



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

SABRINA MENDES SILVA ARAUJO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE *Passiflora alata* Curtis
ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS HÍBRIDOS**

**SÃO CRISTÓVÃO
2020**

SABRINA MENDES SILVA ARAUJO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Passiflora alata*
Curtis ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS
HÍBRIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Adriana Andrade Carvalho

**SÃO CRISTÓVÃO
2020**

SABRINA MENDES SILVA ARAUJO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Passiflora alata*
Curtis ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS
HÍBRIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Andrade Carvalho

1º Examinador: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam

2º Examinador: Dra. Andrea Yu Kwan Villar Shan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter chegado até aqui, e por ter me dado forças nesse difícil processo de aprendizado, sem ele nada é possível.

Agradeço imensamente a minha Família, principalmente a minha mãe Elisângela e a minha avó Ieda, por todo amor e dedicação, desde minha existência, aos meus irmãos Neto e Lissa, por sempre estarem ao meu lado, me dando apoio, sem vocês nada faria sentido, à Bruna, por todo companheirismo e dedicação durante este trajeto (são minha base, amo vocês).

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Adriana Andrade Carvalho, por todos os ensinamentos e auxílio.

Ao Dr. Ricardo Amaral, por toda ajuda e tempo dedicado a este projeto, sua ajuda foi imprescindível.

À toda equipe do laboratório LNMed (ITP-UNIT), principalmente à professora Silvana, que me auxiliou grandemente em uma fase crucial de elaboração deste estudo.

À Prof^a. Dra. Zaine Camargo, pelos ensinamentos e ajuda.

A todos os colaboradores, Ingrede, Ianne e Monyelle que formam a equipe do laboratório LAPOCE.

Aos meus amigos de turma e vida Luana e Matheus.

A Renivan Souza, foi uma das pessoas mais incríveis que já conheci.

À CAPES e FAPITEC pelo financiamento deste projeto.

Imensamente grata a todos.

*“ Se a educação não for provocativa,
não se constrói, não se cria,
não se inventa, só se repete. ”*

Mario Sergio Cortella

RESUMO

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral do extrato hidroetanólico de *Passiflora alata* curtis encapsulado em lipossomas híbridos, Sabrina Mendes Silva Araujo, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2020.

O câncer é uma das doenças mais temidas dos últimos anos e avança de forma progressiva no século XXI. É uma doença multifatorial caracterizada por mutações genéticas e alterações epigenéticas, que podem ser desencadeadas por fatores ambientais e comportamentais relacionado ao estilo de vida. Atualmente, várias nanodrogas antitumorais estão sendo testadas em ensaios clínicos e pré-clínicos e mostram-se promissoras no quesito terapia e diagnóstico. Este trabalho teve por objetivo desenvolver biotecnologicamente e avaliar o efeito do extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora alata* Curtis encapsulado em lipossomas híbridos (LHPA) sobre a atividade citotóxica *in vivo*, em animais portadores de sarcoma 180. A *P. alata* foi submetida à extração, e encapsulada em lipossomas unilamelares. As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersidade e carga superficial (potencial zeta) por espalhamento dinâmico de luz. A morfologia das partículas obtidas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A atividade antitumoral *in vivo* do (LHPA) foi avaliada utilizando camundongos Swiss transplantados com tumor sarcoma 180 (S180) (2×10^6 células/0,5 mL/camundongo), por via subcutânea. Para avaliar o efeito do LHPA sobre o crescimento tumoral, um dia após a inoculação do tumor foi instituído o tratamento por 7 dias consecutivos, por via intraperitoneal (i.p.) e oral, em experimentos distintos. Um dia após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados, e em seguida feito coleta do sangue periférico, com subsequente ressecção dos órgãos e tumores para a medida do crescimento tumoral (% inibição) posteriores análises laboratoriais (hematológicas e bioquímicas). As médias foram obtidas a partir de dados com distribuição gaussiana, e foram comparadas entre si por meio de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$). Foi observado que o LHPA, após administração por via i.p., inibiu o crescimento tumoral em 68,08 e 83,44% nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente, o grupo controle negativo (veículo) teve inibição igual a 0, o quimioterápico 5-fluorouracilo foi utilizado como controle positivo nesta fase de testes. A avaliação da atividade antitumoral após administração por via oral, evidenciou que o LHPA nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia apresentou percentual de inibição de 55,15 e 65,85%, nesta ordem, controle negativo apresentou inibição igual a 0, ciclofosfamida foi utilizado como controle positivo. Desta forma, as nanopartículas LHPA apresentaram valores expressivos de inibição tumoral por distintas vias de administração testadas.

PALAVRAS-CHAVES: Câncer; Sarcoma 180; Lipossoma; Nanopartículas; *Passiflora alata*.

ABSTRACT

Development, characterization and evaluation of the antitumor activity of the hydroethanolic extract of *Passiflora alata* Curtis encapsulated in hybrid liposomes, Sabrina Mendes Silva Araujo, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, 2020.

Cancer is one of the most feared diseases of recent years and is progressing progressively in the 21st century. It is a multifactorial disease characterized by genetic mutations and epigenetic changes, which can be triggered by environmental and behavioral factors related to lifestyle. Currently, several antitumor nanodrugs are being tested in clinical and pre-clinical trials and show promise in terms of therapy and diagnosis. This work aimed to develop biotechnologically and evaluate the effect of the hydroethanolic extract of the leaves of *Passiflora alata* Curtis encapsulated in hybrid liposomes (LHPA) on the cytotoxic activity in vivo, in animals with sarcoma 180. *P. alata* was submitted to extraction, and encapsulated in unilamer liposomes. The nanoparticles were characterized in terms of size, polydispersity index and surface charge (zeta potential) by dynamic light scattering. The morphology of the particles obtained was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The in vivo antitumor activity of (LHPA) was evaluated using Swiss mice transplanted with sarcoma tumor 180 (S180) (2×10^6 cells / 0.5 mL / mouse), subcutaneously. To evaluate the effect of LHPA on tumor growth, one day after tumor inoculation, treatment was instituted for 7 consecutive days, intraperitoneally (i.p.) and orally, in different experiments. One day after the end of the treatment, the animals were euthanized, and then the peripheral blood was collected, with subsequent resection of the organs and tumors to measure the tumor growth (% inhibition), later laboratory analyzes (hematological and biochemical). The averages were obtained from data with Gaussian distribution, and were compared with each other through analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). It was observed that the LHPA, after administration via ip, inhibited tumor growth by 68.08 and 83.44% at doses of 50 and 100 mg / kg / day, respectively, the negative control group (vehicle) had inhibition equal to 0, the chemotherapeutic 5-fluorouracil was used as a positive control in this testing phase. The evaluation of antitumor activity after oral administration showed that LHPA at doses of 100 and 200 mg / kg / day showed a percentage of inhibition of 55.15 and 65.85%, in this order, negative control showed inhibition equal to 0, cyclophosphamide was used as positive control, so the LHPA nanoparticles showed significant values of tumor inhibition by different routes of administration tested.

SUBJECT HEADINGS: Cancer; Sarcoma 180; Liposome; Nanoparticles; *Passiflora alata*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
ACE.....	Extração acelerada com solvente
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Bax/Bak	Proteína pró-apoptótica
BGP	Banco Ativo de Germoplasma
Caspases	Proteases aspartato específicas contendo cisteína
Cels	Células
CDK	Cinases dependentes de ciclinas
Ciclo	Ciclofosfamida
CO ₂	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPMC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
EFPA.....	Extrato das folhas de <i>Passiflora alata</i>
EMBRAPA.....	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
G ₁	Intervalo 1
G ₂	Intervalo 2
IT.....	Inibição Tumoral
LH	Lipossoma Híbridos
MDR.....	Resistência a múltiplas drogas
LHPA	Lipossomas híbridos de <i>Passiflora alata</i>
MEV.....	Microscopia eletrônica de varredura
nm	Nanometros
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
IARC.....	International Agency for Research on Cancer
IP	Intraperitoneal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão de fosfato-salino
PDI.....	Índice de polidispersibilidade
ROS.....	Espécies reativas de oxigênio
S180	Tumor Sarcoma 180
SUS	Sistema Único de Saúde
TF.....	Terapia fotodinâmica
UCNPs.....	Propriedades físicas das nanopartículas de conversão ascendente
UV.....	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA-1. Representação esquemática de nanopartículas, nanoemulsão e lipossomas usados para veicular extratos de plantas	21
FIGURA-2. Linha do tempo do desenvolvimento da nanomedicina.....	22
FIGURA-3. Valores de massa e inibição tumoral em camundons Swiis tratados com LHPA, frente ao modelo S180. O gráfico demonstra porcentagem de inibição de 68,08% na dose de 50 mg/kg/dia e 83,44% na dose de 100 mg/kg/dia via intraperitoneal. 5-FU 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo, apresentando porcentagem de 84,59% de inibição.....	34
FIGURA-4. Grupo controle negativo (DMPC), portador de tumor sólido na região axilar, instituído tratamento com nanopartículas lipídicas (lipossomas) vazios, sem extrato de <i>Passiflora alata</i> no 8° dia após administração dos tratamentos por via i.p.....	35
FIGURA-5. Grupo LHPA 100 mg/kg/dia, portador de tumor sólido na região axilar, instituído tratamento com lipossomas de <i>Passiflora alata</i> no 8° dia após administração dos tratamentos por via i.p.....	35
FIGURA-6. Grupo controle negativo (DMPC), portador de tumor sólido na região axilar, instituído tratamento com nanopartículas lipídicas (lipossomas) vazios, sem extrato de <i>Passiflora alata</i> no 8° dia após administração dos tratamentos por via oral.....	39
FIGURA-7. Atividade do LHPA em camundongos inoculados com células do tumor S180. O gráfico apresenta a massa tumoral em gramas (g) e nível de inibição de crescimento (%). Os animais foram tratados por v.o., iniciando um dia após a implantação do tumor, por 7 dias consecutivos.....	40
FIGURA-8. Grupo LHPA 200 mg/kg/dia, portador de tumor sólido na região axilar.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA-1.	Matriz do planejamento fatorial 2 ³	26
TABELA-2.	Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento experimental.....	27
TABELA-3.	Detalhamento dos grupos por via IP e oral.....	30
TABELA 4	Matriz e resultados do planejamento fatorial para determinação do tamanho de partícula e polidispersibilidade do lipossoma híbrido contendo extrato de P. alata.....	32
TABELA-5.	Resultados do LHPA na avaliação dos parâmetros do hemograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor S180.....	36
TABELA-6.	Resultados do LHPA sobre os parâmetros hematológicos no leucograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor S180.....	37
TABELA-7.	Parâmetros bioquímicos das enzimas ALT/AST e concentrações plasmáticas de ureia e creatinina de camundongos machos da linhagem Swiss portadores do tumor S180, tratados com nanopartículas de LHPA.....	38
TABELA-8.	Resultados do LHPA na avaliação dos parâmetros do hemograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor S180.....	41
TABELA-9.	Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 10 animais. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de <i>Student Newman Keuls</i> . DMPC foi usado como controle negativo e ciclofosfamida como controle positivo.....	42
TABELA-10.	Parâmetros bioquímicos das enzimas ALT/AST e concentrações plasmáticas de ureia e creatinina de camundongos machos da linhagem Swiss portadores do tumor S180, tratados com nanopartículas de LHPA por via oral.....	43

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	12
2- REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Câncer	15
2.2 - <i>Passiflora alata curtis</i>	18
2.3 - Nanotecnologia aplicada a extratos de plantas.....	20
2.4 - Lipossomas.....	23
3 - OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	25
3.1 - Objetivos Gerais	25
3.2 - Objetivos Específicos	25
4 – CASUÍSTICA E MÉTODO	25
4.1- Aspectos éticos	25
4.2 - Obtenção do extrato hidroetanólico de <i>p. Alata</i>	25
4.3 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS HÍBRIDOS	26
4.3.1 - Otimização multivariada utilizando planejamento fatorial completo (2 ³) com tratamento multiresposta.....	26
4.3.2 - Caracterização físico-química	27
4.3.3 - Desenvolvimento dos lipossomas híbridos	27
4.3.4 - Preparação das amostras para caracterização morfológica (MEV).....	28
4.4 - ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	28
4.4.1 - Manutenção do tumor sarcoma 180.....	28
4.4.2 - Animais	28
4.4.3 - Procedimento.....	29
4.5 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS	30
4.5.1 - Parâmetros bioquímicos.....	30
4.5.2 - Parâmetros hematológicos	31
4.5.3 - Análise estatística	31
5 - RESULTADOS	31
5.1 - Otimização usando a função de deseabilidade.....	31
5.2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	33
5.2.1 - Valores para inibição celular e massa tumoral por via IP.....	33
5.3 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM ANIMAIS TRATADOS POR VIA (IP)	35
5.3.1 - Testes hematológicos (Hemograma)	35
5.3.2 - Testes hematológicos (Leucograma)	36
5.3.3 - Exames bioquímicos.....	38
5.4 - VALORES PARA INIBIÇÃO CELULAR E MASSA TUMORAL POR VIA ORAL	39

5.5 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS TRATADOS POR V.O.....	41
5.5.1 - Testes hematológicos (Hemograma)	41
5.5.2 - Testes hematológicos (Leucograma)	42
5.5.3 - Exames bioquímicos	43
6- DISCUSSÃO	44
7- CONCLUSÃO.....	54
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1- INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença, que se apresenta com estimativas de mortalidade crescente. Esses dados refletem a carência por agentes antineoplásicos mais efetivos, que levem ao aumento da expectativa de vida ou a cura. Nesse contexto, a natureza é uma alternativa para o problema, por abrigar uma gigantesca biodiversidade e o Brasil se destaca, por possuir a maior diversidade de espécies de plantas do mundo, mas pouco exploradas quanto suas características biológicas (OPAS, 2018).

A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, pelo envelhecimento e crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer. Com base no documento World Cancer Report 2014 da International Agency for Research on Cancer (IARC), e nos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (BRAY et al., 2014).

As estimativas mundiais de 2018, apontam que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). A incidência em homens (9,5 milhões) representa 53% dos casos novos, sendo um pouco maior nas mulheres, com 8,6 milhões (47%) de casos novos (BRAY et al., 2018).

Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

O tratamento do câncer varia e geralmente envolve etapas em conjunto com ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Nos últimos anos, a nanoterapia direcionada e a imunoterapia estão ganhando força. A quimioterapia é a principal abordagem para o tratamento de tumores metastáticos, contudo está associada a diversos efeitos colaterais graves, como supressão da medula óssea, neurotoxicidade, reação gastrointestinal e danos hepáticos e renais. Além disso, os quimioterápicos podem induzir resistência a múltiplas drogas, levando à falha do tratamento após a recorrência da doença. Com aspectos negativos quanto a citotoxicidade ampla da quimioterapia, a ciência tem buscado alternativas terapêuticas sob a prerrogativa de que os extratos de plantas mostraram propriedades anticancerígenas interessantes sem os graves efeitos colaterais dos agentes citotóxicos (FENG et al., 2017).

A *Passiflora alata* é uma espécie nativa do Brasil usada em várias preparações farmacêuticas que são registradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Ela foi inserida na Farmacopeia Brasileira (FB), desde a sua 1ª edição em 1926, com a descrição da droga vegetal, extrato fluido e tintura de suas folhas (BRANDÃO, 2006). Estudos mostram que o extrato hidroetanólico 64% (v/v) das folhas de *P. alata* Curtis demonstra alta citotoxicidade *in vitro* frente a distintas linhagens de células, como células tumorais de ovário-humano (OVACAR-8), carcinoma de cólon (HCT-116) e glioblastoma (SF295), com valores de inibição de 96%, 97.5% e 99%, respectivamente (GOMES et al., 2017).

Nos últimos anos, vários estudos em nanotecnologia na área de biologia médica, incluindo diagnóstico e terapia, ganharam atenção notável. Além disso, a pesquisa e o desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais projetadas como transportadoras de medicamentos farmacêuticos estimularam o crescimento exponencial de aplicações na medicina na última década. Os princípios de design dessas nanopartículas, incluindo nano-emulsões, dendrímeros, nano-ouro, lipossomas, conjugados transportadores de drogas, complexos anticorpo-droga e nanopartículas magnéticas, baseiam-se principalmente em conjuntos exclusivos de componentes sintéticos, naturais ou biológicos (PURI et al., 2009).

O uso da nanotecnologia na encapsulação de extratos medicinais tem aberto caminho para uma melhor atividade e sustentado a liberação de nanopartículas. Desde então, a estratégia de aplicação da nanotecnologia em extratos vegetais, em especial, vem sendo bastante citada na literatura uma vez que os sistemas nanoestruturados demonstram

ser capazes de potencializar a ação de extratos de plantas, reduzindo a dose. A preparação de lipossomas com solutos retidos foi demonstrada pela primeira vez em um trabalho publicado pelo professor Bangham do Reino Unido. Desde a sua criação, os lipossomas foram explorados como carreadores para a entrega de medicamentos e produtos farmacêuticos (PURI et al., 2009).

Os lipossomas são uma classe amplamente estudada para integrar o transporte de fármacos, geralmente caracterizada pela presença de uma bicamada lipídica composta principalmente por fosfolipídios anfipáticos contendo um interior aquoso com carga multidimensional. Atualmente, várias formulações de lipossomas estão em uso clínico para combater o câncer e doenças infecciosas, enquanto outras aguardam os resultados de ensaios clínicos (LI, 2017).

A natureza mostra-se como uma alternativa ao problema, por abrigar uma fascinante biodiversidade de vidas microbiana, vegetal e animal. Quando observado os estudos químicos, farmacológicos e clínicos dos medicamentos tradicionais utilizados na clínica, podemos perceber que, predominantemente, derivaram de plantas medicinais (NEWMAN e CRAGG, 2007). O reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólicos secundários, muitos destes de grande valor devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (CRAGG, NEWMAN e YANG, 2006; AGGARWAL e SHISHODIA, 2006). Tais metabólicos possuem grandes potencialidades como princípios ativos e podem ser utilizados diretamente na terapia, como precursores na semi-síntese quimiofarmacêutica ou em modelos para síntese de novos princípios de uso terapêutico. Os metabólicos secundários podem ser divididos em diversas classes estruturais: flavonóides, alcaloides, taninos, saponinas, terpenos, ligninas, esteróides, dentre outros (CLARDY e WALSH, 2004).

O Brasil possui a maior diversidade de espécies de plantas do mundo, mas um valor inferior a 10% foi avaliado no que diz respeito às suas características biológicas e menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados. Dentro desse universo elas são escassamente estudadas quanto à citotoxicidade em linhagens de células tumorais. Contudo, esforços estão sendo realizados por pesquisadores na tentativa de explorar a natureza a procura de novas plantas e substâncias com potencial atividade (FERREIRA, et al., 2011). Portanto, considerando que há necessidade de terapias eficazes para o câncer, o presente estudo analisou os tratamentos induzidos com extrato de

Passiflora alata encapsulado em lipossomas híbridos, sobre a atividade citotóxica *in vivo* em modelos animais transplantados com células tumorais.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Atualmente, a definição de câncer refere-se a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2020).

Esse processo anormal de crescimento celular pode ocorrer de duas maneiras: A primeira delas é através da perda do controle do ciclo celular, caracterizado pela mutação de proto-oncogenes, os quais ativam o ciclo celular em condições normais, transformando-o em um oncogenes, ou seja, um gene alterado que ativa constantemente o ciclo celular. O inverso também pode acontecer, no caso, com os genes supressores de tumor, que tem a função de controlar o crescimento das células, inibindo o ciclo celular. Esses genes supressores de tumor, quando alterados, deixam de inibir o ciclo celular, permitindo que o mesmo ocorra de forma descontrolada dentro da fase mitótica (ARAÚJO, 2019).

A segunda forma de desenvolvimento do câncer pode acontecer por meio de mutações no gene que codifica a proteína P53, conhecido também como gene de reparo. Este gene, por codificar uma proteína que regula o ciclo celular, atua como um supressor de tumor. Vários estudos mostram que, a P53 está relacionada com o bloqueio do ciclo celular em caso de dano ao DNA e, por isso, tornou-se objeto de pesquisas (ZHAO et al., 2017; ARAÚJO, 2019).

Os genomas do câncer podem conter centenas de rearranjos cromossômicos. Esses genomas evoluem gradualmente, acumulando mudanças em pequena escala sucessivamente ao longo de muitas gerações. No entanto, o alto número de rearranjos em muitos cânceres sugere uma visão alternativa, não exclusiva obviamente, de que os genomas do câncer podem evoluir rapidamente por meio de episódios discretos que geram surtos de alterações genômicas. Este modelo é atraente porque um pequeno

número de eventos mutacionais catastróficos pode explicar parcimoniosamente a origem da extrema complexidade em muitos genomas de câncer (UMBREIT et al., 2020).

Os genes que participam da formação de neoplasias são, principalmente, os que nas células normais estão envolvidos com o controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose. Os oncogenes codificam proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo mitótico e levam as células a se tornarem cancerígenas, esses genes resultam de mutações somáticas, e são dominantes. O câncer, basicamente, é uma doença do DNA (YOU, 2012).

O processo de conversão de uma célula normal para uma célula cancerígena, denominado de carcinogênese, este mecanismo é entendido através da aquisição sequencial de alterações celulares em múltiplas etapas, geralmente lento, ligado a mutagênese, que pode levar vários anos para ser observado como uma massa tumoral detectável (CAO, 2017). Este processo possui várias etapas envolvendo mutações de genes críticos e aumento da proliferação celular, etapas conhecidas como iniciação, promoção e progressão (KLAUNIG e WANG, 2018; INCA, 2020).

No estágio de iniciação os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos, que provocam modificações em alguns de seus genes. Nessa fase, as células se encontram geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Já no estágio de promoção, as células encontram-se geneticamente alteradas, ou seja, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor (INCA, 2020).

O último estágio é a fase de progressão, onde se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos (INCA, 2020).

A superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre de fontes endógenas e /ou exógenas, que também determinam o processo de carcinogênese. Fontes endógenas incluem ambas organelas intracelulares, bem como fontes inflamatórias. Fontes exógenas incluem xenobióticos, produtos farmacêuticos e radiação. O oxidante resultante desse processo pode induzir mutações em genes celulares críticos, sob a

inibição das vias de defesa antioxidante e de mecanismos de reparo do DNA. Além disso, as ROS podem ativar uma série de sinais e vias de transdução, que transcrevem genes reguladores de crescimento celular (KLAUNIG e WANG, 2018).

As células do câncer possuem defeitos nos mecanismos que governam a proliferação normal. Entre as características do tumor maligno estão a autossuficiência da sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade a inibidores do crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão e capacidade de metastatizar-se (YUAN et al., 2017). O câncer é caracterizado por um desvio nos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação das células. Essas células proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas adjacentes normais (KATZUNG, 2003). As células que sofrem transformação neoplásicas geralmente expressam antígenos de superfície celular que parecem ser do tipo fetal normal (APTSIAURI, et al., 2007). Além disso, apresentam outros sinais de indiferenciação aparente e podem exibir anormalidades cromossômicas estruturais e numéricas, incluindo diversas translocações e o aparecimento de sequências gênicas amplificadas (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

O desenvolvimento do câncer envolve um processo minucioso, no qual muitos fatores identificados e não identificados desempenham um papel. A angiogênese tumoral, crescimento de novos vasos sanguíneos, é um dos principais pré-requisitos para o crescimento tumoral, uma vez que as células tumorais dependem do suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, bem como da remoção de produtos residuais. Fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), orquestram o desenvolvimento da angiogênese (KUOL, 2018).

Existe uma pequena subpopulação de células no interior do tumor, que podem ser descritas como células-tronco tumorais. Essas células retêm a capacidade de sofrer ciclos repetidos de proliferação, podendo migrar para locais distantes no corpo, a fim de colonizar vários órgãos através do processo denominado metástase. Essa progressão neoplásica é acompanhada de anormalidades quantitativas em diversas vias metabólicas e componentes celulares (CROKER e ALLAN, 2008).

Os processos invasivos e metastáticos, bem como a série de anormalidades metabólicas decorrentes do câncer, provocam doença e morte eventual do paciente, a não ser que a neoplasia possa ser erradicada com o tratamento (INCA, 2020). Existem, de

forma geral, algumas modalidades de terapias na tentativa de diminuir os índices de mortalidade por câncer, como a quimioterapia, a mais utilizada, em conjunto com a cirurgia e a radioterapia. Nesse sentido, devido à relativa semelhança entre as células malignas e normais do corpo, o grande desafio para o tratamento de cânceres é a distinção entre essas células. Esta falta de especificidade dos quimioterápicos gera violentos efeitos secundários como diarreia, vômitos, náuseas, alopecia e maior susceptibilidade a infecções (BRANDÃO, 2010).

2.2 - *Passiflora alata* Curtis

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações constituindo, ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação (FENNELL et al., 2004). Um exemplo é o maracujá, cuja utilização como planta medicinal faz parte da cultura de povos americanos, europeus e asiáticos. Espécies comerciais e silvestres integram o repertório etnofarmacológico que recomenda folhas, flores, raízes e frutos para combater as mais diferentes enfermidades; do controle de verminoses ao tratamento de tumores gástricos (MATOS, 2002; DRAHMAN, DHARMAN e SHARMA, 2004).

Os maracujás pertencem ao gênero *Passiflora*, compreende cerca de 500 espécies pertencentes à família Passifloraceae. A família é formada por 12 gêneros, dos quais 7 estão dispersos em várias partes do globo como a África, Ásia, Ilhas do Pacífico Sul, Nova Guiné e Nova Zelândia. O gênero *Passiflora* é o mais importante da família, distribuídas em regiões tropicais e temperadas da América do Sul (MIRODDI et al., 2013).

O gênero *Passiflora* apresenta grande importância econômica na agricultura e horticultura, sendo empregada para fins ornamentais, medicinais e alimentares. Algumas espécies como *P. edulis* (maracujá-roxo) e *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (maracujá-amarelo) destacam-se em função da qualidade dos frutos para consumo. A espécie *P. incarnata* (maracujá) é conhecida mundialmente por suas propriedades medicinais. O valor ornamental do gênero deve-se às flores coloridas e perfumadas (MELETTI, SOARES-SCOTT e BERNACCI, 2005). A *P. alata* (maracujá-doce) é a espécie mais amplamente utilizada no Brasil para fins medicinais, que, assim como a *P. incarnata*, apresenta atividade ansiolítica descrita (BERNACCI, MELETTI e SOARES-SCOTT, 2003).

No Brasil encontram-se aproximadamente 142 espécies de *Passiflora*, sendo 83 delas endêmicas (JARDIM BOTÂNICO, 2019). Destas espécies, as mais conhecidas e utilizadas são a *P. alata* Curtis (BARBOSA et al., 2008) e a *P. edulis* Sims (LI et al., 2011). Recentemente, na quinta edição da FB, houve a inserção da monografia de *P. edulis* (ANVISA, 2010). Monografias das drogas vegetais de *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, assim como a tintura de *P. edulis* estão descritas no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB), todas com a indicação de uso como ansiolítico e sedativo leve (ANVISA, 2011). Folhas de *P. alata*, *P. edulis* e partes aéreas de *P. incarnata* estão recomendadas para quadros leves de ansiedade e insônia a partir da infusão de suas drogas vegetais segundo a RDC nº 10 (2010), que trata da notificação de drogas vegetais junto à Anvisa (ANVISA, 2010).

No âmbito da saúde pública no Brasil, foi estabelecido em 2006 pelo Ministério da Saúde a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (PNPIC, 2006). Em dezembro de 2008, foi instituído o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que tem como objetivo inserir, com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Nesse contexto, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS listou 71 espécies de plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamentos fitoterápicos no Sistema Único de Saúde, sendo incluídas nessa lista *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* (RENISUS, 2009).

Nas últimas décadas, o número de estudos fitoquímicos e farmacológicos com a *P. alata* aumentou. Dentre os principais metabólitos secundários relatados para a *P. alata* destacam-se os flavonoides (PEREIRA et al., 2004; MÜLLER et al., 2005) xilosilvitexina, vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, apigenina, rutina, ramnosilscoparina, saponinas (REGINATTO et al., 2004; REGINATTO, 2001) com diferentes estruturas químicas (quadrangulosídeo, 3-O-β-D-glicopiranosilestigmasterol, ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3βDglicopiranosil(1→2)βDglicopiranosiloleanólico), os alcaloides (harmana, harmanina e harmalina) também fazem parte dos metabólitos (ABOURASHED; VANDERPLANK e KHAN, 2003).

Um estudo descrito por Zhan et al. (2013) relatou a atividade antimelanogênica de extratos obtidos das folhas de *P. edulis*, o qual atribuiu a atividade observada a presença de glicosídeos flavonoídicos, glicosídeos triterpenos e ciano glicosídeos. Estudos também foram realizados com os decoctos de frutos de duas espécies de

Passiflora (*P. edulis* e *P. foetida*), a qual inibiram metalo-proteases, que são enzimas relacionadas à progressão e invasão de tumores, metástase e angiogênese tumoral, de forma dose-dependente (PURICELLI et al. 2003). Em estudo realizado por Sujana et al. (2012) e Ripa et al. (2009) foram descritas atividades citotóxicas dos extratos de *P. incarnata* e *P. edulis* frente à linhagem de células tumorais.

Um estudo com o extrato hidroetanólico 64% (v/v) das folhas de *P. alata* demonstrou alta citotoxicidade *in vitro* frente a três linhagens de células tumorais, ovário-humano (OVACAR-8), carcinoma de cólon (HCT-116) e glioblastoma (SF295), com valores de inibição de 96%, 97.5% e 99%, respectivamente. No mesmo estudo, frente às mesmas linhagens celulares, foi determinada a concentração inibitória média capaz de provocar 50% de seu efeito máximo (CI50) com resultados >50 µg/mL, 3.60 µg/mL e 2.99 µg/mL, respectivamente. De acordo com programa pré-clínico de triagem de drogas anticâncer o extrato que apresentar CI50 < 30 µg/mL são considerados promissores para atividade antitumoral *in vivo*. Os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* frente ao sarcoma 180 demonstrou inibição significativa do crescimento tumoral. Além disso, parâmetros toxicológicos e hematológicos avaliados demonstraram que o extrato apresenta baixa toxicidade nos modelos experimentais avaliados, balanço este essencial para a sua aplicabilidade como agente antitumoral (GOMES et al., 2017).

2.3 - Nanotecnologia aplicada a extratos de plantas

O termo nanotecnologia está relacionado ao desenvolvimento e uso de materiais e sistemas em nanoescala, isto é, 1 a 1000 nanômetros. Trata-se de um campo em ascensão, o qual une conhecimento de diversas áreas e possui ampla aplicabilidade, contribuindo para o progresso na medicina, farmácia, física, química, engenharia e nos mais diversos setores (BHARALI et al., 2011; SAFARI e ZARNEGAR, 2013).

A incorporação da nanotecnologia no aprimoramento de plantas medicinais e fitoterápicos vem ganhando espaço significativo na literatura e comunidade científica uma vez que a complexidade química dos extratos é extremamente relevante no sucesso de uma formulação, pois desempenham um papel fundamental na liberação do ativo. Para isso, os veículos de liberação devem, ao mesmo tempo, ser capaz de aprimorar a solubilização do fármaco, minimizar o processo de degradação, reduzir a toxicidade, mascarar o sabor, controlar a absorção do ativo bem como a resposta biológica (KESARWANI e GUPTA, 2013).

A maioria das substâncias biologicamente ativas dos extratos, como por exemplo, os flavonoides, taninos, terpenoides, são altamente hidrossolúveis, mas apresentam baixa absorção, ou por serem incapazes de atravessar a membrana lipídica das células ou por apresentarem tamanho molecular elevado, dificultando sua absorção, gerando perda de biodisponibilidade e conseqüentemente da eficácia. É por esse e outros motivos que uma série de plantas medicinais e fitoterápicos apresenta potencial *in vitro* extraordinário, mas demonstra pouca ou nenhuma ação *in vivo* (AJAZUDDIN, 2010). Além disso, vários extratos vegetais e fitomoléculas, apesar de apresentarem excelente bioatividade *in vitro* demonstram menos ou nenhuma ação *in vivo* devido ao seu baixo teor de lipídios solubilidade ou tamanho molecular impróprio ou ambos, resultando em absorção e baixa biodisponibilidade (AJAZUDDIN, 2010).

O uso da nanotecnologia na encapsulação de extratos medicinais tem aberto caminho para uma melhor atividade e sustentado a liberação de nanopartículas. Desde então, a estratégia de aplicação da nanotecnologia em extratos vegetais, em especial, vem sendo bastante citada na literatura uma vez que os sistemas nanoestruturados demonstram ser capazes de potencializar a ação de extratos de plantas, reduzindo a dose necessária e os efeitos colaterais, e melhorando sua atividade biológica (GHOSH et al., 2013). Os principais tipos de sistemas nanoestruturados usados com a finalidade de veicular extratos de plantas são: lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas (ZORZI et al., 2015) (**Figura1**).

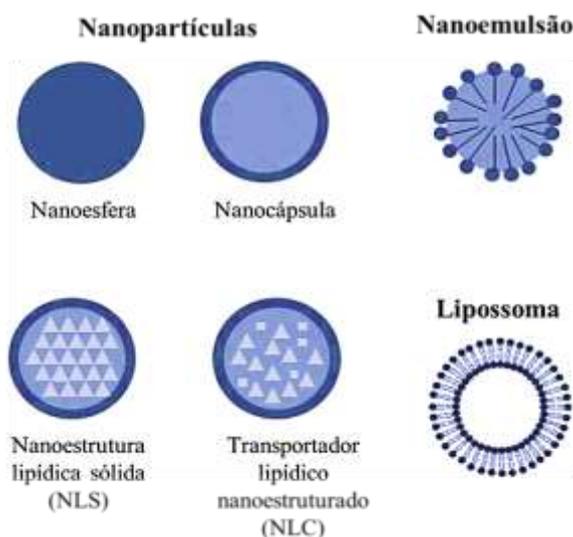


Figura 1 – Representação esquemática de nanopartículas, nanoemulsão e lipossoma usados para veicular extratos de plantas (ZORZI et al. 2015).

O reconhecimento de que as células biológicas exploram as propriedades tensoativas dos lipídios na produção de membranas anatômicas tem incentivado, nos últimos anos, muitos pesquisadores a desenvolver e estudar sistemas modelo baseados na orientação de lipídios nas diversas interfaces (LI, et al. 2017).

Houve um avanço considerável quando em 1963, Haydon e Taylor relataram independentemente uma técnica para a preparação de biomoleculares isoladas a partir de membranas lipídicas que separam dois compartimentos aquosos. Por razões termodinâmicas partia do pressuposto de que era provável, que em equilíbrio, todas as bicamadas lipídicas formassem uma membrana ininterrupta, não existindo interfaces de hidrocarboneto / água expostas, das quais se segue que todo compartimento aquoso seria discreto e isolado do seu vizinho, incluindo uma separação completa do compartimento aquoso mais externo de toda estrutura a partir da fase aquosa contínua em que está suspensa (HAYDON e TAYLOR, 1963).

Então Bangham em 1965 evidenciou que poderiam haver analogias a serem traçadas entre as propriedades de intumescimento das estruturas líquido-cristalinas fosfolipídicas, controladas por estruturas de dupla camada e o comportamento de preenchimento de estruturas biológicas completas, composta de lipídios contendo membranas, nome dado aos lipossomas (LI et al., 2017).

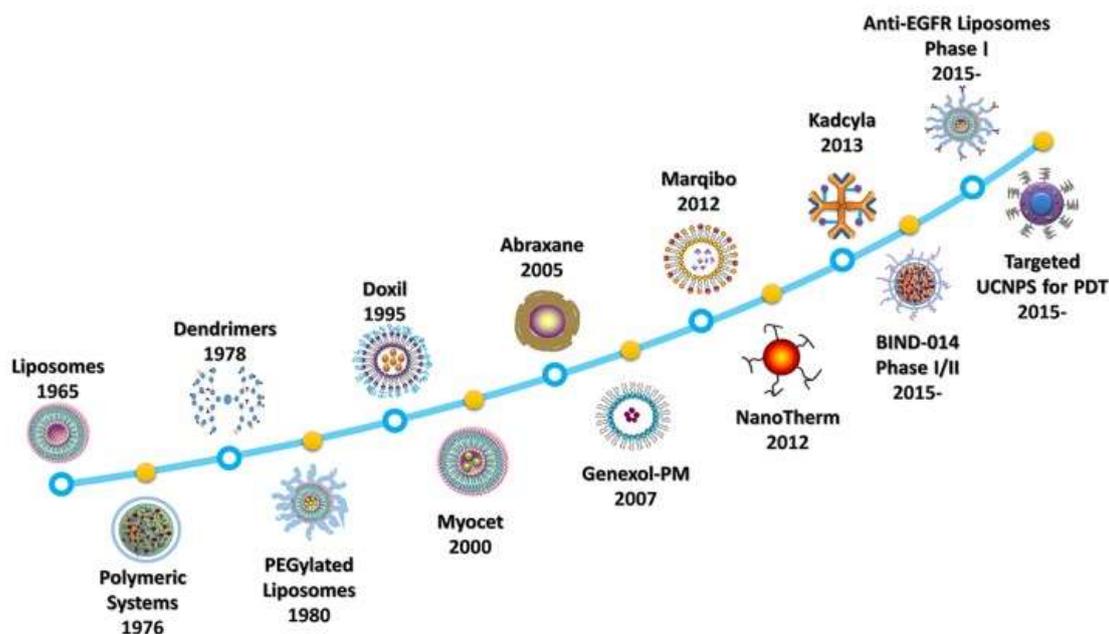


Figura 2- Linha do tempo do desenvolvimento da nanomedicina.

Os Lipossomas evoluíram partir de 1965, sistemas poliméricos (1976), dendrímeros (1978) e lipossomas PEGuilados (1980) foram desenvolvidos como portadores de nanodrogas na fase inicial. Doxil foi o primeiro lipossoma aprovado pela FDA para terapia do câncer. A medida que a nanomedicina se desenvolveu surgiram Myocet (doxorubicina) nos anos 2000, Abraxane (doxorubicina) e Genoxol-PM (paclitaxel) posteriormente. O lipossoma Marquibo a base de vincristina, NanoTherm, Kadyla foram aprovados para uso clínico. As nanopartículas de BIND-014 concluíram ensaios clínicos de fase II em cânceres avançados. O lipossoma Anti-EGFR, são usados no recrutamento de câncer de mama. As propriedades físicas das nanopartículas de conversão ascendente (UCNPs) usadas na terapia fotodinâmica (TFD) também representam uma direção promissora em pesquisas futuras (LI et al., 2017).

O conceito de usar um lipossoma como sistema de liberação seletiva de drogas para a pele foi explorado pela primeira vez em 1980. As tecnologias atualmente sendo desenvolvidas ou exploradas para o câncer incluem lipossomas, nanoconchas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, dendrímeros, ciclodextrina e nanopartículas magnéticas (TRAN, WATTS e ROBERTSON, 2009).

2.4 - Lipossomas

Nas últimas décadas, vários tipos de sistemas de distribuição de drogas para terapia do câncer foram fabricados a partir de vários materiais. Entre esses sistemas, os lipossomas são frequentemente considerados o arquétipo de muitas vesículas de liberação de drogas, que foram as primeiras 'drogas em nanoescala aprovadas para uso clínico (LIN et al, 2010).

Os lipossomas são partículas formadas por membrana (ou lamela) constituída por moléculas anfifílicas de dupla cadeia carbônica (fosfolipídeos) organizadas em bicamada lipídica e que possuem um interior aquoso (poço aquoso). Dependendo do tamanho e do número de bicamadas lipídicas em torno do compartimento aquoso, os lipossomas podem ser classificados como: unilamelares ou multilamelares. Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, que ficam retidas no compartimento aquoso e na membrana, respectivamente (CHOI e MAIBACH, 2005; EL MAGHRABY, WILLIAMS e BARRY, 2006).

Segundo Gómez-Henz e Fernandez-Romero (2005), os lipossomas foram desenvolvidos para melhorar a biodistribuição de compostos em locais específicos do

corpo humano, portanto, passaram a ser reconhecidos como transportadores de substâncias biologicamente ativas, tendo a capacidade de potencializar e/ou modificar a atividade das substâncias com os quais eles estão associados. Este efeito é dependente da composição química e da estrutura fosfolipídica. Além disso, os lipossomas apresentam elevada versatilidade de composição e tamanho, fácil produção e manuseamento, baixa toxicidade, biodegradabilidade da matriz, biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e possibilidade de acoplar à superfície ligados de diferentes formas (FONSECA, 2006).

Bhattacharya e Ghosh (2009) utilizaram sistemas baseados em lipídios para incorporação de extrato de chá verde e ginseng, com o objetivo de aumentar a absorção dos componentes do extrato. Su et al. (2008) desenvolveram nanopartículas contendo extrato da raiz de *Radix salvia* e observaram significativa melhora da biodisponibilidade do extrato. Sinico et al. (2005) desenvolveram lipossomas contendo óleo essencial de *Artemisia arborescens* e notaram que estes sistemas propiciaram aumento da penetração dos componentes ativos desta planta na barreira citoplasmática viral. Rajendran et al. (2013) obtiveram nanopartículas contendo o extrato metanólico de *Ocimum sanctum* e observaram melhor ação antimicrobiana para o extrato encapsulado do que na forma livre quando testado contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*.

O objetivo da administração do medicamento é aumentar a eficácia terapêutica. A liberação altamente localizada e rápida da droga nos locais-alvo, sem distribuição indesejada em tecidos normais, é a forma mais terapêuticamente eficaz de minimizar os efeitos colaterais desfavoráveis ao tratar pacientes. Para atingir este objetivo, várias estratégias diversas foram propostas para controlar a liberação de drogas a partir de lipossomas. Estes incluem lipossomas sensíveis ao pH, lipossomas fotossensíveis, lipossomas termossensíveis, todos os quais liberam seus conteúdos em resposta a estímulos fisiológicos locais ou externos (LIN et al., 2019).

Em comparação com medicamentos convencionais, as formulações lipossomais alcançam maior acúmulo de medicamentos na região do tumor por meio de um efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorado, tempo de circulação sanguínea prolongado, toxicidade de medicamentos reduzida e eficácia terapêutica aumentada. No entanto, o efeito de direcionamento passivo dos lipossomas ainda é um desafio para garantir o aumento da captação celular da droga em um sistema biológico (ZHOU et al., 2019).

3 - OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 - Objetivos Gerais

Desenvolver biotecnologicamente e avaliar o efeito do extrato hidroetanólico das folhas de *Passiflora alata* Curtis nanoencapsulado em lipossomas híbridos (LHPA) sobre a atividade antitumoral em animais com sarcoma 180.

3.2 - Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar fisicoquimicamente os LHPA;
- Caracterizar a morfologia dos lipossomas;
- Investigar os possíveis efeitos do LHPA sobre o crescimento tumoral de animais transplantados com o sarcoma 180;
- Investigar os efeitos do LHPA sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos (aspectos toxicológicos) de animais transplantados com sarcoma 180;
- Estudar a eficácia terapêutica da formulação em modelos animais por diferentes vias de administração.

4 – CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1- Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi submetido à apreciação técnica pelo Comitê de ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe e aceito dentro das normas constando número de protocolo 83/2018.

4.2 - Obtenção do extrato hidroetanólico de *P. alata*

As folhas de *P. alata* Curtis foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BGP) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas/BA. As amostras foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante por sete dias, a 30 °C. O material vegetal seco foi pulverizado e a granulometria padronizada com tamiz de 16 mesh (1,00 mm de malha). A droga vegetal de *P. alata* foi submetida à extração empregando-se o equipamento de extração acelerada

com solvente (ASE) equipado com cela extratora de aço inoxidável com capacidade de 100 mL com fechamento hermético e cartucho de papel 22 x 50 mm, um frasco de lavagem (rinse) e frascos coletores (vidro transparente) com capacidade de 250 mL. O extrato foi preparado utilizando um sistema etanol:água (64:36 v/v), temperatura do forno de 80 °C, 5 ciclos de extração, tempo de extração de 10 min, *flushing* de 100%, sob pressão de 1500 psi (N₂), com purga de 60 s. Posteriormente, cada extrato foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 55 °C, até a completa remoção do solvente, resultando nos respectivos extratos brutos, que foram doados para este trabalho, pois estavam previamente extraídos (GOMES et al., 2017).

4.3 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS HÍBRIDOS

4.3.1 - Otimização multivariada utilizando planejamento fatorial completo (2³) com tratamento multiresposta

Um planejamento fatorial completo 2³ com tratamento multiresposta foi empregado para a definição da etapa do desenvolvimento da formulação. O planejamento foi executado de acordo com a Tabela 1 e serão avaliadas as seguintes respostas: tamanho de partícula e índice de polidispersibilidade (PDI). No estudo, os fatores foram codificados em nível mínimo (-1), ponto central (0) e máximo (+1). Os fatores em estudo incluíram a concentração do extrato hidroetanólico de *P. alata* (µg/mL), rotação (rpm) e tempo (min), como mostrados nas Tabelas 1 e 2. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e no mesmo dia. Os dados foram analisados no software STATISTICA 8.0 sendo a resposta de interesse tomada como a resposta múltipla resultante da combinação das respostas referentes às variáveis tamanho e PDI, onde os valores de tais respostas foram maximizados para seus respectivos valores de mínimo.

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 2³.

Ensaio	Concentração do extrato (µg/mL)	Rotação (rpm)	Tempo (min)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-

4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 2 - Fatores e níveis experimentais estabelecidos para o planejamento experimental.

Fatores	Níveis		
	Valor mínimo (-)	Ponto central (0)	Valor máximo (+)
Concentração do extrato (µg/mL)	500	1000	20.000
Rotação (rpm)	6000	10000	14.000
Tempo (min)	10	20	30

4.3.2 - Caracterização físico-química

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao tamanho e índice de polidispersidade e carga superficial (potencial zeta) por espalhamento dinâmico de luz. A eficiência de encapsulação foi executada empregando ultracentrifugação e o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria de absorção na região do UV-Visível. A calorimetria diferencial de varredura foi empregada para avaliar a cristalinidade dos lipídios e as modificações com e sem o extrato. A morfologia das partículas obtidas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MARTINS, 2007).

4.3.3 - Desenvolvimento dos lipossomas híbridos

As nanoformulações de lipossomas híbridos (LH) incluindo extratos de *Passiflora alata* foram preparadas, a partir da inclusão de DMPC (0,04725g), Tween 20 (0,009625g) e os extratos em distintas concentrações aplicadas, foram adicionados à solução salina

tamponada com fosfato (PBS), e emulsificadas no Ultra-turrax® a 6.000 RPM durante 30 minutos. As soluções das amostras foram esterilizadas usando membrana filtro com tamanho de poro de 400 nm (KADOTA et al., 2004).

4.3.4 - Preparação das amostras para caracterização morfológica

Os lipossomas estruturados (em membranas com poros de 400 nm de diâmetros) foram corados com ácido fosfotúngstico 1% (m/v) em água (NEW, 1990; MARTINS, 2007). Foi adicionada 0,5 mL da suspensão lipossomal em uma grade de cobre coberta com filme polimérico (parlódio) e carbono, permanecendo por 3 min para fixação das vesículas no filme. Um pedaço de papel filtro foi encostado levemente na amostra para retirar seu excesso. Adicionou-se 1 gota de ácido fosfotúngstico e esperou-se mais 3 min. Após esse tempo. A amostra foi cuidadosamente seca com papel de filtro e, após 20 min, a amostra seca foi visualizada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) (MARTINS, 2007).

4.4 - ESTUDO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo*

4.4.1 - Manutenção do tumor sarcoma 180

Inicialmente, foram inoculadas na região intraperitoneal do animal de manutenção 0,5 mL de uma suspensão contendo 2×10^6 células de sarcoma 180, doadas pelo Laboratório de Oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. Após 10 dias da incubação, o animal foi submetido ao procedimento anestésico inalatório e eutanasiado por meio de deslocamento cervical. Após o procedimento asséptico com álcool iodado e coleta do líquido ascítico da cavidade abdominal, foi preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal. Este procedimento foi realizado a cada 15 dias para manutenção do sarcoma 180 em camundongos.

4.4.2 - Animais

Para avaliação da atividade antitumoral do extrato de *P. alata* encapsulado em lipossoma foram utilizados camundongos Swiss, com peso de 25 a 30g, machos, adultos,

jovens, saudáveis e que não tenham sido anteriormente submetidos a processos experimentais.

Os animais foram alojados dentro de caixas de polipropileno (48.7 cm de comprimento, 33.1 cm largura e 21.4 cm altura) com grades metálicas apropriada em pequenos grupos de 10 camundongos do mesmo sexo. A temperatura do local mantida de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e a umidade relativa de 30 a 70%. Sob iluminação artificial, com uma alternância de 12h de luz e 12h de obscuridade. Os animais tinham livre acesso a alimentação e água.

O número de animais utilizados foi reduzido ao mínimo cientificamente aceitável. No início do estudo, a variação de massa dos animais foi a mínima possível, não excedendo $\pm 20\%$ da massa média.

Após a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela), eutanasiados por deslocamento cervical, e mantidos congelados em freezer após a coleta do material biológico.

4.4.3 – Procedimento

Nesse experimento, os animais foram inoculados com tumor sarcoma 180 (2×10^6 células/0,5 mL/camundongo) por via subcutânea na região axilar (BEZERRA, et al. 2006). Para avaliar o efeito do extrato de *P. alata* encapsulado em lipossoma sobre o crescimento tumoral, um dia após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento (por via intraperitoneal ou oral) por 7 dias consecutivos. Um dia após o término do tratamento os animais foram eutanasiados, sendo em seguida retirados os tumores para pesagem. O percentual de Inibição do crescimento Tumoral (IT) foi calculado pela fórmula: $\text{IT} (\%) = [(A-B)/A] \times 100$ onde A = média dos pesos do tumor no grupo controle e B = peso do tumor nos animais tratados.

Os animais foram submetidos à anestesia transitória com isoflurano (1,5%; via inalatória), por meio de vaporizador calibrado acoplado a cilindro de gás oxigênio em ambiente com exaustão (capela), no momento da coleta de sangue para a análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Após a coleta de sangue, com os animais anestesiados, estes foram eutanasiados por deslocamento cervical. Foram utilizados 10 animais por grupo. Aproximadamente 80 animais foram utilizados neste ensaio.

Tabela 3- detalhamento dos grupos por via IP e oral:

Via parenteral (Intraperitoneal)
Grupo I – Controle positivo - 5-Fluouracil 25 mg/kg
Grupo II – Controle negativo – DMPC
Grupo III – extrato de <i>P. alata</i> encapsulado em lipossoma (Concentração 5 mg/ml)
Grupo IV – extrato de <i>P. alata</i> encapsulado em lipossoma (Concentração 10 mg/ml)
Via Oral (Gavagem)
Grupo I – Controle positivo – Ciclofosfamida 15 mg/kg
Grupo II – Controle negativo – DMPC
Grupo III – extrato de <i>P. alata</i> encapsulado em lipossoma (Concentração 10 mg/ml)
Grupo IV – extrato de <i>P. alata</i> encapsulado em lipossoma (Concentração 20 mg/ml)

4.5 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

4.5.1 - Parâmetros bioquímicos

A coleta das amostras foi realizada no mesmo dia, minimizando a imprecisão analítica. As amostras foram manejadas de maneira idêntica e analisadas usando técnicas iguais. Foram efetuadas determinações bioquímicas por meio da amostra obtida pelo plexo orbital, destinadas a investigar as funções renais e hepáticas. Os testes realizados para avaliação hepática serão a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e para avaliação renal, ureia e creatinina. As análises foram realizadas através do sangue coletado via plexo orbital com auxílio de cânula heparinizada, 24 horas após o último dia de tratamento dos animais com tumor sarcoma 180. As amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos com 3500 rotação por minuto (rpm) a 25 °C para obtenção do plasma e o procedimento dos exames realizado utilizando metodologias descritas pelo fabricante dos kits da bio-técnica.

4.5.2 - Parâmetros hematológicos

Foram coletadas amostras sanguíneas, por meio do plexo orbital sob efeito anestésico, e utilizados capilares internamente revestidos com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra até o tubo coletor, preservando a integridade da mesma. Foram coletadas amostras de 0,5 µl em tubos coletores contendo EDTA de recém-nascidos, uma vez que a quantidade sanguínea se apresenta limitada por se tratar de camundongos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram contagem de leucócitos totais e a diferencial, tais como os linfócitos (%), granulócitos (%) e monócitos (%).

O exame hematológico foi realizado no Laboratório Central da Universidade Tiradentes, através de automação, com o aparelho Pentra 80. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através de esfregaço sanguíneo previamente elaborado com as amostras frescas, através de uma gota do sangue total pingada em lâmina limpa de vidro, com borda fosca e identificada para a preparação do esfregaço. Após esfregaço pronto, as lâminas estendidas foram coradas com corantes panóticos, e realizada a contagem diferencial em 100 células utilizando o microscópio de luz.

4.5.3 - Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos sob a forma de média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e submetidos a análise de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Médias obtidas a partir de dados com distribuição gaussiana foram comparadas entre si por meio de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Médias obtidas a partir de dados com distribuição não gaussiana foram comparadas entre si por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando o programa Prisma versão 8.0 (*GraphPad Software*). Diferenças entre médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 - Otimização usando a função de desejabilidade

Na etapa de otimização foram realizados estudos com o objetivo de se obter as melhores condições para o método proposto. Assim, estudou-se os seguintes fatores para

a otimização do sistema: concentração do extrato hidroetanólico, rotação e tempo. Para realizar a otimização multiresposta do desenvolvimento do lipossoma híbrido contendo extrato hidroetanólico de *P. alata* foi utilizada uma ferramenta matemático-estatística, que se baseia no emprego de uma função de desejabilidade. Esta função permite combinar em uma única resposta (a desejabilidade global) as três respostas particulares de interesse. A desejabilidade global pode variar de 0 a 1 (KHODADOUST e HADJMOHAMMADI, 2011). Desta forma, quanto mais próximo de 1 for o valor obtido, mais próximo estarão os valores ótimos relacionados a cada resposta individual.

Os níveis selecionados para os fatores e a matriz requerida para os experimentos junto aos resultados obtidos, expressos como tamanho de partícula (nm) e polidispersibilidade (PDI) encontram-se na Tabela 4. A esse planejamento foram adicionados mais 3 pontos centrais, resultando em um planejamento com 11 experimentos.

Tabela 4- Matriz e resultados do planejamento fatorial para determinação do tamanho de partícula e polidispersibilidade do lipossoma híbrido contendo extrato de *P. alata*.

Ensaio	Concentração do extrato (µg/mL)	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Tamanho (nm)	PDI	d1	d2	D
1	-1	-1	-1	284.1	0.304	0.00	0.11	0.00
2	1	-1	-1	115.8	0.248	0.76	0.62	0.69
3	-1	1	-1	149.2	0.274	0.61	0.39	0.49
4	1	1	-1	186.3	0.316	0.44	0.00	0.00
5	-1	-1	1	96.78	0.207	0.85	1.00	0.92
6	1	-1	1	254.2	0.246	0.14	0.64	0.30
7	-1	1	1	228.5	0.242	0.25	0.68	0.41
8	1	1	1	63.67	0.261	1.00	0.50	0.71
9	0	0	0	170.4	0.298	0.52	0.17	0.29
10	0	0	0	166.6	0.301	0.53	0.14	0.27
11	0	0	0	178.6	0.305	0.48	0.10	0.22

d1: desejabilidade individual para o tempo

d2: desejabilidade individual para PDI

D: desejabilidade global

Na Tabela 4 há uma nítida indicação da melhor eficiência para o sistema no ensaio 5 que corresponde aos valores mais baixos (nível inferior) para concentração do extrato e rotação, e nível mais alto para o tempo. Além disso, os números de desejabilidade global do sistema, mostrou que há dentro do domínio experimental estudado condições onde se pode obter a máxima resposta do sistema para esse domínio, com uma desejabilidade global de 0,92. Os valores utilizados como otimizados foram concentração do extrato de 500 µg/mL, 6000 rpm e 30 min.

Os tamanhos das partículas foram dimensionados para finalização de nanocarreadores mais homogêneos em sua desejabilidade global, a variação de tamanho pode mudar dependendo do método empregado, até mesmo com a escolha do filtro de finalização das partículas. Contudo, é necessário que ensaios prévios sejam elaborados para evitar que haja uma discrepância significativa no tamanho das nanopartículas formuladas. Quando pensamos em nanocarreadores criados para terapia oncológica, estes devem ter tamanho padrão, para que estas nanodroga cheguem aos micros vasos criados de forma irregular pelo processo de angiogênese tumoral. Não é uma tarefa fácil, mas estudos estão cada vez mais elaborados para alcançar esses níveis de eficiência.

5.2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo*

5.2.1 - Valores para massa tumoral e inibição celular por via i.p.

O crescimento tumoral foi observado em todos os grupos no 8º dia após administração dos tratamentos por via i.p., com uma massa tumoral média de $1,58 \pm 0,15$ g para grupo controle negativo DMPC e $0,26 \pm 0,04$ g para o grupo tratado com 5-FU 25 mg/kg/dia. Nos grupos tratados com LHPA, a massa tumoral média foi de $0,54 \pm 0,05$ g, e $0,28 \pm 0,03$ g para as doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. Houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da massa dos tumores de animais tratados com 5-fluorouracil 25 mg/kg/dia e com LHPA nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia quando comparado com grupo controle. Os dois grupos tratados com LHPA apresentaram alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$), quando comparadas a grupo controle positivo (Figura 3).

A atividade antitumoral do LHPA foi determinada através da utilização do tumor experimental sarcoma 180 (S180). Foi observado que o LHPA, após administração por via i.p., inibiu o crescimento tumoral em 68,08 e 83,44% nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia,

respectivamente. O 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia, utilizado como controle positivo, inibiu o crescimento tumoral em 84,59%. O grupo tratado com DMPC, utilizado como controle negativo, foi considerado com inibição igual a 0 (Figura 3).

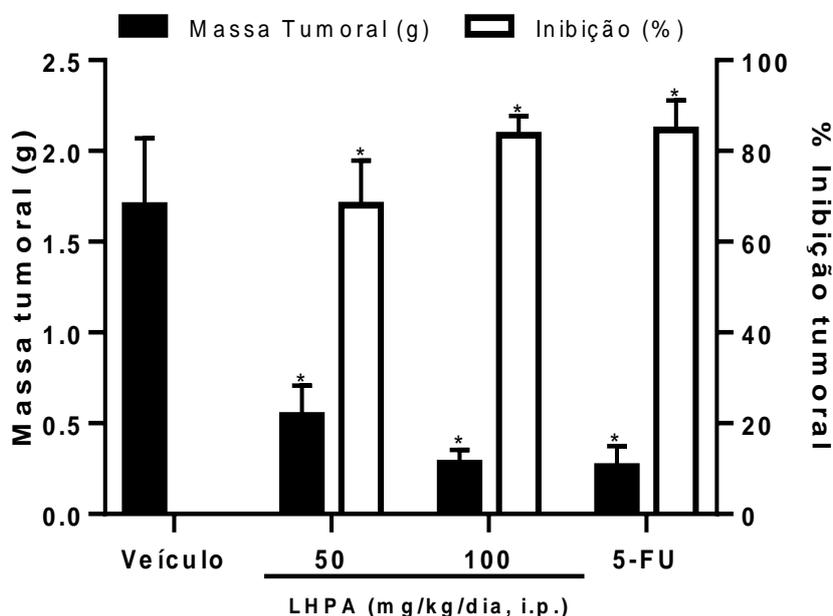


Figura 3- Valores de massa (g) e inibição tumoral em camundongos Swiis tratados com lipossomas híbridos de *Passiflora alata* (LHPA), frente ao modelo S180 por via i.p. Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média ($n = 10$ animais/grupo) e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Kruskal-Wallis*, seguido de teste de comparações múltiplas de *Dun*. * $p < 0,05$ comparado com o grupo de lipossomas vazios (DMPC).

A Figura 4 mostra o grupo controle que não recebeu tratamento, onde foi utilizado os lipossomas vazios para avaliar se obteria algum grau de inibição tumoral, contudo este grupo obteve média de inibição igual a zero (Figura 3), na imagem é possível observar macroscopicamente a massa tumoral com aumento expressivo na região axilar do membro esquerdo do animal. Contudo na Figura 5, temos o grupo LHPA tratado na dose de 100mg/kg/dia, por sete dias consecutivos, macroscopicamente não é possível visualizar massa tumoral na região axilar, em membro anterior esquerdo dos animais, o que evidencia um grau importante de inibição do tumor sólido S180, quando comparado ao grupo controle negativo.

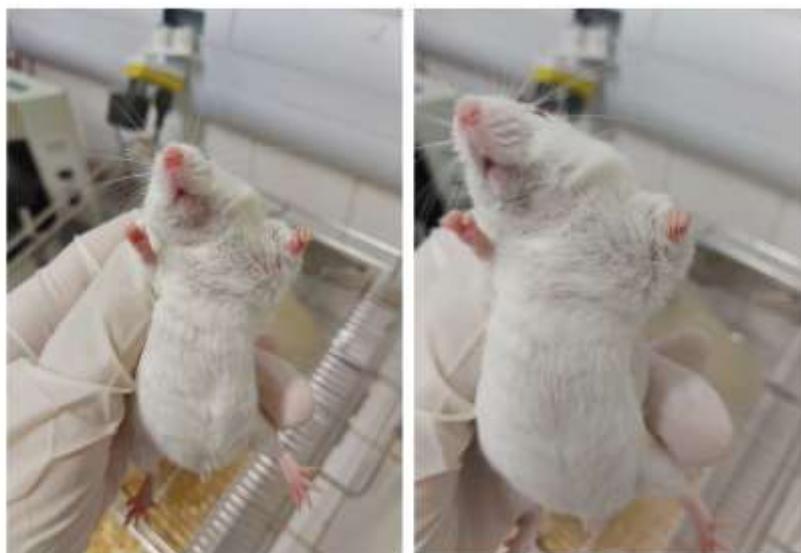


Figura 4 – Grupo controle negativo (DMPC), animal portador de tumor sólido na região axilar (membro esquerdo anterior), instituído tratamento com nanopartículas lipídicas (lipossomas) vazios, sem extrato de *Passiflora alata* no 8º dia após administração dos tratamentos por via i.p (FONTE: dados da pesquisa).



Figura 5 – Grupo LHPA 100 mg/kg/dia, animal portador de tumor sólido na região axilar (membro esquerdo anterior), instituído tratamento com lipossomas de *Passiflora alata* no 8º dia após administração dos tratamentos por via i.p (FONTE: dados da pesquisa).

5.3 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM ANIMAIS TRATADOS POR VIA (IP)

5.3.1 - Testes hematológicos (Hemograma)

A variação hematológica da série vermelha foi avaliada em variações aleatórias em torno dos níveis homeostáticos do grupo controle negativo. Usando como referência o grupo controle negativo, cuja contagem de hemácias apresentou concentração sérica de

8,70 ± 0,85 (10⁶/mL), os grupos tratados com LHPA, nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia apresentaram média de concentrações plasmáticas igual 9,26 ± 0,71 (10⁶/mL) e 8,81 ± 0,78 (10⁶/mL), respectivamente. O grupo controle positivo tratado com 5-FU apresentou concentrações de 10,90 ± 0,58 (10⁶/mL), não havendo valores significativos comparado ao grupo controle negativo, e aos grupos tratados com LHPA (tabela 5).

Tabela 5. Resultados dos Lipossomas híbridos de *Passiflora alata* (LHPA) na avaliação dos parâmetros do hemograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor S180.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Hemácias (10 ⁶ /mL)	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas (10 ⁹)
Animal com tumor				
DMPC	-	8,70 ± 0,85	14,28 ± 1,37	1090 ± 302,9*
LHPA	50	9,26 ± 0,71	13,82 ± 0,58	1054 ± 282,9
LHPA	100	8,81 ± 0,78	13,82 ± 0,58	1067 ± 292,2
5-FU	25	10,90 ± 0,58	14,32 ± 1,12	295,7 ± 74,71*

Tabela 5 - Os dados são apresentados como a média ± o erro padrão da média de 10 animais. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de *Student Newman Keuls*. DMPC foi usado como controle negativo e 5-FU como controle positivo por via i.p. **p* < 0,05 comparado com o grupo DMPC.

A média apresentada pelo grupo DMPC na concentração de hemoglobina foi de 14,28 ± 1,37 (g/dL), e a dos grupos LHPA 50 e 100 mg/kg foram de 13,82 ± 0,58 e 13,82 ± 0,58 (g/dL), respectivamente. O grupo 5-FU apresentou média de 14,32 ± 1,12 (g/dL). Em relação as concentrações plaquetárias, o grupo controle negativo apresentou concentração sérica de 1090 ± 302,9 (10⁹), e os grupos LHPA 50 e 100 mg/kg estabeleceram média de 1054 ± 282,9 e 1067 ± 292,2 (10⁹), nesta ordem. O grupo 5-FU apresentou números expressivamente baixos de plaquetas, com média de 295,7 ± 74,71(10⁹), quando comparado aos demais grupos tratados.

5.3.2 - Testes hematológicos (Leucograma)

Para análise de variação hematológica, foram avaliados os níveis das células da série branca e da série vermelha, em variações aleatórias em torno dos níveis homeostáticos. Usando como referência o grupo controle negativo, em que o na contagem de leucócitos totais apresentou concentração sérica média de 10,58 ± 1,98 (10³ cels/μL),

mostrando mínima diferença em relação aos grupos tratados com LHPA, na dose de 50 e 100 mg/kg/dia apresentaram média de concentrações plasmáticas igual a $9,20 \pm 1,31$ e $10,74 \pm 1,58$ (10^3 cels/ μ L), respectivamente. O grupo controle positivo tratado com 5-FU apresentou concentração de $2,88 \pm 0,87$ (10^3 cels/ μ L), evidenciando uma diminuição significativa comparado ao grupo controle negativo, e aos grupos LHPA (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados dos Lipossomas híbridos de *Passiflora alata* (LHPA) sobre os parâmetros hematológicos no leucograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor S180.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Leucócitos Totais (10^3 cels/ μ L)	Contagem diferencial de Leucócitos (%)		
			Linfócitos	Monócitos	Granulócitos
Animal c/ tumor					
DMPC	-	$10,58 \pm 1,98^*$	$51,03 \pm 5,52$	$4,43 \pm 0,46$	$44,35 \pm 5,13$
LHPA	50	$9,20 \pm 1,31\#$	$54,06 \pm 5,39$	$6,39 \pm 1,02$	$33,15 \pm 3,14$
LHPA	100	$10,74 \pm 1,58\#$	$52,23 \pm 2,58$	$5,20 \pm 0,27$	$42,58 \pm 2,48$
5-FU	25	$2,88 \pm 0,87^*$	$65,38 \pm 10,32$	$5,48 \pm 1,96$	$29,13 \pm 8,36$

Tabela 6 - Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 10 animais. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de *Student Newman Keuls*. DMPC foi usado como controle negativo e 5-FU como controle positivo. $*p < 0,05$ comparado com o grupo DMPC. $\#p < 0,05$ comparado com o grupo 5-FU.

A contagem diferencial de leucócitos em relação aos linfócitos no grupo controle negativo (DMPC) apresentou média percentual de $51,03 \pm 5,52$ %, quando comparado aos grupos LHPA tratados nas doses de 50 e 100mg/kg, cujo valores foram de $54,06 \pm 5,39$ % e $52,23 \pm 2,58$ %, nesta ordem, não apresentando diferenças percentuais significativas. Os valores de linfócitos do grupo controle positivo, apresentou um percentual superior aos demais grupos $65,38 \pm 10,32$ % (Tabela 6).

Na contagem diferencial de monócitos o grupo DMPC apresentou média percentual de $4,43 \pm 0,46$ e os grupos LHPA 50 e 100 mg/kg, expressaram médias de $6,39 \pm 1,02$ e $5,20 \pm 0,27$, respectivamente. A média para monócitos no grupo 5-FU foi de $5,48 \pm 1,96$. Para os valores de granulócitos no grupo DMPC a média percentual foi de $44,35 \pm 5,13$, nos grupos LHPA 50 e 100 mg/kg as médias foram de $33,15 \pm 3,14$ e $42,58 \pm 2,48$, nessa ordem. O grupo 5-FU apresentou média de granulócitos inferior quando comparado aos demais grupos tratados $29,13 \pm 8,36$ (Tabela 6).

5.3.3 - Exames bioquímicos

Para análise de variação biológica intrínseca, foram avaliados os níveis das substâncias (enzimas e soluto natural), em variações aleatórias em torno dos níveis homeostáticos. Usando como referência o grupo controle negativo, a enzima ALT apresentou concentração sérica de $69,67 \pm 18,47$ (U/L), mostrando um aumento gradativo em relação aos grupos tratados com LHPA, onde os animais tratados na dose de 50 mg/kg/dia apresentaram média de concentrações plasmáticas igual a $115,40 \pm 21,21$ (U/L) e a dose de 100 mg/kg/dia apresentou concentrações séricas de $112,60 \pm 21,96$ (U/L). O grupo controle positivo tratado com 5-FU apresentou concentrações de $101,70 \pm 20,31$ (U/L), evidenciando seu aumento significativo comparado ao grupo controle negativo (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros bioquímicos das enzimas ALT/AST e concentrações plasmáticas de ureia e creatinina de camundongos machos da linhagem Swiss portadores do tumor S180, tratados com nanopartículas de LHPA.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	ALT (U/L)	AST (U/L)	URÉIA (mg/dL)	CRETININA (mg/dL)
Animais com S180					
DMPC	-	$69,67 \pm 18,47^*$	$257,50 \pm 39,72$	$25,85 \pm 1,31^*$	$0,19 \pm 0,04^*$
LHPA	50	$115,40 \pm 21,21^*$	$384,40 \pm 31,14$	$35,53 \pm 1,28^*$	$0,31 \pm 0,00^*$
LHPA	100	$112,60 \pm 21,96^*$	$434,50 \pm 49,38$	$40,48 \pm 2,93^*$	$0,31 \pm 0,01$
5-FU	25	$101,70 \pm 20,31^*$	$334,50 \pm 50,41$	$32,50 \pm 2,41$	$0,33 \pm 0,05^*$

Tabela 7: Controle positivo o quimioterápico 5-Fluoracil e controle negativo DMPC. * $p < 0,05$ comparado com o grupo DMPC.

Os valores de AST no grupo DMPC apresentou concentração média de $257,50 \pm 39,72$ (U/L), e os grupos LHPA 50 e 100mg/kg exibiram médias de $384,40 \pm 31,14$ e $434,50 \pm 49,38$ (U/L), nesta ordem. O grupo 5-FU expressou concentração de $334,50 \pm 50,41$ (U/L). Para as concentrações plasmáticas de uréia, o grupo controle negativo mostrou média de $25,85 \pm 1,31$ (mg/dL), e os grupos LHPA 50 e 100mg/kg apresentaram médias de $35,53 \pm 1,28$ e $40,48 \pm 2,93$ (mg/dL), respectivamente. O grupo controle positivo obteve concentração sérica de $32,50 \pm 2,41$ (mg/dL). Para os valores de creatinina o grupo DMPC teve concentração de $0,19 \pm 0,04$ (mg/dL), evidenciando um

aumento gradativo quando levado em consideração os demais grupos, em que o grupo LHPA 50mg/kg teve média de $0,31 \pm 0,00$ (mg/dL) e o grupo LHPA 100 mg/kg média de $0,31 \pm 0,01$ (mg/dL). O grupo 5-FU apresentou concentração de $0,33 \pm 0,05$ (mg/dL), elevada quando comparada ao grupo controle negativo.

5.4 - VALORES PARA INIBIÇÃO CELULAR E MASSA TUMORAL POR VIA ORAL

A atividade antitumoral do LHPA também foi analisada após administração por via oral frente ao modelo S180. O crescimento tumoral foi observado em todos os grupos no 8º dia após administração de tratamentos por via oral, com uma massa tumoral média de $2,64 \pm 0,07$ g para grupo DMPC (controle negativo) e $0,60 \pm 0,07$ g para o grupo tratado com ciclofosfamida 15 mg/kg/dia (controle positivo). Nos grupos tratados com LHPA por via oral, a massa tumoral média foi de $1,18 \pm 0,05$ g e $0,90 \pm 0,05$ g para as doses de 100 e 200 mg/kg/dia, respectivamente. Evidenciando redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da massa dos tumores de animais tratados com LHPA em ambas doses quando comparado ao grupo DMPC. Da mesma forma, os dois grupos tratados com LHPA apresentaram alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$), quando comparadas a grupo controle positivo (Figura 7). Assim, os resultados mostram que o LHPA nas doses testadas tem atividade antitumoral frente ao modelo S180 por via oral.

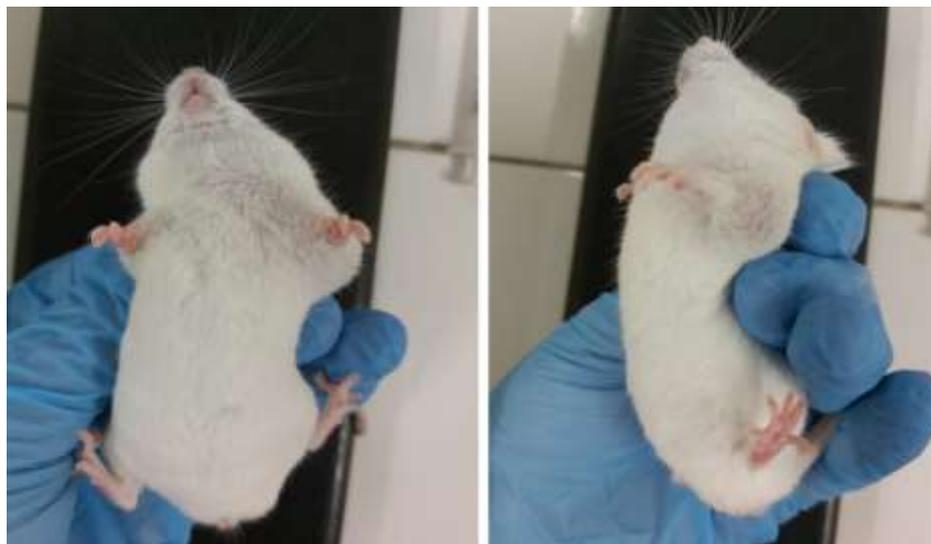


Figura 6– Grupo controle negativo (DMPC), animal portador de tumor sólido na região axilar (membro esquerdo anterior), instituído tratamento com nanopartículas lipídicas (lipossomas) vazios, sem extrato de *Passiflora alata* no 8º dia após administração dos tratamentos por via oral (FONTE: dados da pesquisa).

Os testes mostraram ainda, que o LHPA nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia apresentou percentual de inibição de 55,15 e 65,85%, respectivamente. A ciclofosfamida (15 mg/kg/dia), utilizada como controle positivo, inibiu o crescimento tumoral em 77,20%. O grupo tratado com DMPC por via oral foi utilizado como controle negativo e considerado com inibição igual a 0 (Figura 7).

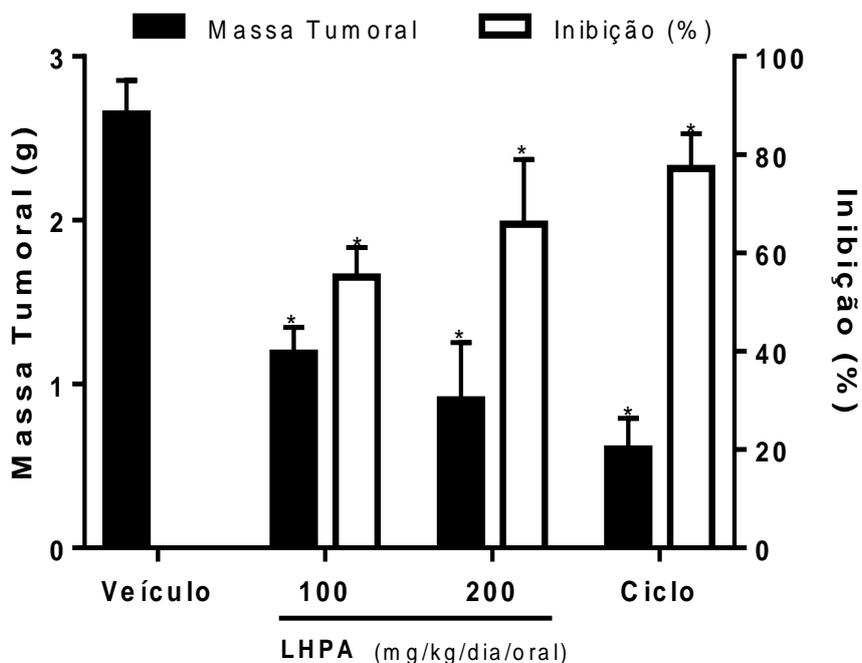


Figura 7 – Atividade do LHPA em camundongos inoculados com células do tumor Sarcoma 180. O gráfico apresenta a massa tumoral em gramas (g) e nível de inibição de crescimento (%). Os animais foram tratados por v.o., iniciando um dia após a implantação do tumor, por 7 dias consecutivos. DMPC foi usado como controle negativo. Ciclofosfamida 15 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 10 animais/grupo) e os resultados avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de *Student Newman Keuls*. * $p < 0,05$ comparado com o grupo DMPC.



Figura 9 – Grupo LHPA 200 mg/kg/dia, portador de tumor sólido na região axilar (membro esquerdo anterior), instituído tratamento com lipossomas de *Passiflora alata* no 8º dia após administração dos tratamentos por via i.p (FONTE: dados da pesquisa).

5.5 - PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS TRATADOS POR V.O

5.5.1 - Testes hematológicos (Hemograma)

Para análise de variação hematológica por via oral, foram avaliados os níveis das células da série branca e da série vermelha dos quatro grupos, com variações aleatórias em torno dos níveis homeostáticos. O grupo controle negativo, usado como referência, apresentou concentração sérica de hemácias $8,57 \pm 0,34$ ($10^6/\text{mL}$), e os animais tratados com LHPA nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia apresentaram médias de concentrações plasmáticas igual $7,37 \pm 0,07$ e $8,43 \pm 0,20$ ($10^6/\text{mL}$), respectivamente. O grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida apresentou concentração de $7,39 \pm 0,58$ ($10^6/\text{mL}$) (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados dos Lipossomas híbridos de *Passiflora alata* (LHPA) na avaliação dos parâmetros do hemograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor S180

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Hemácias ($10^6/\text{mL}$)	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas (10^9)
Animal com tumor				
DMPC	-	$8,57 \pm 0,34$	$12,45 \pm 1,44$	$378,50 \pm 98,87^*$
LHPA	100	$7,37 \pm 0,07$	$11,92 \pm 0,12$	$342,30 \pm 31,11$
LHPA	200	$8,43 \pm 0,20$	$13,47 \pm 0,15$	$376,20 \pm 33,02$
CICLO	15	$7,39 \pm 0,58$	$11,54 \pm 0,32$	$177,80 \pm 39,36^*$

Tabela 8 - Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 10 animais. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de *Student Newman Keuls*. DMPC foi usado como controle negativo e ciclofosfamida como controle positivo. $*p < 0,05$ comparado com o grupo DMPC.

A média apresentada pelo grupo DMPC em concentração de hemoglobina foi de $12,45 \pm 1,44$ (g/dL), e a dos grupos LHPA 100 e 200 mg/kg foram de $11,92 \pm 0,12$ e $13,47 \pm 0,15$ (g/dL), respectivamente. O grupo ciclo apresentou média de $11,54 \pm 0,32$ (g/dL). Em relação aos níveis plaquetários, o grupo controle negativo apresentou

concentração sérica de $378,50 \pm 98,87 (10^9)$, e os grupos LHPA 100 e 200 mg/kg média de $342,3 \pm 31,11$ e $376,20 \pm 33,02 (10^9)$, nesta ordem. O grupo controle positivo apresentou números inferiores de plaquetas, com média de $177,80 \pm 39,36 (10^9)$, quando comparado aos demais grupos tratados.

5.5.2 - Testes hematológicos (Leucograma)

O grupo controle negativo, usado como referência apresentou, contagem de leucócitos totais de $6,76 \pm 2,21 (10^3 \text{ cels}/\mu\text{L})$ e o controle positivo de $3,41 \pm 0,80 (10^3 \text{ cels}/\mu\text{L})$. Em relação aos grupos tratados com LHPA, os animais tratados na dose de 100 mg/kg/dia apresentaram média de concentração plasmática igual a $4,13 \pm 0,74 (10^3 \text{ cels}/\mu\text{L})$, e a dose de 200 mg/kg/dia apresentou concentração sérica de $1,61 \pm 0,28 (10^3 \text{ cels}/\mu\text{L})$.

Tabela 9. Resultados dos Lipossomas híbridos de *Passiflora alata* (LHPA) sobre os parâmetros hematológicos no leucograma do sangue periférico de camundongos portadores do tumor Sarcoma 180.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Leucócitos Totais (10^3 cels/ μL)	Contagem diferencial de Leucócitos (%)		
			Linfócitos	Monócitos	Granulócitos
Animal c/ tumor					
DMPC	-	$6,76 \pm 2,21^*$	$69,73 \pm 2,66$	$5,35 \pm 0,65$	$24,92 \pm 2,26$
LHPA	100	$4,13 \pm 0,74$	$65,48 \pm 5,16$	$5,81 \pm 1,80$	$27,53 \pm 4,69$
LHPA	200	$1,61 \pm 0,28^*$	$78,82 \pm 1,91^*$	$3,01 \pm 0,32^*$	$18,45 \pm 1,22$
CICLO	15	$3,41 \pm 0,80$	$67,30 \pm 2,08$	$3,80 \pm 0,24$	$28,90 \pm 1,92$

Tabela 9 - Os dados são apresentados como a média \pm o erro padrão da média de 10 animais. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de *Student Newman Keuls*. DMPC foi usado como controle negativo e ciclofosfamida como controle positivo. $*p < 0,05$ comparado com o grupo DMPC.

A contagem diferencial de leucócitos em relação aos linfócitos no grupo controle negativo (DMPC) apresentou média percentual de $69,73 \pm 2,66$, quando comparado aos grupos LHPA tratados nas doses de 100 e 200mg/kg, cujos valores foram de $65,48 \pm 5,16$ e $78,82 \pm 1,91$, nesta ordem. Os valores de linfócitos do grupo controle positivo, apresentou um percentual de $67,30 \pm 2,08$ (Tabela 9).

Na contagem diferencial de monócitos o grupo DMPC apresentou média percentual de $5,35 \pm 0,65$ e os grupos LHPA 100 e 200 mg/kg, expressaram médias de

5,81 ± 1,80 e 3,01 ± 0,32, respectivamente. A média para monócitos no grupo ciclo foi de 3,80 ± 0,24. Para os valores de granulócitos no grupo DMPC a média percentual foi de 24,92 ± 2,26, nos grupos LHPA de 100 e 200 mg/kg as médias foram de 27,53 ± 4,69 e 18,45 ± 1,22, nessa ordem. O grupo ciclo apresentou média de granulócitos de 28,90 ± 1,92 (Tabela 9).

5.5.3 - Exames bioquímicos

Para análise de variação biológica intrínseca, foram avaliados os níveis das substâncias (enzimas e soluto natural), em variações aleatórias em torno dos níveis homeostáticos por via oral. Usando como referência o grupo controle negativo, a enzima ALT apresentou concentração sérica de 54,83 ± 9,49 (U/L), mostrando um aumento gradativo em relação aos grupos tratados com LHPA, em que os animais tratados na dose de 100 mg/kg/dia apresentaram média de concentrações plasmáticas igual a 56,5 ± 4,25 (U/L) e a dose de 200 mg/kg/dia apresentou concentrações séricas de 91,50 ± 21,13 (U/L). O grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida apresentou concentrações de 59,20 ± 15,42 (U/L) (Tabela 10).

Tabela 10: Parâmetros bioquímicos das enzimas ALT/AST e concentrações plasmáticas de ureia e creatinina de camundongos machos da linhagem Swiss portadores do tumor Sarcoma 180, tratados com nanopartículas de LHPA por via oral.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	ALT (U/L)	AST (U/L)	URÉIA (mg/dL)	CRETININA (mg/dL)
Animais com S180					
DMPC	-	54,83 ± 9,49	108,00 ± 5,59	50,33 ± 3,63	0,38 ± 0,01
LHPA	100	56,5 ± 4,25	180,50 ± 8,59	50,60 ± 2,14	0,33 ± 0,12
LHPA	200	91,50 ± 21,13	190,20 ± 5,73	50,43 ± 4,36	0,40 ± 0,15
CICLO	15	59,20 ± 15,42	193,00 ± 9,14	64,52 ± 5,37	0,31 ± 0,04

Tabela 10: Controle positivo o quimioterápico ciclofosfamida e controle negativo a molécula nanométrica de DMPC.

Os valores de AST no grupo DMPC apresentou concentração média de 108,00 ± 5,59, e os grupos LHPA 100 e 200mg/kg exibiram médias de 180,50 ± 8,59 e 190,20 ± 5,73, nesta ordem. O grupo ciclo expressou concentração sérica de AST de 193,00 ± 9,14. Para as concentrações plasmáticas de uréia, o grupo controle negativo mostrou média de

50,33 ± 3,63, e os grupos LHPA 100 e 200mg/kg apresentaram médias de 50,60 ± 2,14 e 50,43 ± 4,36, respectivamente. O grupo controle positivo obteve concentração sérica de ureia de 64,52 ± 5,37. Nos valores de creatinina o grupo DMPC teve concentração de 0,38 ± 0,01, evidenciando um aumento gradativo quando levado em consideração os demais grupos, LHPA 100 e 200 mg/kg/dia, cujas médias foram de 0,33 ± 0,12 e 0,40 ± 0,15, respectivamente. O grupo ciclo apresentou concentração de 0,31 ± 0,04, inferior quando comparada ao grupo controle negativo.

6- DISCUSSÃO

O câncer ainda é uma grande ameaça à saúde humana. A quimioterapia convencional como o principal método para o tratamento do câncer não obteve nenhum progresso significativo nos últimos 30 anos. Um dos desafios bem conhecidos é a falta de acúmulo seletivo nas células cancerosas, levando a danos consideráveis aos tecidos normais. Outra razão é o surgimento de resistência a múltiplas drogas (MDR), que ocorreu em mais de 50% dos casos e tem sido um grande obstáculo para o sucesso da quimioterapia (LEI et al., 2019). As nanodrogas vieram para mudar este cenário, mostrando-se cada vez mais seguras e eficazes, dentre elas, os lipossomas se destacam há muitos anos (1965-1995) sendo incansavelmente estudados, alguns já sendo empregados na terapia direcionada do câncer (LI, et al. 2017).

Fosfolipídios (fosfatidilcolinas, geralmente chamadas de "lecitinas") são os principais constituintes dos lipossomas. Devido às suas propriedades anfipáticas, eles prontamente formam bicamadas concêntricas (também inicialmente chamadas de "bangossomos" por A.D. Bangham). Existem vários protocolos e técnicas disponíveis para converter essas dispersões lipídicas multilamelares em estruturas de bicamada única (chamadas de lipossomas unilamelares ou vesículas). Os métodos de laboratório mais comumente usados incluem sonicação, extrusão, evaporação de fase reversa e injeção de solvente (PURI et al, 2009).

O método aplicado para a caracterização dos lipossomas híbridos de *Passiflora alata*, conseguiu mostrar resultados satisfatórios diante de duas vias de administração testadas, onde a via intraperitoneal consegue driblar os mecanismos farmacocinéticos de primeira passagem e a via oral precisa ser estabelecida através dos mecanismos de metabolização hepática. De acordo com Rezaeian et al (2019), uma das considerações mais importantes é melhorar a eficiência da quimioterapia intraperitoneal (IPC). Embora um medicamento que entrou na circulação possa ter poucos efeitos terapêuticos

secundários, o efeito sistêmico do medicamento deve ser baixo o suficiente para minimizar seus efeitos colaterais.

Além disso, a fisiopatologia específica do tumor, incluindo a densidade da matriz extracelular (ECM), a falta de um sistema linfático eficaz, uma microvasculatura com vazamento e espacialmente heterogênea, leva a uma alta pressão intersticial no ambiente tumoral, seguida por um fluxo para fora da periferia do tumor, os quais inibem a penetração efetiva da droga no interior do tumor. A baixa profundidade de penetração da droga no tumor é um dos principais pontos fracos do IPC (REZAEIAN et al., 2019).

Contudo a utilização de nanopartículas, consegue minimizar os contratempos elaborados por esta via. Os lipossomas são transportadores de drogas usados para melhorar a administração de drogas e reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia, liberando sua carga de uma maneira pré-projetada e controlável (ZHAN e WANG, 2018; REZAEIAN et al., 2019). Embora nenhum relatório esteja disponível sobre tal sistema de entrega de drogas em administração i.p., o emprego de doxorubicina lipossomal com liberação passiva em IPC foi relatado em uma série de estudos, mostrando que via pode ser opção para quimioterapia, através do sistema de entrega lipossomal.

Os resultados indicam que o uso de lipossomas aumenta a concentração do fármaco no local do tumor. Além disso, os lipossomas de tamanho maior resultam na eliminação mais lenta da cavidade abdominal, uma vez que podem entrar na corrente sanguínea através dos nódulos linfáticos (REZAEIAN et al., 2019; SUGARBAKER e STUART, 2019). O LHPA mostrou que consegue alcançar a via sistêmica para chegar ao efeito final desejado, e, desta forma, está a formulação lipossomal demonstra uma promissora estratégia para terapia oncológica.

As formulações que atendem aos padrões regulatórios da Food and Drug Administration (FDA), exigem a consideração de parâmetros importantes, incluindo seu tamanho, estabilidade em circulação, variações de lote para lote, eficiência de carregamento de medicamento, etc. Além dessas características, a capacidade dos lipossomas de desestabilizar suas membranas para distribuição localizada de fármacos (lipossomas acionáveis) é outro aspecto altamente crucial para melhorar a eficácia de fármacos e produtos farmacêuticos aprisionados em lipossomas (PURI et al, 2009).

O LHPA, após administração por via i.p., inibiu o crescimento tumoral em 68,08 e 83,44% nas doses de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente. Nas análises múltiplas de comparação os resultados empregados para o LHPA foram significativos em ambas as doses utilizadas por via i.p., quando comparadas ao grupo controle negativo. Enquanto 5-

FU inibiu 84,59%, o LHPA na dose de 100 mg/kg/dia inibiu 83,44%. Os valores de inibição mostram a eficácia da formulação com extrato, quando comparada a formulação sem a *Passiflora alata*, demonstrando a eficiência da nanodroga em valores de inibição superiores a 80%.

Um estudo feito por Amaral (2018), mostrou que o extrato das folhas de *P. alata* (EFPA) livre, não apresentou atividade antimoral por via oral. O estudo foi realizado com grupos em distintas doses, onde o EFPA nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg/dia apresentou, percentual de inibição de 0, 9,36 e 15,96%, respectivamente. A ciclofosfamida (15 mg/kg/dia), utilizada como controle positivo, inibiu o crescimento tumoral em 70,82%. O grupo tratado com salina por via oral foi utilizado como controle negativo e considerado com inibição igual a 0.

Considerando então, o extrato formulado a base de lipossomas híbridos, foi possível evidenciar atividade antitumoral eficaz (Figura 8), quando comparado a sua fórmula livre por via oral. Uma abordagem para melhorar a eficácia do medicamento é utilizar a nanotecnologia (nm de tamanho) para melhorar a farmacocinética e reduzir os efeitos colaterais associados aos medicamentos (TRAN et al, 2009). Esses envelopes aumentam a circulação dos medicamentos no corpo e permitem a liberação controlada. Os lipídios podem ser selecionados para formulações lipossomais que aumentam essas propriedades. Lipídeos auxiliares, como 1,2- Dioleoil- *sn* -Glicero-3-Fosfoetanolamina (DOPE) e colesterol são frequentemente adicionados para aumentar a estabilidade, auxiliar a formulação de lipossomas e aumentar a absorção celular (TRAN et al, 2009).

Embora o campo de entrega de drogas em lipossomas tenha feito avanços na superação de armadilhas cruciais (tais como taxas de depuração, estabilidade *in vivo*, etc.), espera-se que a droga distribuível geral por esses nanocarreadores aumente significativamente ao projetar modalidades para liberar drogas em um espaço definido e tempo em uma área localizada (como o local de um tumor). Pode-se imaginar que o desenvolvimento estratégico de nanocarreadores carregados de drogas ajustados para desencadear a liberação de drogas melhoraria significativamente a eficácia de drogas e produtos farmacêuticos, eliminando potencialmente os problemas de resistência aos medicamentos. Têm sido desenvolvidas várias modalidades de desencadeamento para liberação específica de local de drogas de lipossomas (ANDRESEN, 2005; PONCE, 2006; TRAN, 2009).

Dentro dos parâmetros toxicológicos avaliados por via i.p, os resultados obtidos através da série vermelha, não obtiveram alterações significativas ($p > 0,05$) em nenhum dos grupos comparados para os resultados do hemograma. O que torna possível afirmar a inexistência de atividade hemolítica com o uso do LHPA. Entretanto, a série branca apresentou diferença significativa nos valores de leucócitos no leucograma de animais tratados com 5-FU comparado com o controle negativo e entre os tratamentos LHPA quando comparados ao 5-FU. A série branca apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de leucócitos quando comparado o grupo DMPC ($10,58 \pm 1,98$) com grupo 5-FU ($2,88 \pm 0,87$), também houve diferenças significativas entre os grupos tratamentos LHPA 50 mg/kg ($9,20 \pm 1,31$) e 100 mg/kg ($10,74 \pm 1,58$) quando comparados ao grupo 5-FU ($2,88 \pm 0,87$).

Tais achados conseguem evidenciar a possível imunossupressão causada pelos quimioterápicos, quando comparado o número de leucócitos do grupo tratado com 5-FU, com o grupo tratado com LHPA. O 5-FU influencia no aparecimento de infecções, devido à imunossupressão causada pela Fluoruracila (JESUS,2016), este é um fármaco de alta toxicidade com uma pequena margem de segurança.

Segundo Machado et al. (2018) durante o tratamento com 5-FU, o acompanhamento laboratorial deve ser feito, relativo a contagens de células da série branca do sangue. Estas contagens devem ser feitas diariamente durante o tratamento, e este deve ser imediatamente interrompido se as contagens de leucócitos atingirem um nível abaixo de $3500 \text{ células/mm}^3$, ou se a contagem plaquetária atingir um nível abaixo de $100.000 \text{ células/mm}^3$. Neste trabalho o grupo controle tratado com 5-FU mostrou níveis baixos de células de defesa, assim como número de plaquetas apresentaram expressiva queda durante o tratamento, quando comparado ao grupo controle negativo e os grupos tratados com LHPA (Tabela 5). As demais células avaliadas não apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$), em comparação aos demais grupos.

O 5-fluoracil é um pró-fármaco convertido ao metabólito ativo, ou seja, necessita de ativação microssomal hepática, atua impedindo a síntese das timinas, e conseqüentemente do DNA, interferindo também no processamento do RNA. Trabalhos mostram que os sintomas de toxicidade do 5-FU incluem estomatite, leucopenia, anemia, trombocitopenia, perda de peso substancial, ataxia cerebelar e outros sintomas neurológicos que podem evoluir para semicoma (MACHADO et al, 2018).

A enzima AST apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado com LHPA 100mg/kg ($434,50 \pm 49,38$) quando comparado ao grupo controle negativo DMPC

($257,50 \pm 39,72$). Os índices de ALT tratados por via i.p, não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$), em nenhum dos grupos comparados em análises múltiplas.

Os valores de AST dos grupos tratados apresentaram-se alterados em comparação ao grupo controle negativo (DMPC). Segundo William e colaboradores (2016) o aumento da atividade plasmática de AST presumidamente se origina de hepatócitos danificados. Contudo não se deve supor que esses danos sempre serão por causa química (causada por fármacos), outros motivos podem estar relacionados à hepatite aguda ou ainda portadores de doença hepática metastática. As medidas de (ALT) e (AST) são medidas realizadas de forma mais ampla para fins clínicos, pois tem grande distribuição tecidual. As aminotransferases catalisam a transferência de um grupo amino de um alfa-aminoácido para um alfa-oxoácido, o aumento de sua atividade plasmática é simplesmente um marcador de disrupção (interrupção do curso normal de um processo) de hepatócitos (WILLIAM et al., 2016).

É importante notar que a atividade plasmática de ALT ou AST fora da variação da referência não afirma necessariamente um dano hepatocelular significativo, por isso a importância do exame histopatológico como auxílio complementar as análises da função hepática. Presumidamente, estas enzimas também podem ser encontradas no fígado, coração, musculo esquelético, rim, cérebro, eritrócitos e pulmão, tornando-se apenas um parâmetro sugestivo dentre as análises laboratoriais (MAKANJUOLA; LAPSLEY, 2016). Esse resultado é justificado pelo fato de que o AST é também encontrado na musculatura esquelética e cardíaca, rins, pâncreas e eritrócitos. O tumor S180, na sua forma sólida e na medida em que cresce na região axilar, danifica um ou mais tecidos, como músculo esquelético; fator este que provoca alterações em parâmetros bioquímicos como AST (AMARAL et al., 2016).

Dentre os efeitos relacionados à farmacocinética dos princípios em estudo, os mais observados foram em relação à metabolização/biotransformação e à eliminação/excreção dos antineoplásicos. Embora alguns medicamentos sejam metabolizados no local de absorção, o local primário do metabolismo é o fígado, principalmente no complexo enzimático citocromo P450 (SCRIPTURE, 2006).

A função renal foi avaliada através da medição de ureia no soro, juntamente com os índices de creatinina. Disfunções renais podem ser revelada por meio de um achado de anormalidades bioquímicas, particularmente uma elevada concentração desses metabólitos, pode ser um indicativo de lesão. A concentração de ureia no soro é, em geral,

baixa e é reduzida não apenas pela diluição, mas também por conta da reabsorção tubular reduzida, o que caracteriza a necessidade da associação desses dados aos exames complementares para evidenciar uma análise elaborada.

Na lesão renal aguda pré-renal, a concentração de ureia plasmática geralmente está aumentada desproporcionalmente à da creatinina. À medida que a taxa de fluxo urinário cai, a difusão da ureia do lúmen do néfron para o fluido intersticial aumenta. A elevação da ureia pode também estar relacionada com maior catabolismo que geralmente está presente como resultado do distúrbio de base. Em contrapartida, na lesão renal intrínseca, concentrações plasmáticas de ureia e creatinina tendem a se elevar em paralelo (MAKANJUOLA; LAPSLEY, 2016). Ainda que a concentração plasmática de ureia possa dar informações úteis em algumas circunstâncias, particularmente quando pode ser comparada com a concentração plasmática de creatinina, esta última, apesar dos problemas discutidos anteriormente, é um teste de função renal bastante confiável.

Todos os valores bioquímicos séricos (AST, ALT, ureia e creatinina) mensurados no sangue periférico por via oral, não tiveram alterações significativas em múltiplas comparações nos diferentes grupos tratados (Tabela 10). A série branca apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em números de leucócitos totais no grupo LHPA 200mg/kg ($1,61 \pm 0,28$) quando comparados ao grupo controle negativo ($6,76 \pm 2,21$). O número de linfócitos ($78,82 \pm 1,91$) e monócitos ($3,01 \pm 0,32$) do grupo LHPA 200 mg/kg expressaram diferença significativa em relação ao grupo DMPC ($69,73 \pm 2,66$; $5,35 \pm 0,65$), respectivamente.

A série vermelha não apresentou diferença significativa entre os grupos em números de hemácias e hemoglobina dos grupos LHPA 100 mg/kg ($7,37 \pm 0,07$) e LHPA 200mg/kg ($8,43 \pm 0,20$) em relação ao grupo DMPC ($8,57 \pm 0,34$). Esses resultados reafirmam ausência de atividade hemolítica descrita e discutida anteriormente por via intraperitoneal. Em número de plaquetas o grupo CICLO ($177,80 \pm 39,36$) mostrou diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparado aos grupos DMPC ($378,50 \pm 98,87$), LHPA 100 ($342,30 \pm 31,11$) e 200 ($376,20 \pm 33,02$) mg/kg/dia.

A ciclofosfamida é um substrato da enzima CYP2B6, ou seja, é um pró-fármaco e necessita que ocorra a biotransformação hepática para produzir seus compostos citotóxicos farmacologicamente ativos, assim, os inibidores do CYP podem reduzir o metabolismo dos substratos desta via ocasionando diminuição na concentração sérica do pró-fármaco (BACHMANN, 2006). Os resultados mostraram segurança em relação aos efeitos toxicológicos apresentados pelo grupo controle positivo tratado com

ciclofosfamida e LHPA nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia por via oral, principalmente diante dos índices mostrados nos exames bioquímicos, quanto aos marcadores de lesão hepática e renal.

Um estudo elaborado por Amaral (2018), confirmou a suspeita de que o extrato das folhas de *Passiflora alata* (EFPA), não causa alterações hepáticas nas dosagens utilizadas, cortes histológicos foram realizados e analisados, sendo confirmado que o EFPA não causa alterações histológicas no órgão diante do protocolo utilizado. Portanto, de acordo com os resultados apresentados o EFPA, nas doses e período avaliados, não altera a massa do fígado, nem parâmetros hepáticos clinicamente significativos e nem estruturas histológicas.

O EFPA apresenta várias características farmacológicas, direcionadas através de seus componentes. Sabe-se que dentre os vários constituintes característicos dessa planta, alguns se destacam por possuir distintas características funcionais, como por exemplo os flavanóides e as saponinas. Os flavonoides têm o potencial de modificar muitos eventos biológicos do câncer, como apoptose, vascularização, diferenciação celular e proliferação celular. Além disso, alguns dos flavonoides dietéticos foram conhecidos por exibir atividade antitumoral *in vivo* e reprimir angiogênese (AMARAL, 2018).

Dentre os flavonoides encontrados no EFPA a vitexina e isovitexina exercem efeito antitumoral e citotóxico em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. O potencial quimioterapêutico desses flavonoides foram evidenciados em câncer de mama, hepático, colorretal, pulmão, pele, oral, próstata, colo do útero, ovário, esôfago e leucemia. Sendo possível que essa atividade seja mediada por ação antimetastática ou por indução de morte celular por apoptose e/ou autofagia (AMARAL, 2018 ; GANESAN; XU, 2017).

Os flavonoides são metabólitos vegetais secundários responsáveis pela cor e pelo aroma das flores e possuem propriedades antibacterianas, antivirais, antioxidantes, antialérgicas e anti-inflamatórias. No processo de carcinogênese, os flavonoides interferem nas múltiplas vias de transdução de sinal e, portanto, limitam a proliferação, angiogênese e metástase ou aumentam a apoptose (ABOTALEB et al., 2018).

A apoptose é um processo estritamente organizado, regulado por uma série de cascatas de transdução de sinal e proteínas celulares. Câncer e muitas outras doenças, ocorrem como resultado de desequilíbrios e mecanismos aberrantes nas vias apoptóticas. A classificação das proteínas apoptóticas depende principalmente de seu papel na apoptose. Proteínas pró-apoptóticas são ainda classificadas dependendo da família de proteínas em caspases e família Bcl2: caspases, proteases de cisteína específicas do

aspartato, possuem um papel chave na indução de apoptose e são geralmente encontradas como heterodímeros inativos conhecidos como procaspases (ABOTALEB et al., 2018).

Perturbações na progressão do ciclo celular podem ser responsáveis pelos efeitos anticarcinogênicos dos flavonoides. Devido aos sinais mitogênicos, as células entram em uma série de etapas reguladas que permitem atravessar o ciclo celular, e as cinases dependentes de ciclina (CDKs) são reconhecidas como reguladores-chave da progressão do ciclo celular. Alteração e desregulação da atividade de CDK são marcas patogênicas da neoplasia. Vários tipos de cânceres estão associados à hiperativação de CDKs devido à mutação de genes CDK ou genes inibidores de CDK (CHAHAR ET AL., 2011).

Portanto, inibidores ou moduladores são de grande interesse como novos agentes terapêuticos no câncer. Verificou-se que os pontos de verificação em G1 / S e G2 / M do ciclo celular em linhas de células de câncer em cultura são perturbados por flavonoides, como silimarina, genisteína, quercetina, daidzeína, luteolina, caempferol, apigenina e epigallocatequina 3-galato. Estudos de vários laboratórios revelaram que o flavopiridol pode induzir a parada do ciclo celular durante G1 ou G2 / M, inibindo todos os CDKs (CHAHAR ET AL., 2011).

Muitos estudos sobre as distintas doenças, mostraram que os flavanóides tem efeitos positivos na redução e prevenção do câncer. Seu mecanismo de ação é elaborado através da sua entrada na célula ativando os domínios de morte celular (Bax e Bak). Reguladores pró-apoptóticos e proteínas reguladoras de apoptose (Bcl-2 e Bcl-x) liberam citocromo c na mitocôndria. Apaf1, e procaspase-9 estão ligados ao citocromo c para formar o apoptossoma. A caspase é ativada por causa da clivagem da procaspase-9. Ao mesmo tempo, os receptores de morte podem se relacionar com a procaspase-8 para criar sua forma ativa. Ao final, a apoptose é realizada (VEERAMUTHU, 2016).

As nanopartículas de LHPA conseguiram mostrar a ação antitumoral do extrato associada a eficiência que os sistemas de drug delivery apresentam quanto aos lipossomas, condicionado a minimizar os efeitos toxicológicos sistêmicos, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo a concentração do extrato em diferentes vias testadas.

O mecanismo de ação do EFPA está envolvido em mecanismos de necrose e apoptose estimulados por flavanoides discutidos anteriormente. Quando encapsulado em lipossomas, apresenta ampla segurança durante o protocolo testado, e sua metabolização é segura. As nanopartículas de LHPA conseguiram mostrar a ação antitumoral do extrato

associada a eficiência que os sistemas de entrega direcionada apresentam quanto aos lipossomas, condicionada a minimizar os efeitos toxicológicos sistêmicos, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo a concentração do estrato em diferentes vias testadas.

Os lipossomas têm várias vantagens sobre muitos outros sistemas de nano-entrega por serem menos tóxicos e ter um alto índice terapêutico, têm sido usados como transportadores de agentes farmacológicos e genéticos com vantagens únicas, incluindo: (a) proteção de drogas ou agentes terapêuticos baseados em siRNA da degradação; (b) direcionamento para o local de ação através de peptídeo ligante ou conjugação de anticorpo; e, (c) pouca toxicidade ou efeitos colaterais. Além disso, uma vez que os fosfolipídios usados na preparação de lipossomas, como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, também estão presentes em membranas celulares naturais, os lipossomas são os candidatos ideais para a preparação de transportadores biocompatíveis e biodegradáveis. Os lipossomas podem aumentar a meia-vida de vários agentes terapêuticos (SHARMA et al., 2012).

Pode-se imaginar que o desenvolvimento estratégico de nanocarreadores carregados de drogas ajustados para desencadear a liberação de drogas melhoraria significativamente a eficácia de drogas e produtos farmacêuticos, eliminando potencialmente os problemas de resistência aos medicamentos. Têm sido desenvolvidas várias modalidades de desencadeamento para liberação específica de local de drogas de lipossomas (PURI et al., 2009).

Os lipossomas têm várias vantagens adicionais como nanocarreadores para aplicações de entrega de drogas. Eles protegem o fármaco carregado da degradação e evitam a exposição indesejável do fármaco ao meio ambiente, o que pode diminuir a taxa de liberação do fármaco. Espécies lipídicas específicas, como colesterol e lipídeos saturados rígidos, estabilizam a bicamada lipídica para resistir ao ataque das proteínas plasmáticas e reduzir o vazamento do medicamento. No entanto, o desafio atual para o desenvolvimento de lipossomas como carreadores de drogas é como controlar sua distribuição e remoção *in vivo* (LI et al., 2017).

Finalmente, a nanodroga de *P. alata* mostrou atividade *in vivo* sobre distintas vias, contudo a via oral merece destaque, por ser um caminho difícil de superar, pelas barreiras naturais impostas de forma sistêmica aos fármacos em geral. A nanopartícula LHPA teve uma janela terapêutica satisfatória, mantendo seu efeito terapêutico sem maiores danos toxicológicos, chegando ao alvo em maiores proporções, benefícios permitidos através do uso de lipossomas.

Assim sendo, vantagem de usar nanocarreadores, incluindo lipossomas (intervalo de tamanho de 100-200 nm), para entregar agentes anticâncer ao tecido tumoral está sendo discutida neste trabalho. Esta abordagem para terapia anticâncer envolve "direcionamento passivo" dos nanocarreadores carregados com droga, porque essas partículas são conhecidas por se acumularem na área do tumor devido ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aprimorada pela vasculatura vazada (lipossomas não direcionados). Este efeito representa as diferenças anatômicas entre o tecido normal e canceroso porque os capilares na área do tumor possuem maior permeabilidade. Este efeito de direcionamento passivo é altamente dependente de uma série de características, incluindo o grau de vascularização tumoral e angiogênese e a porosidade e tamanho dos poros dos vasos tumorais, que variam com o tipo e o estado dos tumores (MURPHY et al., 2008; PURI et al., 2009).

Esses fatores contribuem para a farmacocinética e a biodistribuição dos lipossomas. Questões adicionais relacionadas ao "direcionamento passivo", como a cinética de liberação do medicamento, efluxo do medicamento liberado nas células tumorais e retenção do tumor, são fatores importantes que ditarão o resultado de um tratamento eficaz. Por exemplo, lipossomas na faixa de 100 a 150 nm mostraram se acumular preferencialmente em tumores devido ao efeito EPR (UCHIYAMA et al., 1995; ISHIDA et al., 1999; PURI., 2009).

7- CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos através da nanoformulação apresentaram-se de forma satisfatória e mostraram que é possível a obtenção e incorporação de extratos vegetais aos lipossomas. Visto que a medicina requer a preparação de materiais com características facilmente manipuláveis.
- O LHPA apresenta redução do crescimento de tumoral frente ao modelo pré-clínico de tumor S 180 por via intraperitoneal, o que evidencia que suas características biofarmacêuticas melhoradas são promissoras.
- O LHPA apresenta inibição do crescimento de tumoral frente ao modelo pré-clínico de tumor S 180 por via oral, mostrando que os lipossomas são capazes de chegar a locais específicos, melhorando e facilitando a entrega dos compostos, burlando as dificuldades que esta via apresenta.
- As análises bioquímicas mostram que o LHPA é uma formulação segura, diante do metabolismo hepático e renal.
- O LHPA frente ao modelo S180 *in vivo*, não apresenta atividade hemolítica e imunossupressora, apresentando-se seguro por via oral e intraperitoneal em modelos pré-clínicos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOTALEB M. SAMUEL S.M. VARGHESE E, et al. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)*.; 11(1):28. **Published** 2018 Dec 28. doi:10.3390/cancers11010028, 2018.

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants-II. Application to Harman Alkaloids of Genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**. v. 41, p. 100-106, 2003.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1397 – 1421, 2006.

AJAZUDDIN, S. S. Applications of novels drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, p. 680-689, 2010.

AMARAL, R. G.; Avaliação da atividade antitumoral do extrato das folhas da *Passiflora alata* Curtis, **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

ANDRESEN TL, JENSEN SS, JORGENSEN K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy. problems and prospects of active and tumor specific drug release. **Prog Lipid Res**;44(1):68–97, 2005.

APTSIAURI, N. et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.601, p.123 – 131, 2007.

ARAÚJO, G. L. S., & SCOPEL, M. (2019). APOPTOSE COMO PERSPECTIVA DE CURA DO CÂNCER, September–November, 2019.

BACHMANN KA, LEWIS JD, FULLER MA, BONFIGLIO MF. Interações medicamentosas: o novo padrão de interações medicamentosas e fitoterápicas. Um guia completo dos substratos, indutores e inibidores de enzimas do citocromo P450. 2a ed. Barueri (SP): **Manole**, 2006.

BANGHAM AD, STANDISH MM, WATKINS JC Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids. **J. Mol Biol.** ; 13 (1):238–52. DOI: [10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6), 1965.

BARBOSA, P. R. et al. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 2, p. 282–288, 2008.

BERNACCI, L. C. MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 355-356, 2003.

BEZERRA, D. P. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of applied toxicology**, v. 28, p. 156-163, 2008b.

BEZERRA, D. P. et al. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and peperine, two alkaloid amides from *piper*. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P. et al. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from *Piper* species. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 599-607, 2008a.

BHARALI, D. J. et al. Nanoparticle Delivery of Natural Products in the Prevention and Treatment of Cancers: Current Status and Future Prospects. **Cancers**, v. 3, p. 4024-4045, 2011.

BHATTACHARYA, S.; GHOSH, A. K. Phytosomes: the emerging technology for enhancement of bioavailability of botanicals and nutraceuticals. **Internet Journal of Aesthetic Antiaging Medicine.**, v. 2, p. 1-8, 2009.

WILLIAM J. MARSHALL, MARTA LAPSLEY, ANDREW P. DAY, RUTH M. Bioquímica clínica : aspectos clínicos e metabólicos / William J. Marshall. Ayling ; tradução Fabrizio Grandi ...[et al.]. – 3 .ed. – Rio de Janeiro : **Elsevier**, 2016.

BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v.33, p.1359-1369, 2010.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.408-420, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, mai. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: **Anvisa**, 126p. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 nov. 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10, de 09 de março 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso: em 18 março 2019.

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

BRAY, F. *et al.* Planning and developing populations-based cancer registration in BUTLER, M. S. The role of natural products in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141 – 2153, 2004.

CAO, Y. Tumorigenesis as a process of gradual loss of original cell identity and gain of properties of neural precursor/progenitor cells. **Cao Cell Biosciences**, v. 7, p. 1–14, 2017.

CHAHAR MK, SHARMA N, DOBHAL MP, JOSHI YC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. **Pharmacogn Rev.**;5(9):1-12. doi:10.4103/0973-7847.79093, 2011.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. Immuno potentiation and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated beta-(1-->3)-d-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v.10, p.398-405, 2010.

CHOI, M. J.; MAIBACH, H. I. Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 27, p. 211-221, 2005.

CIRPANLI, Y. et al. Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 201-206, 2011.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, p.829 – 837, 2004.

COSTA, A. F. Farmacognosia. Lisboa: Fundação Gulbenkian, 1994.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v.69, p.488 – 498, 2006.

CROKER, A.K.; ALLAN, A.L. Cancer Stem Cells: Implications for the progression and treatment of metastatic disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.12, p.374 - 390, 2008.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–271, 2013.

DOYAMA, J. T. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 96, p. 371-374, 2005.

DRAHMAN, K.; DHARMAN, S.; SHARMA, A. Passiflora a review aptade. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-12, 2004.

FENG T, WEI Y, LEE RJ, ZHAO L. Liposomal curcumin and its application in cancer *Int J Nanomedicine* . 2017; 12: 6027-6044. Publicado em 21 de agosto de 2017. Doi: 10.2147 / IJN.S132434

FENNELL, C. W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359-386, 2015.

FERREIRA, P. M. P. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.83, p.1045-1058, 2011.

FONSECA, C. Nanovesículas de Base Lipídica para Vectorização de Oligonucleotídeos *Antisense*: Desenvolvimento, Caracterização Físico-Química e Avaliação da Actividade Antitumoral em Modelos Celulares e Animal de Leucemia Humana. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 2006.

GANESAN, K.; XU, B. Molecular targets of vitexin and isovitexin in cancer therapy: a critical review. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v. 1401, p. 102–113, 2017.

GHOSH, V. et al. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152-157, 2013.

GOMES, S. V. F. et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in Passiflora species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, 2017.

GOMES, S.V.F. Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de métodos de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

GÓMEZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M. The role of liposomes in analytical processes. **Trends in Analytical Chemistry**, 24, 9. 2005.

HAYDON, D. A. & TAYLOR, J. L. J. **Theoret. Biol.** 4, 281,1963.

HOLMBERG, K.; SHAH, D. O.; SCHWAGER, M. J. Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry, Goteborg: John Wiley & Sons, 606 p. 2002.

HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; BOUWSTRA, J. A. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, p. 67-74, 2005.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2019: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2020.

ISHIDA O, MARUYAMA K, SASAKI K, IWATSURU M. Size-dependente extravasation and interstitial localization of polietilenoglicol lipossomas em camundongos com tumor sólido. **Int J Pharm**; 190 (1): 49–56, 1999.

JESUS, L. G. de et al.Repercussões orais de drogas antineoplásicas: uma revisão de literatura. **RFO UPF** [online]. vol.21, n.1, pp. 130-135. ISSN 1413-4012, 2016.

KATZUNG, G.B. **BASIC and Clinical Pharmacology**, 9 edn., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.1088, 2003.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, p. 253-266, 2013.

KHODADOUST, S.; HADJMOHAMMADI, M. Determination of Nmethylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, p. 113-119, 2011.

KLAUNIG, J. E., & WANG, Z. *Oxidative stress in carcinogenesis*. **Current Opinion in Toxicology**, 7, 116–121. doi:10.1016/j.cotox.2017.11.014, 2018.

KUOL N, STOJANOVSKA L, APOSTOLOPOULOS V, NURGALI K. Role of the Nervous System in Tumor Angiogenesis. **Cancer Microenviron**. 11(1):1-11. doi:10.1007/s12307-018-0207-3, 2018.

LASIC, D. D. Liposomes – from Physics to Applications. **Biophysical Journal**, v. 67, p. 1358-1362, 1994.

LEI M, MA G, SHA S, et al. Dual-functionalized liposome by co-delivery of paclitaxel with sorafenib for synergistic antitumor efficacy and reversion of multidrug resistance. **Drug Deliv.**;26(1):262-272. doi:10.1080/10717544.2019.1580797, 2019.

LI Z, TAN S, LI S, SHEN Q, WANG K. Entrega de medicamentos contra o câncer na era nano: uma visão geral e perspectivas (revisão). **Oncol Rep**. 2017 Ago; 38 (2): 611-624. doi: 10.3892 / ou.2017.5718. Epub 2017 14 de junho. PMID: 28627697; PMCID: PMC5562049, 2017.

LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* “edulis” and *Passiflora edulis* “flavicarpa”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 1085–1090, 2011.

LIN W, MA X, ZHOU C, et al. Development and characteristics of novel sonosensitive liposomes for vincristine bitartrate. **Drug Deliv.**;26(1):724-731. doi:10.1080/10717544.2019.1639845, 2019.

IARC, **low-and middle-income settings**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014. (IARC technical publication, n. 43). Available at: http://www.rho.org/files/IARC_Planning_developing_cancer_registries_2014.pdf.

Access in: 20 Sep. 2019

MACHADO, CS; MACHADO, LFS; HÖRNER, C; NORA, MD; ROSA, TF; HORNER, R; Análise Da Toxicidade De Uma Fluoropirimidina Em Protocolo Quimioterápico. **Revista Saúde** (Sta. Maria). 44 (3), 2018.

MAINARDES, R. M.. Et Al. Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, p. 275-285, 2006.

MARTINS, M. H. Encapsulação e caracterização de lipossomas contendo isotretinoína para aplicação dermatológica. Campinas, SP, 2007.

MATOS, F. J. A. **Farmácia Vivas**. 4º ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002, 267p. MAYER, L. D. et al. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et Biophysica Acta**, 161-168, 1986.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C. Caracterização Fenotípica de três seleções de Maracujazeiro-Roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 268-272, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2008.

MIRODDI, M. et al. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791–804, 2013.

MÜLLER, S. D. W. et al. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 37, p. 399-403, 2005.

MURPHY EA, MAJETI BK, BARNES LA, MAKALE M, WEIS SM, LUTU-FUGA K., WRASIDLO W, CHERESH DA. A distribuição de drogas mediada por nanopartículas à vasculatura do tumor suprime a metástase. **Proc Natl Acad Sci US A.** 105 (27): 9343–8, 2008.

NAIR, K.L. et al. Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 425, p. 44-52, 2012.

NEW, R.R.C. Lipossomes of – a practical approach. Oxford University Press, New York, 1990.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461 – 477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022 – 1037, 2003.

OGA, S. et al. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**. v. 50, p. 303-306, 1984.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), acesso em 12/05/20 https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094

Passiflora in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506> (accessed 26.02.19).

PEREIRA, C. A. M. et al. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**. v. 15, p. 241-248, 2004.

PONCE AM, VUJASKOVIC Z, YUAN F, NEEDHAM D, DEWHIRST MW. Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. **Int J Hyperthermia**. 22(3):205–13, 2006.

PURI, A., LOOMIS, K., SMITH, B., LEE, J. H., YAVLOVICH, A., HELDMAN, E., & BLUMENTHAL, R. “Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic.” *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* vol. 26,6, 523-80, 2009. doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i6.10

PURICELLI, L. et al. Preliminary evaluation of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 302-304, 2003.

RAJENDRAN, R. et al. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 613-617, 2013.

RAJENDRAN, R. et al. Development of antimicrobial cotton fabrics using herb loaded nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 613-617, 2013.

REGINATTO, F. H. et al. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 12, n. 1, p. 32-36, 2001.

REGINATTO, F. H. et al.. Assay of quadranguloside, the major saponin of leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis**. v. 15, p. 195-197, 2004.

REZAEIAN M, SEDAGHATKISH A, SOLTANI M. Numerical modeling of high-intensity focused ultrasound-mediated intraperitoneal delivery of thermosensitive liposomal doxorubicin for cancer chemotherapy. **Drug Deliv**.26(1):898-917. doi:10.1080/10717544.2019.1660435, 2019.

RIPA, F. A. et al. Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of *Passiflora edulis* Sims. **European Journal of Scientific Research**, v. 31, p. 592-598, 2009.

ROBBINS, S. L.; COTRAN R. S.; KUMAR, V. **Neoplasias**. In: ROBBINS SL, COTRAN RS, KUMAR V. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 213-68, 2000.

SAFARI, J., ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, 2013.

SCHWARTSMANN, G. et al. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.47S - 59S, 2002.

SCRIPTURE CD, FIGG WD. Drug interactions in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):546-58. Review. Erratum in: **Nat Rev Cancer**.;6(9):741. 2006.

SHARMA A, MADHUNAPANTULA SV, ROBERTSON GP. Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. 2012;8(1):47-69. doi:10.1517/17425255.2012.637916

SINICO, C. et al. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 161-168, 2005.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.
SU, Y. L. et al. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. **Powder Technology**, v. 184, p. 114-121, 2008.

SUGARBAKER. P.H, STUART O.A. Pharmacokinetics of the intraperitoneal nanoparticle pegylated liposomal doxorubicin in patients with peritoneal metastases [published online ahead of print, 2019 Mar 29]. **Eur J Surg Oncol**.;S0748-7983(19)30380-4. doi:10.1016/j.ejso.2019.03.035, 2019.

SUJANA, N. et al. Antitumour potential of *Passiflora incarnata* L. against ehrlich ascites carcinoma. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 17-20, 2012.

UCHIYAMA K, NAGAYASU A, YAMAGIWA Y, NISHIDA T, HARASHIMA H, KIWADA H. Efeitos do tamanho e fluidez dos lipossomas em sua acumulação em tumores. Uma presunção de sua interação com tumores. **Int J Pharm.** 121 (2): 195–203, 1995.

ULUBELEN, A. et al. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. **Journal of Natural Products.** v. 45, p. 783-783, 1982.

UMBREIT, N. T., ZHANG, C. Z., LYNCH, L. D., BLAINE, L. J., CHENG, A. M., TOURDOT, R., SUN, L., ALMUBARAK, H. F., JUDGE, K., MITCHELL, T. J., SPEKTOR, A., & PELLMAN, D. Mechanisms generating cancer genome complexity from a single cell division error. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6488), eaba0712. doi.org/10.1126/science.aba0712, 2020.

VEERAMUTHU D., WILLIAM RAJA THARSIUS RAJA, NAIF ABDULLAH AL-DHABI AND IGNACIMUTHU SAVARIMUTHU. **Flavonoids: Anticancer Properties.** October 10th 2016 Reviewed: February 23rd 2017 Published: August 23rd 2016 DOI: 10.5772/68095

YEN, F. L. et al. Curcumin Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties of Curcumin and Effectively Enhance Its Antioxidant and Antihepatoma Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7376–7382, 2010.

YOU, J. S.; JONES, P. A. Review Cancer Genetics and Epigenetics : Two Sides of the Same Coin ? **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2012.

YUAN, R. et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 19–27, 2017.

ZHAN W, WANG CH. Convection enhanced delivery of liposome encapsulated doxorubicin for brain tumour therapy. **J Control Release.** 285:212-229. doi:10.1016/j.jconrel.2018.07.006, 2018.

ZHAN, J. et al. Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Passiflora edulis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 1851-1865, 2013.

ZHAO, D. et al. Molecularly targeted therapies for p53-mutant cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 22, p. 4171–4187, 2017.

ZHENG, Y. et al. 23-hydroxybetulinic acid from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 128, p. 615-617, 2010.

ZHOU T, TANG X, ZHANG W, FENG J, WU W. Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluations of 10-hydroxycamptothecin liposomes modified with stearyl glycyrrhetinate. **Drug Deliv.** 26(1):673-679. doi:10.1080/10717544.2019.1636422, 2019.

ZORZI, G. K. et al. On the use of nanotechnology –based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 426-436, 2015.