métodos, interferem na distribuição de tamanho e granulosidade das células. Para tanto se utilizou os canais FSC-H (tamanho) e a SSC-H (granulosidade) (Figura 37). As células do grupo controle foram utilizadas como referência para dividir os *Dot plot* em quatro quadrantes. As células MCF7 expostas à β -lapachona tiveram a sua granulosidade (SSC-H) reduzida em 23,5% em

comparação com o controle, e as células 4T1 não mostraram nítida mudança morfológica (redução de 4,1% em SSC-H e 1,6% em FSC-H). Na exposição à NCMM β -lap, também se observou redução da granulosidade, mas em maior proporção, de 49,3% nas células MCF7, e 40,7% nas células 4T1, porém maior em relação à tendência de redução do tamanho das células, com redução de 22% em 4T1 e 2% em MCF7. Alterações morfológicas em células tratadas com β -lapachona são reportadas na literatura tanto em processos de apoptose (Planchon *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2008) como de necrose (Park *et al.*, 2014), as mudanças na morfologia observadas neste estudo são indicativas de dano e morte celular.

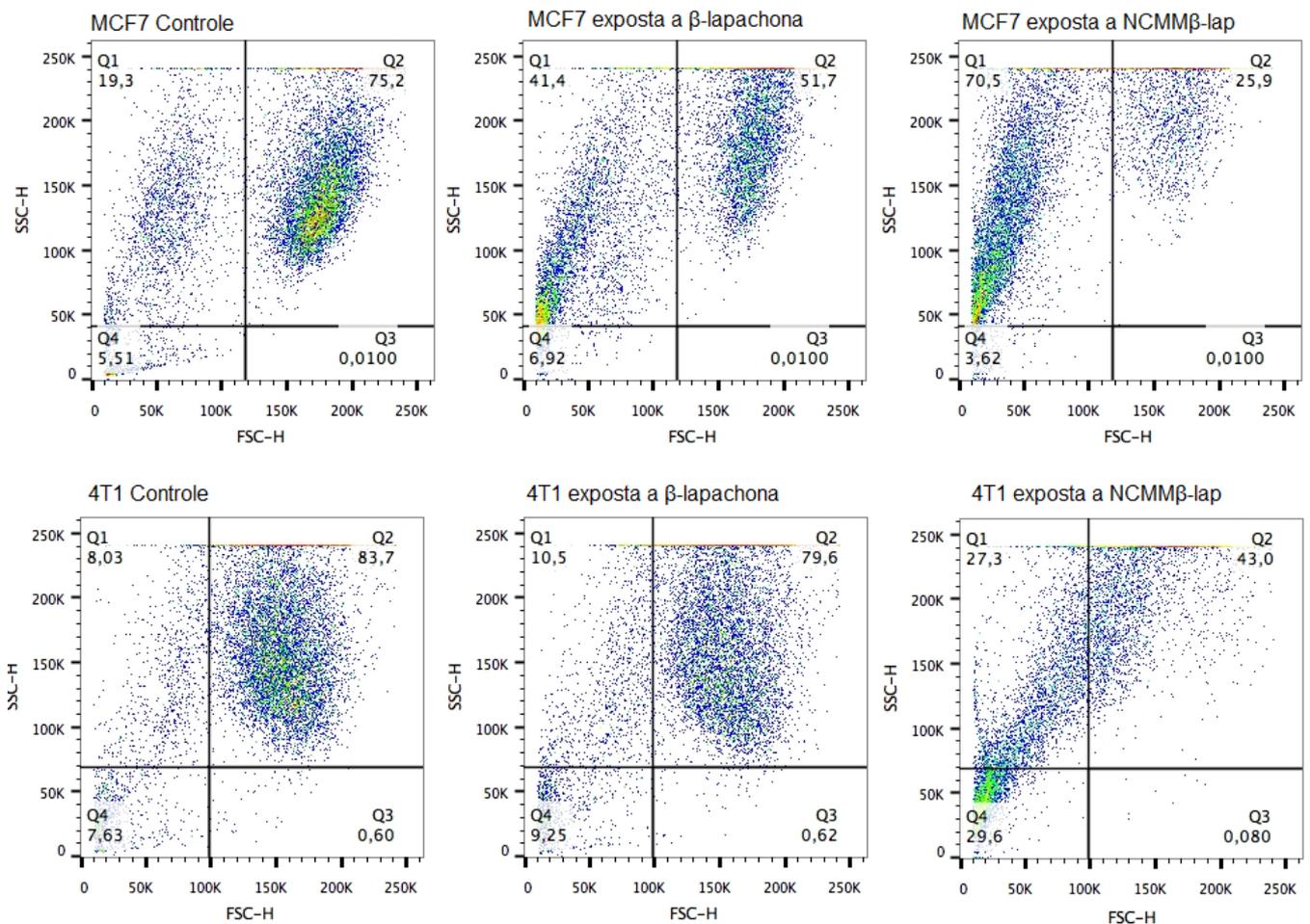


Figura 37. Gráficos em Dot plots FSC x SSC (Tamanho x Granulosidade) em citometria de fluxo de células tumorais MCF7 e 4T1 expostas a β -lapachona livre e NCMM β -lap por 48 horas.

Na avaliação da morte celular utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídio (Figura 38), as células MCF7 (Figura 38A) e 4T1 (Figura 38B) expostas à β -lapachona livre apresentaram 21,5% e 14,7% com dupla marcação para anexina V e iodeto de propídio (AN/IP), respectivamente. Na incubação com NCMM β -lap, 33,4% das células MCF7 apresentaram marcação para ambos indicando apoptose tardia ou necrose, enquanto que em 4T1 a marcação foi predominantemente por IP com 31,9% e apenas 13,8 % de marcação para AN/IP, indicando que em 4T1 a morte celular causada por NCMM β -lap foi através de processos necróticos. Diferenças suaves foram observadas entre as diferentes células, o que pode ser atribuído às características peculiares de cada tipo de célula como metabolismo, mutações genéticas, potencial endocítico, permeabilidade da membrana, mecanismos de resistência a drogas dentre outros (Zanotto-Filho *et al.*, 2013). Além disso, observa-se maior dano causado por NCMM β -lap que por β -lapachona, confirmando a potencialização da atividade anticancerígena da β -lapachona quando encapsulada.

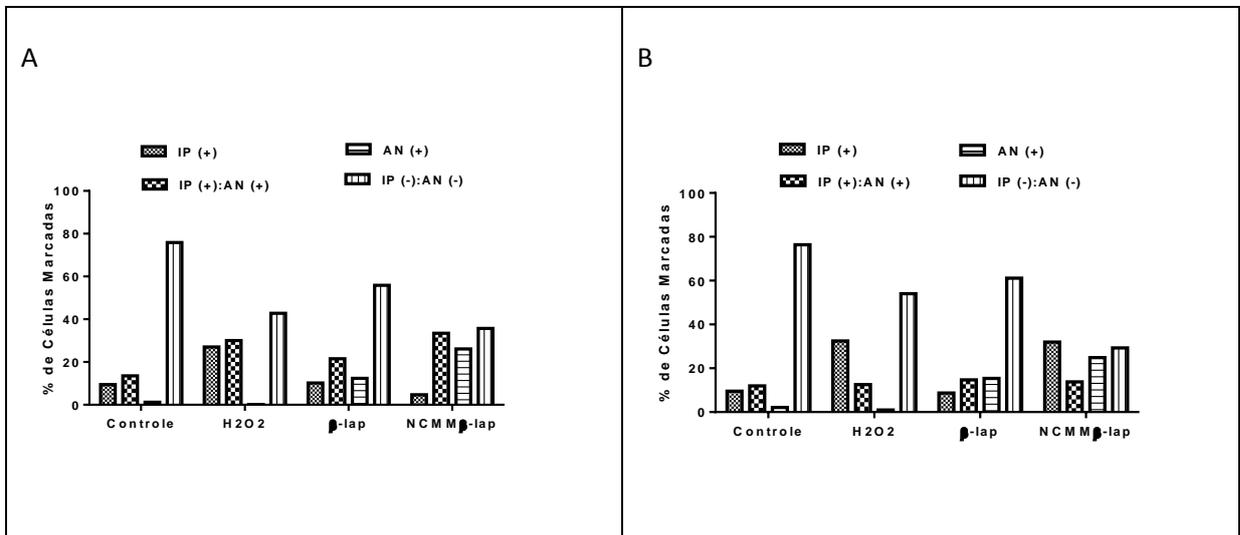


Figura 38. Avaliação do tipo de morte celular em células MCF7 (A) e 4T1 (B) expostas à β -lapachona e NCMM β -lap por 48 horas. Marcação IP (iodeto de propídio), AN (anexina V-FITC).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) promovida pela exposição a β -lapachona seja livre ou encapsulada em nanocápsulas pelas células MCF7 foi superior a 80% quando comparada com o controle. O estresse oxidativo provocado pelas NCMM β -lap foi superior a β -lap na ordem de 20% indicando a capacidade do sistema nanoparticulado em carregar uma maior quantidade de β -lapachona para o interior das células. O estresse oxidativo é o principal mecanismo pelo qual β -lapachona induz morte celular.

A geração de ERO na célula leva ao estresse oxidativo que causa alterações em estruturas celulares, inclusive à mitocôndria, agindo nos lipídeos da membrana mitocondrial, modificando o potencial destas membranas com consequente ruptura e liberação de moléculas apoptóticas além de danificar o DNA mitocondrial (Grivicich *et al.*, 2007). Na avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM), as células 4T1 expostas à β -lapachona apresentaram uma diminuição de 29,5% no PMM enquanto que as expostas à NCMM β -lap redução de 15,3%. Alterações na mitocôndria por β -lapachona são reportadas na literatura associados especialmente ao ciclo redox mediado por NQO1, são observadas vacuolizações e mudanças morfológicas indicando processos autofágicos (Ma *et al.*, 2015). Nas células MCF7 não houve diferença expressiva em comparação ao controle.

A fragmentação do DNA pode ocorrer por ação de radiação, agentes tóxicos ou radicais livres, quando os danos causados não são reparados, mecanismos de morte são desencadeados na célula (Grivicich *et al.*, 2007). Na avaliação da fragmentação do DNA após 48 horas de tratamento é possível observar aumento significativo na proporção de DNA fragmentado em comparação com o controle (Tabela 13) nas células 4T1 tratadas com β -lapachona, com 84,8% de DNA fragmentado, e nas células tratadas com NCMM β -lap com 49,6%. O dano causado no DNA por β -lapachona é reportado na literatura em estudos com diversas células (Shah *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2002), ocorrendo pela produção massiva de radicais livres na célula (Ramos-Pérez *et al.*, 2014), inibição de proteínas reparadoras do DNA como Rad50 e MRE11 (Seoane *et al.* 2013), clivagem e hiperativação de PARP (Poli-ADP ribose-polimerase) (Moon *et al.*, 2010). Não se obteve resultados para células MCF7 por quantidade de células insuficiente para análise no citômetro.

Tabela 13. Fragmentação do DNA em células 4T1 expostas à β -lapachona e NCMM β -lap por 48 horas. A marcação do DNA foi realizada utilizando o iodeto de propídio.

Grupos	% DNA fragmentado	% DNA íntegro
Controle	1,04	99,06
β -lapachona	84,8	15,2
NCMM β -lap	49,6	50,4

O ciclo celular das células MCF7 incubadas com β -lapachona livre e NCMM β -lap por 48 horas mostrou pouca variação comparada com o controle (Tabela 14). Nas células incubadas com β -lapachona houve diminuição de 9,5% do número de células na fase G2M, enquanto que nas células incubadas com as NCMM β -lap ocorreu um aumento de 7,6% no número de células na fase S; todas em comparação com o controle. Em alguns estudos a β -lapachona não afetou o ciclo celular (Seoane *et al.* 2013), enquanto outros houve acúmulo de células na fase G0/G1 (Park *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2010), G1/S, G2M (Li *et al.*, 1999), sugerindo retenção das células nos pontos de checagem e contenção da proliferação celular.

Tabela 14. Ciclo celular em células MCF7 expostas à β -lapachona e NCMM β -lap por 48 horas.

Fases do ciclo celular	Amostras Testes		
	Controle (%)	β -lapachona (%)	NCMM β -lap (%)
SubG1	4,15	7,77	6,07
G1	58,2	68,0	50,0
S	17,7	13,3	25,3
G2M	15,1	5,61	16

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que a síntese da β -lapachona por catalise ácida do lapachol gerou um bom rendimento de 92,3% e as análises por CLAE-DAD (área do pico 100%), e pelos espectros no infravermelho de RMN de ^1H e ^{13}C demonstraram a pureza da amostra. O método de nanoprecipitação produziu nanocápsulas de PLGA com núcleo oleoso de gordura de murumuru estáveis por 60 dias com população monodispersa (PDI <0,2), tamanho entre $132,5 \pm 2,0$ e $149 \pm 1,3$, morfologia esférica, porém a presença do surfactante na formulação mascarou a carga de superfície das nanopartículas. As NCMM β -lap preparadas foram viáveis para carreamento da β -lapachona com alta capacidade de encapsulamento (EE=94,3%). O encapsulamento da β -lapachona potencializou o efeito citotóxico desta droga e aumentou a seletividade para células tumorais, indicando maior segurança na utilização de NCMM β -lap. Há grande similaridade nos eventos citotóxicos causados por β -lapachona livre e NCMM β -lap, apontando que a formulação não interfere no mecanismo de ação β -lapachona. As NCMM β -lap apresentaram-se como uma alternativa possível para carreamento e entrega intracelular da β -lapachona com potencial aplicação na nanomedicina.

7 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; SAHOO, K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 170–183, 2011.
- AGNIHOTRI, S. M.; VAVIA, P. R. Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. **Nanomedicine**, v. 5, p. 90–95, 2009.
- AIRES, A.; XIMENES, E.; BARBOSA, V.; GÓES, A.; SOUZA, V.; ALBUQUERQUE, M. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21 (3), p. 261-267, 2014.
- ALMEIDA, E. R. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 42–47, 2009.
- ALSHAMSAN, A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22(3), p. 219–222, 2014.
- ALTMAN, R. F. A. **A exploração industrial de sementes oleaginosas amazônicas**. Rio de Janeiro: TNPA, 1958. 24p. (INPA. Publicação, 04).
- ALVES, G. M. C.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J.; LEITE, A. C. L.; BRONDANI, D. J.; MEDEIROS, F. P. M.; BIEBER, L. W. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em PDF. **Química Nova**, v. 31(2), p. 413–416, 2008.
- AMOL, K.; PRATIBA, P. Novel drug delivery system in herbal's. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4(4), p. 910-930, 2014.
- AMPUERO, F.A.O; RIVERA-RODRIGUEZ, G. R.; ALONSO, M. J.; TORRES, D. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49(4), p. 483–490, 2013.
- ANKRUM, J.A; MIRANDA; O.R. M.; KELVIN, S. N.; SAHAR, D.; XU, C.; KARP, J.M. Engineering cells with intracellular agent-loaded microparticles to control cell phenotype. **Nature Protocols**, v. 9(2), p. 233–245, 2014.
- ANTUNES, R. Concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(4), p. 517–524, 2006.
- ARUNKUMAR, R.; PRASHANTH, K. V. H.; MANABE, Y.; HIRATA, T.; SUGAWARA, T.; DHARMESH, S. M.; BASKARAN, V. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanocapsules: An efficient carrier for improved solubility, bioavailability, and anticancer property of lutein. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104(6), p. 2085–2093, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para realização do exercício de comparabilidade para registro de produtos biológicos**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia+para+Realiza%C3%A7%C3%A3o+do+Exerc%C3%ADcio+de+Comparabilidade+para+Registro+de+Produtos+Biol%C3%B3gicos/af64c771-df3e-42a4-88ae-ba60c07d2113>. Acesso em agosto de 2016.

BAI, C. e LIU, M. From Chemistry to Nanoscience: Not Just a Matter of Size. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52(10), p. 2678–2683, 2013.

BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H. S.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19(4), p. 461–73, 2009.

BAZILE, D. V.; ROPERT, C.; HUVE, P.; VERRECCHIA, T.; MARLARD, M.; FRYDMAN, A.; VEILLARD, M.; SPENLEHAUER, G. Body distribution of fully biodegradable [14C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. **Biomaterials**, v. 13, p. 1093–1102, 1992.

BENTLE, M. S.; REINICKE, K. E.; DONG, Y.; BEY, E. A.; BOOTHMAN, D. A. Nonhomologous end joining is essential for cellular resistance to the novel antitumor agent, β -lapachone. **Cancer Research**, v. 67(14), p. 6936–6945, 2007.

BEZERRA, V. S. **Aspectos do estado da arte, da produção e pesquisa com a palmeira murumuru (Astrocarium murumuru Mart)**. CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5.; CLÍNICA TECNOLÓGICA EM BIODIESEL, 2. 2008, Lavras. **Biodiesel: tecnologia limpa: anais completos**. Lavras: UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

BIERMANN, U.; BORNSCHEUER, U.; MEIER, M. A. R.; METZGER, J. O.; SCHAEFER, H. J. Oils and fats as renewable raw materials in chemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50(17), p. 3854–3871, 2011.

BLANCO, E.; BEY, E. A.; KHEMTONG, C.; YANG, S. G.; SETTI-GUTHI, J.; CHEN, H.; GAO, J. β -Lapachone Micellar Nanotherapeutics for Non-Small Cell Lung Cancer Therapy. **Cancer Research**, v. 70(10), p. 3896–3904, 2010

BONIFAZI, E. L.; RÍOS-LUCI, C.; LEÓN, L. G.; BURTON, G.; PADRÓN, J. M. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 2621-2630, 2010.

BREITBACH, U. B.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P.; FARIA, J. E. Q.; BRANDÃO, M. G. L. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147(1), p. 180–189, 2013.

BRUSCHI, M. **Formulações tópicas contendo nanocápsulas de Adapaleno: Avaliação da estabilidade e permeação cutânea**. 2010. 84 f. Dissertação

(Mestrado em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano de Santa Maria - Rio Grande do Sul, Santa Maria, 2010.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S.J.; WINEY, K.I. Production of haloperidol-loaded PLGA nano-particles for extended controlled drug release of haloperidol. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, p. 773–785, 2005.

CARRENO, F.; PAESE, K.; SILVA, C. M.; GUTERRES, S. S.; COSTA, T. D. Pre-clinical investigation of the modulation of quetiapine plasma pharmacokinetics and tissues biodistribution by lipid-core nanocapsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p. 152–158, 2016.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; DOS SANTOS, J. C.; DE AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27(1), p. 146–156, 2004.

CAVALCANTE, F. A.; SILVA, J. L. V.; CARVALHO, V. M. N.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; PINTO, Â. C.; VARGAS, M. D.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, α and β -lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 183–189, 2008.

CAVALCANTI, I. M. F.; PONTES-NETO, J. G.; KOCERGINSKY, P. O.; BEZERRA-NETO, A. M.; LIMA, J. L. C.; LIRA-NOGUEIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antimicrobial activity of β -lapachone encapsulated into liposomes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3(2), p. 103–108, 2015.

CHEREDDY, K. K.; HER, C.-H.; COMUNE, M.; MOIA, C.; LOPES, A.; PORPORATO, P. E.; PRÉAT, V. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. **Journal of Controlled Release**, v. 194, p. 138–147, 2014.

CHIN, S. F.; PANG, S. C.; TAY, S. H. Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. **Carbohydrate Polymers**, v. 86(4), p. 1817–1819, 2011.

CHOI, E. K.; TERAJ, K.; JI, I.-M.; KOOK, Y. H.; PARK, K. H.; OH, E. T.; PARK, H. J. Upregulation of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase by radiation potentiates the effect of bio-reductive β -lapachone on cancer cells. **Neoplasia**, v. 9(8), p. 634–642, 2007.

CHRISTINA, A.; MASSEY, K. A.; SCHNITZER, J. E. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 3(4), p. 421–437, 2011.

CLAESSENS, S.; HABONIMANA, P.; DE KIMPE, N. Synthesis of naturally occurring naphthoquinone epoxides and application in the synthesis of β -lapachone. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8(16), p. 3790, 2010.

CLEMENT, C. R.; LLERAS, P. E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 9(1-2), p. 67-71, 2005.

CORADINI, K.; LIMA, F. O.; OLIVEIRA, C. M., *et al.* Co-encapsulation of reveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their *in vitro* antioxidant effects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 178–185, 2014.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems**, v. 19(2), p. 99, 2002.

CSABA, N.; CAAMAÑO, P.; SÁNCHEZ, A.; DOMÍNGUEZ, F.; ALONSO, M. J. PLGA: Poloxamer and PLGA:Poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery. **Biomacromolecules**, v. 6 (1), p. 271–278, 2005.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; ALVES, C. F.; ALVES, G. M. C., *et al.* Beta-lapachona: desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa terapêutica antineoplásica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86(1), p. 39-43, 2005.

CUNHA-FILHO, M. S. S. **Beta-lapachona: Estudios de preformulacion y aproximaciones tecnológicas para su formulacion**. 2007. Tese (Doutorado em Farmácia e Tecnologia Farmacêutica). Universidade de Santiago de Compostela - Espanha, Santiago de Compostela, 2007.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral beta-lapachone by solvent change precipitation of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik**, v. 69(3), p. 871–7, 2008.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; DACUNHA-MARINHO, B.; TORRES-LABANDEIRA, J. J.; MARTINEZ-PACHECO, R.; LANDIN, M. Characterization of β -lapachone and methylated α -cyclodextrin solid-state systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 8(3), p. 68–77, 2007.

DAELEMANS, D.; VANDAMME, A. M.; DE CLERCQ, E. Human immunodeficiency virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 10(1), p. 1–14, 1999.

D'ANNEO, A.; AUGELLO, G.; SANTULLI, A.; GIULIANO, M.; DI FIORE, R.; MESSINA, C.; VENTO, R. Paclitaxel and beta-lapachone synergistically induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by downregulating the levels of phospho-Akt. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222(2), p. 433–443, 2010.

D'ANGELO, I.; GARCIA-FUENTES, M.; PARAJÓ, Y.; WELLE, A.; VÁNTUS, T.; HORVÁTH, A.; ... ALONSO, M. J. Nanoparticles based on PLGA: poloxamer blends

for the delivery of proangiogenic growth factors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7(5), p. 1724–33, 2010.

DANHIER, F.; ANSORENA, E.; SILVA, J. M.; COCO, R.; LE BRETON, A.; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161(2), p. 505–522, 2012.

DELARMELINA, M.; FERREIRA, G. B.; FERREIRA, V. F.; DE M. CARNEIRO, J. W. Vibrational spectroscopy of lapachol, α - and β -lapachone: Theoretical and experimental elucidation of the Raman and infrared spectra. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 311–323, 2016.

DIAS, D. J. S. **Síntese, caracterização físico-química, morfológica e avaliação de viabilidade de células tumorais de mama (MCF-7) submetidas à nanoesferas de PLGA contendo clorambucil**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília-Distrito Federal, Brasília, 2012.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R. P. A.; ESQUIVEL, D. M. S. β -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by Sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 28(6), p. 723–728, 1979.

DROZDEK, S., e BAZYLINSKA, U. Biocompatible oil core nanocapsules as potential co-carriers of paclitaxel and fluorescent markers: preparation, characterization, and bioimaging. **Colloid and Polymer Science**, v. 294(1), p. 225–237, 2016.

ERBETTA, C. D. C.; VIEGAS, C. C. B.; FREITAS, R. F. S.; SOUSA, R. G. Síntese e caracterização térmica e química do copolímero poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo). **Polímeros**, v. 21(5), p. 376–382, 2011.

EYONG, K. O.; KUMAR, P. O. S.; KUETE, V.; FOLEFOG, G. N.; NKENGFACK, E. A.; BASKARAN, S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5387-5390, 2008.

FARAJI, A. H., e WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17(8), p. 2950–2962, 2009.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. D. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2(2), p. 140–160, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 25–28, 1989.

FLICK, H. E.; LALONDE, J. M.; MALACHOWSKI, W. P.; MULLER, A. J. The tumor-selective cytotoxic agent β -lapachone is a potent inhibitor of IDO1. **International Journal of Tryptophan Research: IJTR**, v. 6, p. 35–45, 2013.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em agosto de 2016

FRANKE, I. D. **Principais usos e serviços de árvores e arbustos promissores que ocorrem em pastagens no estado do Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 1999. 6 p. (Embrapa Acre. Comunicado técnico, 106).

FREITAS NETO, J. L. D.; PRESMICH, G. M. A.; ROLIM, L. A.; ALVES, L. D. S.; DE ALBUQUERQUE, M. M.; NETO, P. J. R. N. Caracterização físico-química do potencial agente antineoplásico β -lapachona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33(4), p. 545–553, 2012.

GANG, G. T.; KIM, Y. H.; NOH, J. R.; KIM, K. S.; JUNG, J. Y.; SHONG, M.; LEE, C. H. Protective role of NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 221(3), p. 165–175, 2013.

GOTO, P. L. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por polimerização *in situ* a partir de nano-emulsões produzidas por inversão de fases**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Ouro Preto- Minas Gerais, Ouro Preto, 2011.

GRAF, R.; COUVREUR, P.; BARRAT, G.; MYSIAKINE, E. Surface-engineered nanoparticles for ligand coupling. **Biomaterials**, v. 24, p. 4529-4537, 2003.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; SCHETINI, D. A.; ROCHA, O. G. F. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, p. 511-518, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53(3), p. 335–343, 2007.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SEIGLE-MURANDI, F.; SIMEON DE BUOCHBERG, M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -Lapachone. **Planta Médica**, v. 60, p. 373-374, 1994.

GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; ... ANDERSON, K. C. Overcomes Drug Resistance in Human Multiple Myeloma Cells. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 711–720, 2002.

HARTNER, L.P.; ROSEN, L.; HENSLEY, M.; MENDELSON, D.; STADDON, A.P.; CHOW, W., *et al.* Phase 2 dose multi-center, open-label study of ARQ501, a checkpoint activator, in adult patients with persistent, recurrent or metastatic leiomyosarcoma (LMS). PROCEEDINGS OF 2007 ASCO ANNUAL MEETING, 2007, Chicago/USA, p. 20521.

HASAN, M.; BELHAJ, N.; BENACHOUR, H.; BARBERI-HEYOB, M.; KAHN, C. J. F.; JABBARI, E.; ARAB-TEHRANY, E. Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461(1-2), p. 519–528, 2014.

HOOKER, S.C. Lomatiol. Part II. Its occurrence, constitution, relation to and conversion into lapachol. Also, a synthesis of lapachol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, p. 1181, 1936.

JEONG, S. Y.; PARK, S. J.; YOON, S. M.; JUNG, J.; WOO, H. N.; YI, S. L.; CHOI, E. K. Systemic delivery and preclinical evaluation of Au nanoparticle containing β -lapachone for radiosensitization. **Journal of Controlled Release**, v. 139(3), p. 239–245, 2009.

KEMP, E.; BARROS, H. L.; DOS ANJOS, J.; MURRIELLO, M. K. S. Nanociência e Nanotecnologia. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 24–31, 2005.

KHALIL, N. M.; NASCIMENTO, T. C. F. DO; CASA, D. M.; DALMOLIN, L. F.; MATTOS, A. C. DE; HOSS, I.; ... MAINARDES, R. M. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 353–360, 2013.

KHONG, H.T.; L. DREISBACH, H.L.; KINDLER, D.F.; TRENT, K.G.; JEZIORSKI, I.; BONDERENKO, *et al.* A phase 2 study of ARQ 501 in combination with gemcitabine in adult patients with treatment naive, unresectable pancreatic adenocarcinoma. PROCEEDINGS OF 2007 ASCO ANNUAL MEETING, 2007, Chicago/ USA, p. 15017.

KHOSLA C.; KEASLING, J.D. Metabolic engineering for drug discovery and development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2(12), p.1019-1025, 2003.

KIM, S. O.; KWON, J. I.; JEONG, Y. K.; KIM, G. Y.; KIM, N. D.; CHOI, Y. H. Induction of Egr-1 Is Associated with Anti-Metastatic and Anti-Invasive Ability of β -Lapachone in Human Hepatocarcinoma Cells. **Bioscience. Biotechnology. Biochemistry**, v. 71(9), p. 2169–2176, 2007.

KIM, T. W.; KIM, Y. J.; KIM, H. T.; PARK, S. R.; JUNG, J. Y. β -Lapachone enhances Mre11-Rad50-Nbs1 complex expression in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Pharmacological Reports**, v. 68(1), p. 27–31, 2016.

KRISHNAN, P.; E BASTOW, K. F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60(9), p. 1367–79, 2000.

KÜLKAMP, I.C.; RABELO, B.D.; BERLITZ, S.J.; ISOPPO, M.; BIANCHIN, M.D.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoencapsulation improves the in vitro antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.7, p. 598–607, 2011.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1–18, 2010.

KUMI-DIAKA, J.; SADDLER-SHAWNETTE, S.; ALLER, A.; BROWN, J. Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma

cells: Therapeutic synergy in genistein and beta-lapachone combination treatment. **Cancer Cell International**, v. 4(1), p. 5-14, 2004.

KUNG, H.; CHUNG-LIANG, C.; GAR-YANG, C.; MING-JAW, D.; KUO-SHYAN, L.; YAT-PANG, C. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of beta-lapachone on endothelial cells in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211(2), p. 522-532, 2007.

KUNG, H. N.; YANG, M. J.; CHANG, C. F.; CHAU, Y. P.; LU, K. S. *In vitro* and *in vivo* wound healing-promoting activities of β -lapachone. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, p. C931-C943, 2008.

LAMBERTI, M. J.; RUMIE VITTAR, N. B.; DE CARVALHO DA SILVA, F.; FERREIRA, V. F.; RIVAROLA, V. A. Synergistic enhancement of antitumor effect of β -Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). **Phytomedicine**, v. 20(11), p. 1007–1012, 2013.

LEBOUILLE, J. G. J. L.; STEPANYAN, R.; SLOT, J. J. M.; COHEN STUART, M. A.; TUINIER, R. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, p. 225–235, 2014.

LECAROZ, M.C.; BLANCO-PRIETO, M.J.; CAMPANERO, M.A.; SALMAN, H.; GAMAZO, C. Poly(D,L-lactide-coglycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella melitensis*-infected mice. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 1185–1190, 2007.

LEE, S.; KIM, I. S.; KWAK, T. H.; YOO, H. H. Comparative metabolism study of β -lapachone in mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 286–92, 2013.

LEE, H.; PARK, M.T.; CHOI, B.H.; OH, E.T.; SONG, M.J.; LEE, J.; PARK, H. J. Endoplasmic reticulum stress-induced JNK activation is a critical event leading to mitochondria-mediated cell death caused by β -lapachone treatment. **PloS One**, v. 6(6), e. 21533, 2011.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; PASSIRANI, C.; GARCION, E.; PETRI, B.; MULLER, R. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nano- particles with biological systems. **Biomaterials**, v. 27, p. 108-18, 2006.

LEPELTIER, E.; BOURGAUX, C.; COUVREUR, P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 71, p. 86–97, 2014.

LI, C. J.; ZHANG, L. J.; DEZUBE, B. J.; CRUMPACKER, C. S.; PARDEE, A. B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 90, p. 1839-1842, 1993.

LI, C. J.; ZHANG, L. J.; DEZUBE, B. J.; CRUMPACKER, C. S.; PARDEE, A.B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90(5), p. 1839–42, 1993.

WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 47(9), p. 1101-1109, 1999.

LI, Y. Z.; LI, C. J.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by β -lapachone in human carcinoma cells. **Molecular Medicine**, v. 5, p. 232-239, 1999.

Li, C. J.; Li, Y. Z.; Pinto, A.V.;Pardee, A. B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96(23), p.13369–74, 1999.

LOPES, J. P. N.; CORREA, N. C. F.; FRANÇA, L. F. **Transesterificação do óleo de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para a produção de biodiesel**. Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel, Brasília, DF. Anais MCT/ABIPTI, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. V. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, p.320, 1995.

MA, X. HUANG, X.; MOORE, Z.; HUANG, G.; KILGORE, J. A.; WANG, Y.,GAO, J. Esterase-activatable β -lapachone prodrug micelles for NQO1-targeted lung cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 201–211, 2015.

MACEDO, L.; FERNANDES, T.; SILVEIRA, L.; MESQUITA, A.; FRANCHITTI, A.A.; XIMENES, E.A. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21(1), p. 25–29, 2013.

MAMBRIM, M.C.T.; BARRERA-ARELLANO, D. Caracterización de aceites de frutos de palmeras de la región amazónica del Brasil. **Grasas y aceites**, v.48, n.3, p.154-158, 1997.

MAKADIA H. S.; E SIEGEL S. P. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **NIH Public Access. Polymers**, v. 3(3), p. 1–19, 2011.

MEDEIROS, C.S.; PONTES-FILHO, N.T.; CAMARA, C.A.; LIMA-FILHO, J.V.; OLIVEIRA, P.C.; LEMOS, S.A.; LEAL, A.F.G.; BRANDÃO, J.O.C.; NEVES, R.P. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43(4), p. 345-349, 2010.

MIAO, X.; SONG, P.; SAVAGE, R. E.; ZHONG, C.; YANG, R.; KIZER, D.; CHAN, T. C. K. Identification of the in vitro metabolites of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501; beta-lapachone) in whole blood. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 36(4), p. 641–648, 2008.

MITTAL, G.; SAHANA, D. K.; BHARDWAJ, V.; RAVI, K. M. N. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 77–85, 2007.

MOON, D. O.; KANG, C. H.; KIM, M. O.; JEON, Y. J.; LEE, J. D.; CHOI, Y. H.; KIM, G. Y. Beta-lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 481-8, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; GARRIGUES, O.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik**, v. 80(1), p. 235–9, 2012.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmacy**, v. 385, p. 113–142, 2010.

MORENO, D. S.; ZALBA, I.; NAVARRO, C.; TROS DE ILARDUYA, M. J. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p. 265–274, 2010.

MORENO, E.; SCHWARTZ, J.; LARREA, E.; CONDE, I.; FONT, M.; SANMARTÍN, C.; ESPUELAS, S. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in L. major infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11(8), p.1993–2002, 2015.

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

MULLER, R. H.; MAABEN, S.; WEYHERS, H.; MEHNERT, W. Phagocytic Uptake and Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Sterically Stabilized with Poloxamine 908 and Poloxamer 407. **Journal of Drug Targeting**, v. 4(3), p. 161–170, 1996.

MUNDARGI, R.C.; BABU, V.R.; RANGASWAMY, V.; PATEL, P.; AMINABHAVI, T.M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, p. 193–209, 2008.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BOMMANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1626-1633, 2003.

O'NEIL, M.J. Lapachol. **The Merck Index**, ed. 12, n. 5376:917, 1996.

OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E. A.; GAO, J.; RITCHIE, J. M.; BORNMANN, W.; BOOTHMAN, D. A.; OBERLEY, L. W.; CULLE, N. J. J. Efficacy of β -lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biotherapy**, v. 4, p. 95-102, 2005.

PALUDO, C. R. **Biotransformação da β -lapachona utilizando culturas microbianas: uma alternativa para estudos de metabolismo *in vitro***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo-São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

PANAGI Z.; BELETSI A.; EVANGELATOS G.; LIVANIOU E.; ITHAKISSIOS D.S.; AVGOUSTAKIS K. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. **International Journal Pharmaceutics**, v. 221, p. 143–152, 2001.

PANDEY, S. K.; PATEL, D. K.; THAKUR, R.; MISHRA, D. P.; MAITI, P.; HALDAR, C. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75(0), p. 521–529, 2015.

PARDEE, A. B; LI, Y. Z.; LI, C. J. Cancer therapy with β -lapachone. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, p. 227-242, 2002

PARK, H. J. Heat-induced up-regulation of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase potentiates anticancer effects of β -lapachone. **Clinical Cancer Research**, v. 11(24), p. 8866–8871, 2005.

PARK, E. J.; CHOI, K. S.; KWON, T. K. β -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189(1-2), p. 37–44, 2011.

PARK, E. J.; MIN, K.J.; LEE, T.J.; YOO, Y. H.; KIM, Y.S.; KWON, T. K. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. **Cell Death & Disease**, v. 5(5), e1230, 2014.

PARK, H. J.; YANG, J.; LEE, S.; HAAM, I. H.; CHOI, K. H. Y. Multifunctional nanoparticles for combined Doxorubicin and photothermal treatments. **ACS Nano**, v. 3, p. 2919–2926, 2009.

PARK, M.J.; BALAKRISHNAN, P.; YANG, S. G. Polymeric nanocapsules with SEDDS oil-core for the controlled and enhanced oral absorption of cyclosporine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441(1-2), p. 757–764, 2013.

PATIL, S. D. F.; PAPADMITRAKOPOULOS, D. J. B. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. **Journal of Controlled Release**, v. 117, p. 68–79, 2007.

PÉREZ-SACAU, E.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; GUTIÉRREZ, Y.D.; GIMÉNEZ, T.A. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, p. 264–274, 2005.

PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M. E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D. A. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -Lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275(8), p. 5416–5424, 2000.

PLANCHON, S. M.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W. G.; VARNES, M. E.; BOOTHMAN, D. A. Beta-lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, v. 267(1), p. 95–106, 2001.

PLANCHON, S. M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D. T.; HUTSON, P.; CHURCH, D. R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D. A. β -lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia9 (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. **Cancer Research**, v. 55, p. 3706-3711, 1995.

POLYSCITECH TECHNICAL BLOG 17 DE MAIO DE 2016. Produzido por Polyscitech. **PLGA in FDA approved products**. Disponível em: <http://lgakinainc.blogspot.com.br/2016/05/plga-in-fda-approved-products.html> Acesso em agosto de 2016.

PUBCHEM. **Beta-lapachone Patents**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Lapachone#section=Patents> Acesso em junho de 2016.

QUEIROZ, A. L.; BEZERRA, V. S.; MOCHIUTTI, S. A palmeira murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) no estuário do rio Amazonas no estado do Amapá. CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5.; CLÍNICA TECNOLÓGICA EM BIODIESEL, 2. 2008, Lavras. **Biodiesel: tecnologia limpa: anais completos**. Lavras: UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

RAMOS-PÉREZ, C.; LORENZO-CASTRILLEJO, I.; QUEVEDO, O.; GARCÍA-LUIS, J.; MATOS-PERDOMO, E.; MEDINA-COELLO, C.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; MACHÍN, F. Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent β -lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. **Biochemical Pharmacology**, v. 92(2), p. 206–219, 2014.

RANGANATHAN, R.; MADANMOHAN, S.; KESAVAN, A.; BASKAR, G.; KRISHNAMOORTHY, Y.R.; SANTOSHAM, R.; PONRAJU, D.; RAYALA, S.K.; VENKATRAMAN, G. Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications, **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1043–1060, 2012.

REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMANN, W. G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Development of β -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 levels. **Cancer Therapy: Preclinical**, v. 11, p. 3055-3064, 2005.

RIEGER, A. M.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal of Visualized Experiments**, v. 50, p. e2597, 2011.

RÍOS-LUCI, C.; BONIFAZI, E. L.; LEÓN, L. G.; MONTERO, J. C.; BURTON, G.; PANDIELLA, A.; PADRÓN, J. M. β -Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 264–74, 2012.

ROCHA, C. B. R.; POTIGUARA, R. C. V. Morfometria das fibras das folhas de *Astrocaryum murumuru* var. murumuru Mart. (Arecaceae). **Acta Amazônica**, v.37, n.4, p.511-516. 2007.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1112-20, 2003.

SALAS, C.; TAPIA, R. A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYAB, J. D.; MORELLO, A. Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and a- and b-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 668–674, 2008.

SANNA, V.; SIDDIQUI, I. A.; SECHI, M.; MUKHTAR, H. Nanoformulation of natural products for prevention and therapy of prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 334(1), p. 142–51, 2013.

SANTOS, P.P.; OLIVEIRA, A; PEREIRA, P.; HICKMANN, S. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, p. 23–33, 2016.

SANTOS, F.G. **Preparação de micro/nanopartículas de Poliuretano biodegradável carreadoras de óleo de açaí e α – tocoferol**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais)- Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SARAIVA, S. A.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. Amazonian vegetable oils and fats: Fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57(10), p. 4030–4034, 2009.

SASAKI, K.; IGARASHI, M.; HINATA, M.; KOMORI, Y.; FUKUSHIMA, K. Simulation of Drug Release from PLGA Particles In Vivo. **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, id 513950, 2013.

SAVAGE, R. E.; TYLER, A. N.; MIAO, X. S.; CHAN, T. C. K. Identification of a novel glucosylsulfate conjugate as a metabolite of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501, β -lapachone) in mammals. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36(4), p. 753–758, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26(5), p. 726-737, 2003.

SCHOLER, N.; OLBRICH, C.; TABATT, K.; MULLER, R.H.; HAHN, H.; LIESENFELD, O. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p.57–67, 2001.

SCHWENDEMAN, S. Importance of Regulatory Research Funding for Long Acting Release (LAR) Drug Products. FDA PUBLIC FORUM, 2014, Maryland, USA. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/GenericDrugUserFees/UCM399483.pdf> Acesso em agosto de 2016.

SENA, L.W.P. **Obtenção e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados a partir de gordura vegetal de murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará- Pará, Belém, 2016.

SEOANE, S.; DÍAZ-RODRÍGUEZ, P.; SENDON-LAGO, J.; GALLEGO, R.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, R., LANDIN, M. Administration of the optimized β -Lapachone-poloxamer-cyclodextrin ternary system induces apoptosis, DNA damage and reduces tumor growth in a human breast adenocarcinoma xenograft mouse model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84(3), p. 497–504, 2013.

SHAH, H. R.; CONWAY, R. M.; VAN QUILL, K. R.; MADIGAN, M. C.; HOWARD, S.A.; QI, J.; WEINBERG, V.; O'BRIEN, J. M. Beta-lapachone inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cell lines. **Nature Publishing Group: Eye**, v. 22(3), p. 454–60, 2008.

SHI, J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nanoletters**, v. 10, p. 3223 – 3230, 2010.

SHIVE, M. S. E ANDERSON, J. M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 28(1), p. 5–24, 1997.

SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. **Biochemical Pharmacology**, v. 83(8), p. 1033–1040, 2012.

SILVA, C.R. Bioativos tropicais com eficácia comprovada. **Cosmetics e Toiletries**, v. 14(1), 2002. Disponível em: http://www.tecnopress-editora.com.br/artigo_integral.htm Acesso em agosto de 2016.

SILVA, E. P.O.; CASTRO, L. H.; BIAGGIO, R. M.; BELTRANE JÚNIOR, M. Estudo das características físico-químicas e classificação de fito-ingredientes na espécie *Astrocaryum murumuru* (murumuru). ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 8. 2010. São José dos Campos. **Biodiversidade**: conservação, preservação e recuperação. Anais. Vale do Paraíba: UNIVAP, 2009. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0041_0030_01.pdf Acesso em julho de 2016.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de Naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26(3), p. 407, 2003.

SILVA, L. M.; HILL, L. E.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, C. L. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 165, p. 362–370, 2014.

SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V; FERNANDES, M. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; PINTO, M. D. C. F. R.; DE ASSIS LOPES, F.; SIMONE, C.A.; ANDRADE, C.K.Z.; PINTO, A.V.; FERREIRA V.F.; CASTRO, S. L. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5030–5038, 2008.

SILVA, S. P. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Empresa das Artes, 1996. 233p.

SILVA, A.R. **Obtenção de derivados do lapachol e de compostos relacionados**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

SILVA, A.T.C.R. **Síntese e caracterização do copolímero PLGA e estudos *in vitro* de sua degradação e liberação do fármaco atenolol**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Minas Gerais- Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SILVA JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- β -lapachone and nor- α -lapachone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7035-7041, 2007.

SITÔNIO, M. M.; DE CARVALHO JÚNIOR, C. H. R.; CAMPOS, I. DE A.; SILVA, J. B. N. F.; DE LIMA, M. DO C. A.; GÓES, A. J. S.; ... SILVA, T. G. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione(β -lapachone). **Inflammation Research**, v. 62(1), p. 107–113, 2013.

SOUSA, I. A. de; RAPOSO, A.; SOUSA, M. de M. M.; MIRANDA, E. M. de; SILVA, I. M. M. da; MAGALHÃES, V. B. **Manejo de murumuru (*Astrocaryum spp.*) para produção de frutos**. Rio Branco, AC: Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar, 2004. 30 p. (SEPROF. Documento técnico, 01).

SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, v.6, p.71-133,1990.

STEVANOVIC, M.; RADULOVIC, A.; JORDOVIC, B.; USKOKOVIC, D. Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.4, p.1–10, 2008.

SUNASSEE, S. N.; VEALE, C. G. L.; SHUNMOOGAM-GOUNDEN, N.; OSONIYI, O.; HENDRICKS, D. T.; CAIRA, M. R.; ... DAVIES-COLEMAN, M. T. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 98–110, 2013.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 109, p. 303–318, 2004.

TAGLIARINO, C.; PINK, J. J.; DUBYAK, G. R.; NIEMINENLL, A. L.; BOOTHMAN, D. A. Calcium is a key signaling molecule in β -Lapachone-mediated cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276(22), p. 19150–19159, 2001.

TEIXEIRA, P.R. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas Poliméricas contendo Isotretinoína**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás- Goiás, Goiânia, 2007.

TEIXEIRA, L.C.G. **Produção de biodiesel da gordura de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) via catálise heterogênea**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará-Pará, Belém, 2010.

TERAI, K.; DONG, G.-Z.; OH, E.-T.; PARK, M.-T.; GU, Y.; SONG, C. W.; PARK, H. J. Cisplatin enhances the anticancer effect of beta-lapachone by upregulating NQO1. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20(10), p. 901–9, 2009.

TermoFisher Scientific, 2016. Probes for Mitochondria- Section 12.2. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-organelles/probes-for-mitochondria.html> Acesso em maio de 2016.

TOSI, G.; COSTANTINO, L.; RIVASI, F.; RUOZI, B.; LEO, E.; VERGONI, A. V.; TACCHI, R.; BERTOLINI, A.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F. Targeting the central

nervous system: *in vivo* experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123. **Journal of Controlled Release**, v. 122, p. 1–9, 2007.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2016. Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Um guia eletrônico. Experimentos de Bioquímica: Lipídios. Disponível em: http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_lipidios/introducao_lipidios.htm Acesso em agosto de 2016.

US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2016. Clinical trials. Beta-lapachone. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00102700>>. Acesso em junho de 2016.

VASIR, J.K.; e LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 718–728, 2007.

VAN DE VEN, H.; VERMEERSCH, M.; MATHEEUSSEN, A.; VANDERVOORT, J.; WEYENBERG, W.; APERS, S.; ... LUDWIG, A. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: factor influence study and *in vitro* efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420(1), p. 122–32 2011.

VENTURINI, C. G. E.; JÄGER, C. P.; OLIVEIRA, A.; BERNARDI, A. M. O.; BATTASTINI, S. S.; GUTERRES, A. R. P. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids Surface A**, v. 375, p. 200–208, 2011.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery, **Journal of Controlled Release**, v. 78, p. 15–24, 2002.

WANG, Y.; QU, W.; CHOI, S. H. FDA's Regulatory Science Program for Generic PLA/PLGA-Based Drug Products. **American Pharmaceutical Review**. Disponível em: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/188841-FDA-s-Regulatory-Science-Program-for-Generic-PLA-PLGA-Based-Drug-Products/> Acesso em agosto de 2016.

WICKI, A.; WITZIGMANN, D.; BALASUBRAMANIAN, V.; HUWYLER, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138–157, 2015.

WUERZBERGER, S. M.; PINK, J. J.; PLANCHON, S. M.; BYERS, K. L.; BORNHANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by beta- lapachone. **Cancer Research**, v. 58, p. 1876-1885, 1998.

XU, X.; HO, W.; ZHANG, X.; BERTRAND, N.; FAROKHZAD, O. Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21(4), p. 223–232, 2015.

YADAV, D.; SURI, S.; CHOUDHARY, A. A.; SIKENDER, M.; HEMANT; BEG, M. N.; ... ASIF, M. Novel approach: Herbal remedies and natural products in pharmaceutical science as nano drug delivery systems. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v. 3(3), p. 3092–3116, 2011.

YAMAMOTO, H.; KUNO, Y.; SUGIMOTO, S.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. **Journal of Controlled Release**, v. 102(2), p. 373-81, 2005.

YORDANOV, G.; SKROBANSKA, R.; EVANGELATOV, A. Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: Formulation development and in vitro studies on cancer cell lines. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 98–105, 2012.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; DE OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; ... MOREIRA, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83(2), p. 156–167, 2013.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. C. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 83(5), p. 761, 2008.

ANEXOS

ANEXO A- Caracterização físico-química da gordura de murumuru: Índices de iodo, saponificação, peróxido, densidade e refração. Análises feitas por Sena (2016).

Parâmetros	Média e Desvio Padrão
Índice de acidez mg KOH/g	3,9 ± 0,057
Índice de Peróxido	2,99 ± 0,027
Índice de Saponificação mg KOH/g	241 ± 0,065
Índice de Iodo gI ² /100 g	11 ± 0,200
Densidade g/mL a 50 °C	0,49 ± 0,015
Índice de Refração	1,46 ± 0,014

ANEXO B- Perfil de ácidos graxos da gordura de murumuru, obtido por Cromatografia Gasosa. Análises feitas por Sena (2016).

Ácidos Graxos	Nome Comum	% Área Gordura de murumuru
12:0	Ácido láurico	48,1
14:0	Ácido mirístico	26,6
16:0	Ácido palmítico	6,9
18:0	Ácido esteárico	3,0
18:1	Ácido oléico	8,4
18:2	Ácido linoléico	4,2
SFA*	-	84,6