

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA – PPGBF
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI – LIKA



**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E
FURTIVAS CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO**

Aluno: FÁBIO JOSÉ FIDÉLIS ALMEIDA

Orientadora: PROFA. DRA. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

Co-Orientadora: PROFA. DRA. NOEMIA PEREIRA DA SILVA SANTOS

Recife, 2010

FÁBIO JOSÉ FIDÉLIS ALMEIDA



**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E
FURTIVAS CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO**

Dissertação apresentada
para o cumprimento parcial das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em Bioquímica
e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Recife, fevereiro de 2010

Almeida, Fábio José Fidélis

Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico / Fábio José Fidélis Almeida. – Recife: O Autor, 2010.

84 folhas : fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Farmacologia 2. Compostos orgânicos 3. Ácidos orgânicos
4. Câncer 5. Tumores I. Título.**

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010 - 105

Ata da defesa de dissertação do mestrando **Fábio José Fidélis Almeida**, realizada em 26 de fevereiro de 2010, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Às 14:00 horas, do dia 26 de fevereiro de 2010, foi aberto na Sala de Seminários do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação do mestrando **Fábio José Fidélis Almeida** aluno do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva, em substituição a Coordenadora do Programa supra citado, fez a apresentação do aluno, de sua orientadora, Profa. Dra. Neireide Stela Santos Magalhães, da co-orientadora Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Maria da Paz Carvalho da Silva, na qualidade de Presidente, do Depto. de Bioquímica/UFPE, Francisco Carlos Amanajás Júnior, do CAV/UFPE e Mariane Cajubá de Britto Lira, do LIKA. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: **“Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de naocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico”**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 30 (trinta) minutos. Após a apresentação do mestrando, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra para a Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Britto Júnior, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para agradecer ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Finalmente a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, a qual permaneceu no local e a Sra. Presidente pediu as pessoas presente para aguardarem fora da sala. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **“Aprovado”**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 26 de fevereiro de 2010.

Francisco Carlos Amanajás Júnior
Mariane Cajubá de Britto Lira
Maria da Paz C. Silva

*Dedico esta dissertação aos meus Pais, Niwton
e Luísa, por serem sempre meu alicerce, meu porto
seguro, minha fortaleza... Amo muito vocês...*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	<i>vii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>x</i>
LISTA DE TABELAS	<i>xii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xiii</i>
RESUMO	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
I. INTRODUÇÃO	17
1. Câncer	18
2. Ácido úsnico	20
2.1. Propriedades físico-químicas do ácido úsnico	20
2.2. Propriedades biológicas do ácido úsnico	21
2.2.1. Antimicrobiana	22
2.2.2. Antiviral, antiparasitária e antifúngica	23
2.2.3. Antiinflamatória	23
2.2.4. Gastoprotetora	24
2.2.5. Antitumoral	24
2.3. Farmacocinética do ácido úsnico	25
2.4. Mecanismo de ação e toxicologia do ácido úsnico	25
3. Sistemas de liberação controlada de fármacos	26
3.1. Nanopartículas	29
3.1.1. Nanocápsulas furtivas	31

II. OBJETIVOS	34
1. Objetivo geral	35
2. Objetivos específicos	35
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
IV. ARTIGO CIENTÍFICO:	
Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico: Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral	47
V. CONCLUSÕES	77
VI. ANEXOS	80

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo seu Amor e por sua presença em minha vida, me ajudando a superar todos os meus momentos de dificuldades;

Aos meus pais, Nilton Roberto Almeida da Silva e Luísa Fidélis Almeida pelo carinho e dedicação me ensinando que “exigir faz parte de amar e certamente os frutos de hoje são os resultados das sementes plantadas na infância”;

Aos meus avós, Dona Dora, Dona Do Carmo e Seu Chiquinho que já “partiram”, e a meu avô Seu Fidélis, que com certeza sonharam e sonham com esse momento;

À minha irmã Jéssica (Jel) e aos meus familiares pelos momentos sinceros de amizade e fraternidade vivenciados;

À minha amada Paula (Minha Linda), pelo amor, companheirismo e compreensão, tendo ela fundamental importância na composição deste trabalho;

Aos meus amigos irmãos, Naldo (Ventonildo) e Rui (BUneca), pela amizade verdadeira;

Aos meus amigos do G5, Monique (Meu Gancho), Nathália (Ôôô Mundão), Diogo (O Cara) e Dáfila, e aos agregados André (Morde Fronha), Milena (Milizinha), Steffânia (Steff), Lucas (O cara de pau amarelo tá atrás dele) e Talita (Talitão), pelos bons momentos vivenciados;

Aos amigos, Bruno, Magnus, Ricardo e Lola, companheiros de apartamento e muitas farras;

À minha orientadora Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela oportunidade, confiança e orientações durante o desenvolvimento desse trabalho, sendo ela para mim um exemplo de profissional dedicada;

À Minha co-orientadora Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos pela oportunidade, paciência e por ter sido peça fundamental na confecção desse trabalho;

À Mestra e futura Doutora Milena Sales (Mi...) por toda sua amizade, apoio e dedicação durante minha iniciação científica e mestrado, e pela IMPORTANTÍSSIMA colaboração dada a esse trabalho;

Às Doutoradas Mariane Lira (Mari Lira minha Filha) e Waldenice Moraes (Wal), pela amizade, paciência e grande ajuda enriquecendo meus conhecimentos;

À minha aluna de Iniciação Científica Larissa, pela ajuda fundamental na realização dos meus experimentos;

Aos amigos que participam e participaram do Grupo de Sistema de Liberação Controlada de Fármacos (SLC), Taciana (amiga chata que mais gosto), Islene, Isabella, Rafaela, Catarine, Hywre, Rosana, Mirela, Marcileide, Jéssica, Rebeca, André, Vinícius, Elizângela, César, pela amizade e convívio neste período;

Aos amigos do laboratório de Bioquímica do LIKA, Ricardo, Adriana, Humberto, Natalia, Mari Cabrera, Luíza, Amanda, Lúcia, Sinara, Larissa, Camila, Roziana e Vanessa por toda colaboração e amizade;

Aos Funcionários do LIKA, Felipe e Maria Helena pelo apoio na manutenção dos animais de experimentação no biotério, Rafael e Otaviano pelo auxílio técnico;

Ao Diretor do LIKA, Prof. Dr. José Luiz pelo suporte estrutural que o LIKA nos oferece para desenvolvermos nossos trabalhos;

Ao Dr. Juliano Cazuzu chefe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil) e ao pessoal técnico, Dílson e João, pela realização das análises hematológicas.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior pela realização e discussão dos resultados das análises histopatológicas.

À CAPES pelo apoio financeiro, através de bolsa de estudos, durante a elaboração desse trabalho;

Enfim, a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho, Muito Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- FIGURA 1.** Estrutura química do ácido úsnico (LIRA et al., 2009). 20
- FIGURA 2.** Estrutura química do ácido úsnico: (A) aspecto macroscópico em forma de pó com coloração amarelada e (B) aspecto microscópico na forma de cristais (LIRA, 2007). 21
- FIGURA 3.** Perfil farmacocinético de doses múltiplas ou em sistema de liberação controlada de fármacos (LIRA, 2009). 27
- FIGURA 4.** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (SCHAFFAZICK et al., 2003). 30
- FIGURA 5.** Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas contendo cadeias de polietilenoglicol em sua superfície (furtivas). 32

ARTIGO CIENTÍFICO

- FIGURA 1.** Variação do tamanho de partícula médio das nanocápsulas convencionais e furtivas com e sem ácido úsnico durante o armazenamento a 4°C por 60 dias: NC-PLGA= nanocápsulas convencionais sem ácido úsnico; NC-PLGA-PEG = nanocápsulas furtivas sem ácido úsnico; NC PLGA/AU = nanocápsulas convencionais com ácido úsnico; NC-PLGA-PEG/AU = nanocápsulas furtivas com ácido úsnico. 61
- FIGURA 2.** Variação do índice de polidispersão das nanocápsulas convencionais e furtivas com e sem ácido úsnico durante o armazenamento a 4°C por 60 dias. NC-PLGA= nanocápsulas convencionais sem ácido úsnico; NC-PLGA-PEG = nanocápsulas furtivas sem ácido úsnico; NC PLGA/AU = nanocápsulas convencionais com ácido 62

úsnico; NC-PLGA-PEG/AU = nanocápsulas furtivas com ácido úsnico.

FIGURA 3. Perfil de liberação do ácido úsnico a partir das nanocápsulas convencionais (●) e furtivas (■) sob condições *sink*. Cada ponto representa a media de três experimentos diferentes $\pm$ desvio padrão. As linhas representam o ajuste ao modelo exponencial baseado na lei de difusão de *Fick*. 66

Insert: Gráfico do ajuste da liberação do ácido úsnico pela raiz quadrada do tempo ($t = 12h$) das nanocápsulas convencionais (A) e nanocápsulas furtivas (B). As linhas representam o delineamento do modelo linear.

FIGURA 4. Avaliação da atividade antitumoral do ácido úsnico livre e nanoencapsulado frente a Sarcoma-180 em camundongo: AU Livre (ácido úsnico em suspensão), NC-PLGA/AU (ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas convencionais) e NC-PLGA-PEG/AU (ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas furtivas). 67

FIGURA 5. Análise histopatológica do tumor dos animais (HE, 400x): A) Grupo controle; B) AU livre; C) Nanocápsulas convencionais contendo AU; D) Nanocápsulas furtivas contendo AU. As setas indicam áreas de necrose. 69

FIGURA 6. Análise histopatológica do fígado dos animais (HE, 400x): A) Grupo controle; B) AU livre; C) Nanocápsulas convencionais contendo AU; D) Nanocápsulas furtivas contendo AU. A seta indica área de degeneração microvacuolar. 71

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1. Sistemas de liberação controlada de medicamentos (Adaptado de WANDERLEY, 2007). 28

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA I. Variação do pH das formulações das nanocápsulas convencionais e furtivas com e sem ácido úsnico durante o armazenamento a 4°C por 60 dias. 59

TABELA II. Análise hematológica de animais tratados com ácido úsnico livre e nanoencapsulado. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

AU - ácido úsnico;

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média;

CIM - concentração inibitória mínima;

CI⁵⁰ - concentração do fármaco que inibe 50% da atividade enzimática;

DNA - ácido desoxirribonucléico;

D.P. - desvio padrão;

Hb - concentração de hemoglobina;

Htc - hematócrito;

HCM - hemoglobina corpuscular média;

NC - nanocápsulas;

NC-PLGA Branca - nanocápsulas convencionais sem o ácido úsnico;

NC-PLGA/AU - nanocápsulas convencionais com o ácido úsnico;

NC-PLGA-PEG Branca - nanocápsulas furtivas sem o ácido úsnico;

NC-PLGA-PEG/AU - nanocápsulas furtivas com o ácido úsnico;

PCS - espectroscopia de correlação de fótons;

PEG - polietilenoglicol;

PLA - polímero de ácido láctico;

pH - potencial hidrogeniônico;

PLGA - copolímero de ácido láctico e glicólico;

PLGA-PEG - dibloco de copolímero de ácido láctico e glicólico - polietilenoglicol;

RBC - contagem de células vermelhas;

RDW - amplitude de distribuição de células vermelhas;

RNA - ácido ribonucleico;

rpm - rotações por minuto;

SFM - sistema fagocitário mononuclear;

UV - ultravioleta;

Via i.p. - via intraperitoneal;

VCM - volume corpuscular médio;

WBC - contagem de células brancas.

RESUMO

O presente estudo objetivou desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico, visando uma futura aplicação terapêutica. As nanocápsulas de PLGA e PLGA-PEG contendo ácido úsnico foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e caracterizadas através da eficiência de encapsulação, pH, tamanho de partículas, índice de polidispersão, carga de superfície e estudo de liberação *in vitro*. A atividade antitumoral *in vivo* do ácido úsnico foi avaliada em camundongos machos Swiss, onde os animais receberam doses diárias de 15 mg / kg / dia de ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas convencionais (NC-PLGA/AU) e furtivas (NC-PLGA-PEG/AU) ou ácido úsnico (AU) em suspensão por 7 dias. O pH, o tamanho e o índice de polidispersão das partículas não tiveram variações significativas durante 60 dias para as nanocápsulas em suspensão armazenadas a 4°C, comprovando a boa estabilidade dos nanocarreadores obtidos. Além disso, as nanocápsulas convencionais e furtivas apresentaram altas eficiências de encapsulação, próximas a 100% e as cargas de superfície variaram de -18,96 a -29,42. Os perfis de liberação do ácido úsnico a partir das nanocápsulas de PLGA e PLGA-PEG apresentaram um efeito *burst* abaixo de 15% e um perfil de liberação gradual e controlado até 12h, atingindo um máximo de fármaco liberado em torno de 60% do seu conteúdo inicial em 48h. Nos estudos *in vivo* a atividade antitumoral do ácido úsnico livre foi comprovada, porém, quando nanoencapsulado o ácido úsnico promoveu uma inibição da massa tumoral acima de 50%, quando comparado ao grupo controle, e de aproximadamente 26% quando comparado com o fármaco livre. Em suma, foram obtidas nanocápsulas furtivas estáveis e com boa atividade biológica indicando que estes nanocarreadores são uma alternativa para a utilização do ácido úsnico na terapia anticancerígena.

Palavras chave: Nanocápsulas furtivas, ácido úsnico, atividade antitumoral.

ABSTRACT

The goal of this study was to develop, characterize and evaluate the antitumor activity of conventional and stealth nanocapsules containing usnic acid, aiming to future therapeutic application. The nanocapsules of PLGA and PLGA-PEG containing usnic acid were obtained by interfacial deposition of preformed polymer and characterized by encapsulation efficiency, pH, particle size, polydispersity, surface charge and release studies *in vitro*. The *in vivo* antitumor activity of usnic acid was evaluated in Swiss male mice, where the animals received daily doses of 15 mg / kg / day of usnic acid encapsulated in nanocapsules conventional and stealth (NC-PLGA/AU and NC-PLGA-PEG/AU, respectively) or usnic acid (UA) in suspension for 7 days. The pH, the size and polydispersity of the particles didn't change significantly during 60 days in suspension at 4°C, proving the good stability of these nanoparticles. Moreover, the conventional and stealth nanocapsules showed high encapsulation efficiencies, close to 100% and the surface charges ranged from - 18.96 to - 29.42. The release profiles of usnic acid from the nanocapsules of PLGA and PLGA-PEG showed a burst effect under 15% and a gradual release profile and controlled up to 12 hours, reaching a maximum drug released in about 60% of its initial content in 48 hours. In the *in vivo* study of the antitumor activity of usnic acid free was proved, however, when the loaded usnic acid promoted an inhibition of tumor mass over 50% compared to the control group, and approximately 26% compared with free drug. Summarizing, stealth nanocapsules were obtained and stable with good biological activity indicating that these nanocarriers are an alternative to the use of usnic acid in the anticancer therapy.

Keywords: Stealth nanocapsules, usnic acid, antitumoral activity.

INTRODUÇÃO

1. Câncer

Câncer é o nome dado a um grupo de doenças malignas caracterizadas pelo crescimento anormal e descontrolado de células que sofreram alteração em seu material genético, em algum momento de seu ciclo celular. Essas células geneticamente modificadas podem invadir os tecidos e órgãos, espalhando-se para outras regiões do corpo (ROBBINS et al., 2000).

Os diversos tipos de células do corpo originam os diferentes tipos de câncer. A velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadirem tecidos e órgãos vizinhos ou distantes são outras características que diferenciam os vários tipos de câncer entre si. De acordo com a Organização mundial de Saúde (OMS), constatou-se que anualmente 10 milhões de casos de câncer são diagnosticados em todo o mundo e seis milhões de pessoas morrem por causa da doença, prevendo-se que até 2020, a incidência anual será de 15 milhões de casos.

Oitenta por cento dos pacientes de câncer morrem nos países em desenvolvimento, contra 50 por cento das nações ricas, sendo que a incidência de câncer é mais elevada nas nações ricas que nas pobres (INCA, 2008). Portanto o câncer é uma patologia que independe de classe econômica, região ou idade, que acomete pessoas em todo o mundo.

Ao longo dos anos, o perfil da população brasileira vem se modificando e lançando um desafio para o Sistema de Saúde, o controle dos agravos de doenças crônicas. Entre as causas de morte no Brasil, o câncer ocupa a segunda posição, sendo considerado problema de saúde pública. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou para 2008 e 2009 uma ocorrência de 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de

mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (BRASIL, 2007).

Apesar das melhorias no tratamento quimioterapêutico do câncer, os regimes quimioterapêuticos existentes que usam agentes citotóxicos clássicos apresentam algumas limitações, que inclui um índice terapêutico estreito que não permite muitas vezes a administração de uma quantidade suficiente da droga a fim induzir a resposta pretendida. Além disso, a resposta à quimioterapia varia significativamente entre os pacientes. Portanto, uma evolução da metodologia tradicional, baseada na necessidade de aumentar o índice terapêutico de drogas da quimioterapia e diminuir a toxicidade em células normais, está sendo buscada (HARLEY et al., 2008; NISHIYAMA et al., 2009).

A fim de descobrir novas alternativas para o tratamento do câncer, as substâncias naturais vêm recebendo uma atenção especial, dentre essas substâncias, o ácido úsnico, que é um derivado líquênico, se destaca por apresentar várias atividades biológicas, incluindo a atividade antitumoral (SANTOS et al., 2006). Porém, o ácido úsnico apresenta algumas características desfavoráveis, tais como baixa solubilidade em água e uma elevada hepatotoxicidade (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; PRAMYOTHIN et al., 2004). Então, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores, tais como as nanopartículas, que são dispositivos multifuncionais, capazes de diagnosticar e tratar, de forma eficaz e segura, doenças devastadoras como o câncer, a fim de atender às necessidades terapêuticas dos pacientes (SINGH & LILLARD Jr; 2009).

2. Ácido Úsnico

2.1. Propriedades físico-químicas do ácido úsnico

Entre os vários compostos de origem natural o ácido úsnico (2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzofurano, $C_{18}H_{16}O_7$) é um dos mais bem conhecidos e estudados (figura 1). Isolado pela primeira vez em 1844, data da origem da química orgânica e fitoquímica, trata-se de um metabólito secundário produzido por líquens (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Na natureza o ácido úsnico está presente principalmente nas seguintes espécies de líquens: *Cladonia* (cladoniaceae), *Usnea* (usneaceae), *Lecanora* (lecanoraceae), *Ramalina* (ramalinaceae) e *Parmelia* (parmeliaceae) (COCCHIETTO et al., 2002).

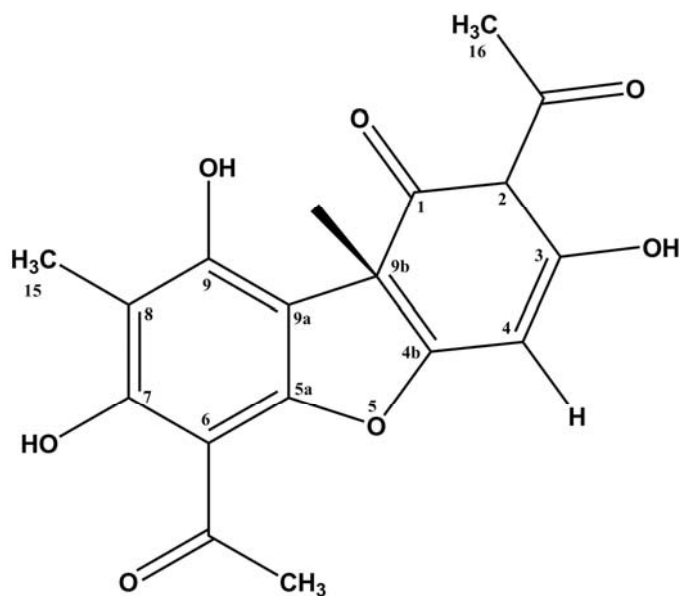


FIGURA 1. Estrutura química do ácido úsnico (LIRA et al, 2009).

O ácido úsnico apresenta-se na forma cristalina com coloração amarelada (figura 2), e segundo a projeção angular do grupo metila do carbono quiral na posição 9b possui duas formas enantioméricas (+)-ácido úsnico e (-)-ácido úsnico (COCCHIETTO et al., 2002). Este metabólito líquênico apresenta caráter hidrofóbico, sendo praticamente insolúvel em água,

parcialmente solúvel etanol e facilmente diluído em éter quente, acetona, benzeno, metanol, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano (ASAHINA; SHIBATA, 1954; TAKAI et al, 1979; INDEX MERCK, 1995). Em água, sua solubilidade é de menos de 0,01g/100mL a 25°C (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Essa característica hidrofóbica do ácido úsnico é explicada pela presença de três grupos cetônicos e o anel furano unindo seus anéis aromáticos, além de pontes de hidrogênio intramoleculares, que contribuem para sua natureza lipofílica e sua acidez é justificada pela presença do anel fenólico, cuja estrutura é instável (ASAHINA; SHIBATA, 1954; MULLER, 2001). O ponto de fusão do ácido úsnico é em torno de 204°C e o peso molecular de 344,32 g/mol (INDEX MERCK, 1995).

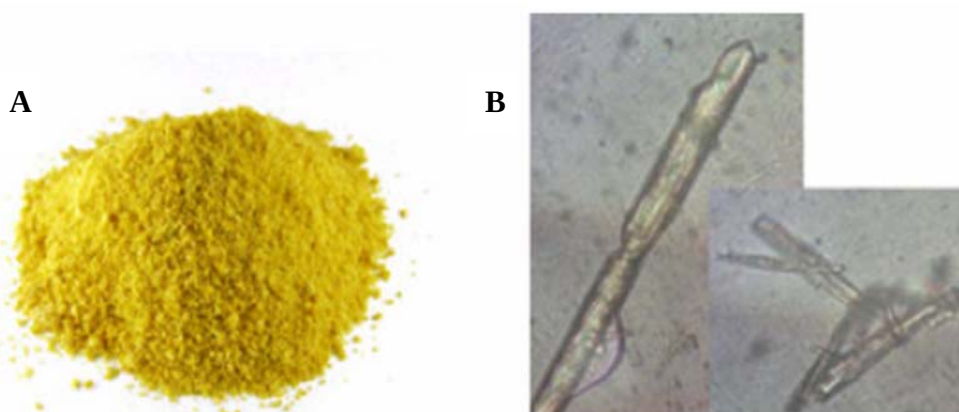


FIGURA 2. Estrutura química do ácido úsnico: (A) aspecto macroscópico em forma de pó com coloração amarelada e (B) aspecto microscópico na forma de cristais (LIRA, 2007).

2.2. Propriedades biológicas do ácido úsnico

O ácido úsnico é bastante utilizado na medicina popular no tratamento de micoses, alívio na dor de garganta e dente, febre, com ação anti-séptica e cicatrizante (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Além disso, várias pesquisas têm confirmado potenciais atividades do ácido úsnico frente a terapias, tais como: antimicrobiana (antimicobacteriana),

antiviral, antiparasitária, antifúngica, antiinflamatória, antipirética, analgésica, gastroprotetora e antitumoral (DE CARVALHO et al., 2005; ODABASOGLU et al., 2006).

2.2.1. Antimicrobiana

De acordo com trabalhos descritos na literatura o principal papel biológico do ácido úsnico na natureza é o de antibiótico. As primeiras avaliações sobre sua ação antibacteriana datam da década de 50, quando o ácido úsnico foi descoberto mediante a busca por novos compostos antibióticos. Investigações nos últimos anos têm ampliado o conhecimento desse metabólito liquênico como antibiótico (BUSTINZA, 1951; COCCHIETTO et al., 2002).

A avaliação da atividade antimicobacteriana utilizando cinco compostos liquênicos diferentes revelou que a melhor ação foi exibida pelo ácido úsnico extraído da *Cladonia arbuscula*, a concentração inibitória mínima (CIM) de 32 µg/mL frente ao *Mycobacterium aurum*, onde despertou interesse por mais investigações (INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998).

Elo e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do ácido úsnico frente a sete cepas de microrganismos resistentes, tais como, enterococo vancomicina-resistente e estafilococo metilicina-resistente clinicamente isolados, foram utilizadas 12 concentrações do ácido único que variaram de 0,0195 a 40 mg/mL, o qual foi verificado uma alta atividade (CIM) frente a esses isolados, quando comparado com a ampicilina (droga de referência), mostrando o potencial valor clínico do ácido úsnico.

2.2.2. Antiviral, Antiparasitária e Antifúngica

Investigou-se a inibição do Popilomavírus *in vitro* usando células 3T6 (linhagem de fibroblastos de camundongo), nesta investigação o ácido úsnico inibiu severamente a replicação do DNA viral através de uma ação indireta de drástica inibição da transcrição do RNA, esta ação aconteceu em concentrações não tóxicas (5 e 10 µg/mL) sendo observada considerável viabilidade das células 3T6 (aproximadamente 80%) durante o experimento (CAMPANELLA et al., 2002).

Estudos da avaliação da atividade *in vitro* do ácido úsnico extraído da *Cladonia substellata* contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* apontaram o potencial uso desse composto na doença de Chagas, uma vez que, este metabólito foi efetivo em várias concentrações (10 a 50 mg / mL) frente às formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas causando danos a mitocôndrias e cinetoplasto (DE CARVALHO et al., 2005).

A atividade antifúngica do ácido úsnico também foi descoberta nos anos 50, quando se observou a inibição do fungo *Tricophyton mentagrophytes* após tratamento com o ácido (BUSTINGA, 1951; WANDERLEY, 2007). Em 1996, Proska e colaboradores observaram inibição no crescimento do *Penicillium frequentans* e *Verticillum albo-atrum*, após tratamento com o ácido úsnico.

2.2.3. Antiinflamatória

Vijayakumar e colaboradores (2000) estudaram a ação antiinflamatória do (+)-ácido úsnico em ratos Wistar com edema de pata, os resultados revelaram uma significativa atividade dose dependente do ácido úsnico comparado com o ibuprofeno (na mesma concentração), fármaco padrão de referência como anti-inflamatório. No estudo de edema de pata agudo, a

redução foi de 0,82 mL (controle) para 0,55 e 0,47 mL (ácido úsnico e ibuprofeno, respectivamente).

2.2.4. Gastroprotetora

Estudos indicam que o ácido úsnico, isolado da *Usnea longissima*, está sendo testado no tratamento da úlcera gástrica em animais. Induzida pela indometacina, lesões gástricas foram significativamente reduzidas por todas as doses utilizadas de ácido úsnico (25, 50, 100 e 200 mg/kg de peso corporal), quando comparado ao grupo tratado com a ranitidina (droga referência). Esse efeito gastroprotetor do ácido úsnico pode ser atribuído ao seu efeito redutor contra o dano oxidativo e seu efeito inibitório na infiltração neutrofílica em estômago de ratos (ODABASOGLU et al., 2006).

2.2.5. Antitumoral

A pesquisa desenvolvida por Ribeiro-Costa e colaboradores (2004) avaliou o efeito citotóxico do ácido úsnico livre e encapsulado em microesferas de PLGA contra carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2) demonstrando que a concentração requerida para inibir 50% da proliferação celular (CI_{50}) foi de 12,6 e 14,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H 292) também foram utilizadas na investigação da ação antiproliferativa do ácido úsnico livre e em nanocápsulas, os resultados desse trabalho exibiram uma atividade citotóxica considerável com CI_{50} de 10 e 13,8 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido úsnico livre e encapsulado, respectivamente (SANTOS et al., 2005).

A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada após administração intraperitoneal em camundongos Swiss de ácido úsnico livre e em microesferas foi avaliada contra Sarcoma-180

revelando uma importante inibição do tumor de 63% para o ácido úsnico encapsulado e de 42% para o composto livre (RIBEIRO-COSTA et al., 2004).

Na pesquisa desenvolvida por Santos e colaboradores (2006) também foi estudada a atividade antitumoral *in vivo* do ácido úsnico em sua forma livre e nanoencapsulado frente ao Sarcoma-180. Neste estudo, obteve-se um aumento da inibição tumoral do ácido úsnico em nanocápsulas (68%) quando comparado com o metabólito livre (43%).

2.3. Farmacocinética do ácido úsnico

Em 1992, Krishna e Venkatarama estudaram a farmacocinética do ácido úsnico em coelhos após a administração oral e intravenosa de doses de 20 e 5 mg/Kg de peso corporal, respectivamente. Os resultados encontrados demonstraram um tempo de meia-vida de 11 horas para a via intravenosa e de 18 horas para a via oral e uma biodisponibilidade absoluta de 77,8 % após administração oral.

2.4. Mecanismo de ação e toxicologia do ácido úsnico

O mecanismo de ação do ácido úsnico não está completamente elucidado. Porém, existem propostas relatadas na literatura que buscam esclarecer esse mecanismo. Fortes indícios relacionam o mecanismo de ação do ácido úsnico com a respiração celular. Pramyothin e colaboradores (2004) constataram que o (+) ácido úsnico age alterando a integridade da membrana celular, permitindo a liberação de enzimas hepatoespecíficas, principalmente das transaminases, além de causar destruição da função mitocondrial. Esse dano hepatocelular foi confirmado quando indivíduos, nos Estados Unidos, que consumiram LipoKinetix[®], um suplemento dietético que contém ácido úsnico como componente,

apresentaram falência aguda do fígado (NEFF et al., 2004). Essa destruição ocorreu devido ao aumento da produção de oxigênio reativo, uma forma de radical livre, pela cadeia transportadora de elétrons, levando à morte celular (HAN et al., 2004).

Desta forma, os maiores impedimentos com relação a sua introdução na terapêutica são sua baixa solubilidade em água, conseqüentemente nos líquidos biológicos, e seus efeitos hepatotóxicos. Estas dificuldades para a aplicação terapêutica do ácido úsnico podem ser superadas pela sua nanoencapsulação em sistemas de liberação controlada para diminuição da toxicidade e aumento da eficácia terapêutica. Estudos realizados demonstraram, através de análises bioquímicas e histopatológicas, que há uma redução da toxicidade do ácido úsnico quando este é inserido em sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como, nanocápsulas (SANTOS et al., 2006).

3. Sistemas de liberação controlada de fármacos

A tecnologia de liberação controlada de fármacos surgiu na década de 60, como um método comercialmente atrativo para administração do princípio ativo com liberação controlada, ou seja, com velocidade constante. Daí em diante, a liberação pôde ser manipulada para a produção de sistemas de liberação controlada ou prolongada da substância bioativa (SWARBRICK, 1996).

Os sistemas de liberação controlada (figura 3) apresentam dois objetivos principais: manter constante e dentro da faixa terapêutica a concentração sanguínea de uma determinada substância (fármaco), assegurando uma maior biodisponibilidade e reduzir os efeitos colaterais, realçando, assim, a adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens requeridas (MORA-HUERTAS et al., 2010).

Muitas patologias apresentam potencial de tratamento por meio da vetorização de fármacos. Especialmente no câncer, o aumento da permeabilidade vascular do tecido tumoral, decorrente da má formação da neovasculatura capilar, possibilita o extravasamento de carreadores de fármacos apresentando entre 10 a 700 nanômetros de diâmetro. Assim, a aplicação de sistemas de transporte vetorizado para o tratamento do câncer pode reduzir a incidência de efeitos tóxicos em relação às células saudáveis, reduzir a dose do agente quimioterápico para um dado grau de resposta terapêutica e assim, melhorar a eficácia terapêutica (HARLEY et al., 2008).

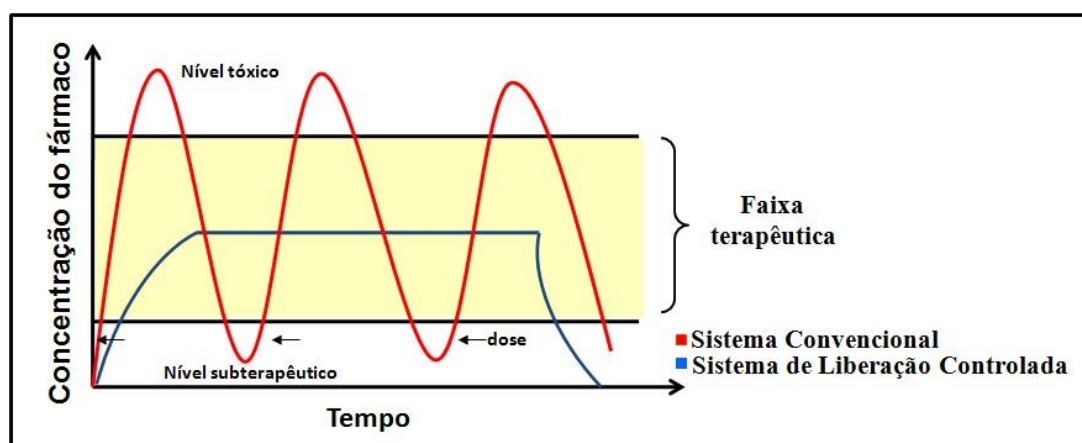


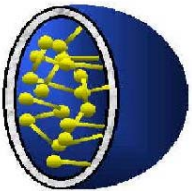
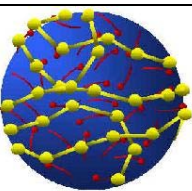
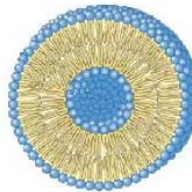
FIGURA 3. Perfil farmacocinético de doses múltiplas ou em sistema de liberação controlada de fármacos (LIRA, 2009).

O controle da liberação de fármacos ocorre através da utilização de carreadores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como, micropartículas, nanopartículas e lipossomas (Tabela I) oferecem diversas vantagens em relação às formas de dosagens convencionais, seja porque protegem os princípios ativos lábeis da degradação e/ou

inativação pelo suco gástrico e melhoram sua biodisponibilidade, ou determinam o aumento da penetração celular de substâncias hidrofílicas (WANDERLEY, 2007). Além disto, o direcionamento da substância biologicamente ativa ao sítio de ação desejado poderá, não somente melhorar a eficiência terapêutica, como também permitir a redução da quantidade do fármaco a ser administrada para obtenção da resposta biológica, minimizando os efeitos colaterais indesejáveis (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

TABELA I. Sistemas de liberação controlada de medicamentos (Adaptado de WANDERLEY, 2007).

Sistema	Descrição	Ilustração	Referência
Microcápsulas e Nanocápsulas	Sistemas vesiculares onde o fármaco é confinado em uma cavidade interna, a qual é revestida por membrana polimérica.		POHLMANN et al., 2002; NISHIOKA; YOSHINO, 2001.
Microesferas e Nanoesferas	Constituída por matriz polimérica densa, na qual o fármaco fica disperso.		
Lipossomas	Vesículas esféricas, constituídas por uma ou várias bicamadas lipídicas.		TORCHILIN, 2005.

Um sistema perfeito de liberação controlada de fármacos, embora ainda não alcançado, deve ser capaz de direcionar fármacos para o sítio alvo desejado, com a mínima exposição dos demais tecidos não desejados. Esse sistema de liberação de fármacos, por si só, deve ser farmacologicamente inativo, ter toxicidade mínima, ser prontamente metabolizado e depurado da circulação após ter exercido sua função. Além de ser confortável para o paciente, simples de se administrar e remover, fácil de fabricar e esterilizar (FORSSSEN; WILLIS, 1998; ZHOU et al., 2002).

A utilização de sistemas coloidais nanoestruturados, tais como as nanopartículas poliméricas, constitui uma estratégia para alterar a biodistribuição de fármacos após administração (TORCHILIN, 2006).

3.1. Nanopartículas

O termo nanopartículas é usado para definir partículas poliméricas coloidais que têm tamanho (diâmetro) que varia de 10 a 1000 nm. As nanopartículas são classificadas em nanoesferas e nanocápsulas (MOINARD-CHÉCOT et al., 2008). Estes dispositivos diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK et al., 2003). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, geralmente de natureza oleosa, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (figura 4) (VAUTHIER-HOLTZSCHERER et al., 1991; ALLÉMANN et al., 1993).

Nanocápsulas são potenciais carreadores de fármacos, com destaque a sua vantagem sobre outros sistemas coloidais no que se refere ao confinamento do fármaco no interior da

cavidade central, que confere uma adequada proteção ao princípio ativo frente à degradação no meio biológico, além de permitir a veiculação de moléculas hidrofóbicas porque as nanocápsulas aumentam a solubilidade de componentes hidrofóbicos em meio aquoso, (TORCHILIN, 2006). Ademais, quando se associam agentes bioativos a esses nanocarreadores, há redução da dosagem, alteração da farmacocinética e aumento da biodistribuição do fármaco nos órgãos-alvo, resultando em melhor eficácia terapêutica. Além disso, a toxicidade da droga é reduzida como consequência do acúmulo de princípio ativo no órgão de destino e menor concentração no tecido sadio, além de propiciarem um elevado potencial de interação com as superfícies biológicas, devido à sua habilidade de bioadesividade (ARANGO et al., 2000; KOO et al., 2005).

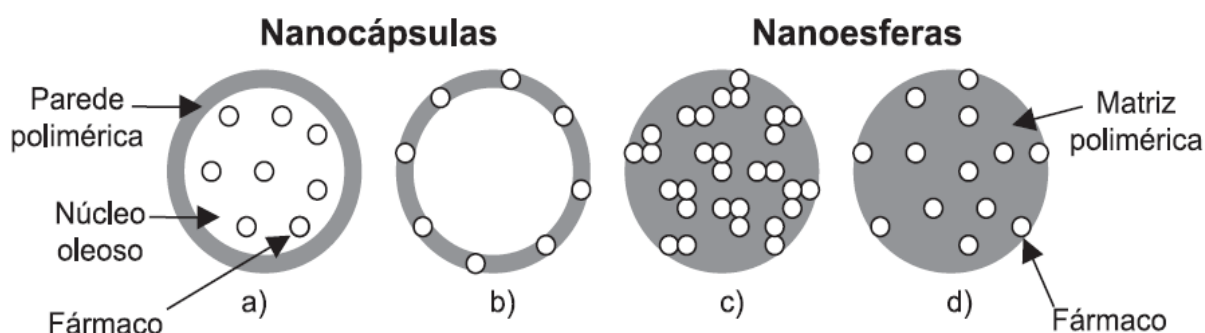


FIGURA 4. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. (SCHAFFAZICK et al., 2003).

3.1.1. Nanocápsulas furtivas

O principal obstáculo ao uso das nanocápsulas convencionais é que são rapidamente removidos do organismo pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM). Os macrófagos do SFM, que são tipicamente células de Kupffer ou macrófagos do fígado, são capazes de remover nanopartículas desprotegidas da circulação sanguínea segundos após a administração intravenosa, as tornando ineficazes como dispositivos de entrega de fármaco órgão-específico (GREF et al., 1994). Porém, esses macrófagos não podem identificar diretamente as nanopartículas, mas reconhecem proteínas opsoninas específicas ligadas a superfície dessas partículas (FRANK; FRIES, 1991).

Opsonização é o processo pelo qual um organismo ou partícula estranha ficam recobertos pelas proteínas opsoninas, o que os tornam mais visíveis para as células fagocitárias. Após a opsonização, a fagocitose, que é a captura e eventual destruição ou remoção do material estranho da circulação sanguínea, pode ocorrer. Juntos, esses dois processos formam o principal mecanismo de limpeza para a remoção de componentes indesejados no organismo (PERACCHIA et al., 1999; PLARD; BAZILE, 1999). Em regra geral, a opsonização de partículas hidrofóbicas em comparação às partículas hidrofílicas, ocorre mais rapidamente devido à maior adsorção de proteínas de soro do sangue em suas superfícies (MULLER et al., 1992; NORMAN et al., 1992).

Para evitar o reconhecimento das nanocápsulas pelo SFM, nanocápsulas furtivas (sistemas Stealth[®]) que são “invisíveis”, ou seja, menos visíveis, menos reconhecidos pelos macrófagos, foram desenvolvidos através da modificação da superfície da nanocápsulas pela ligação das cadeias do polímero polietilenoglicol (PEG) ao polímero constituinte da membrana da nanocápsula. Com isso, uma “nuvem” de cadeias hidrofílicas na superfície da

nanocápsula é formada, a qual diminui a opsonização e o reconhecimento por macrófagos, e, conseqüentemente, propicia um longo tempo de permanência no plasma (figura 5) (MOSQUEIRA et al., 2001).

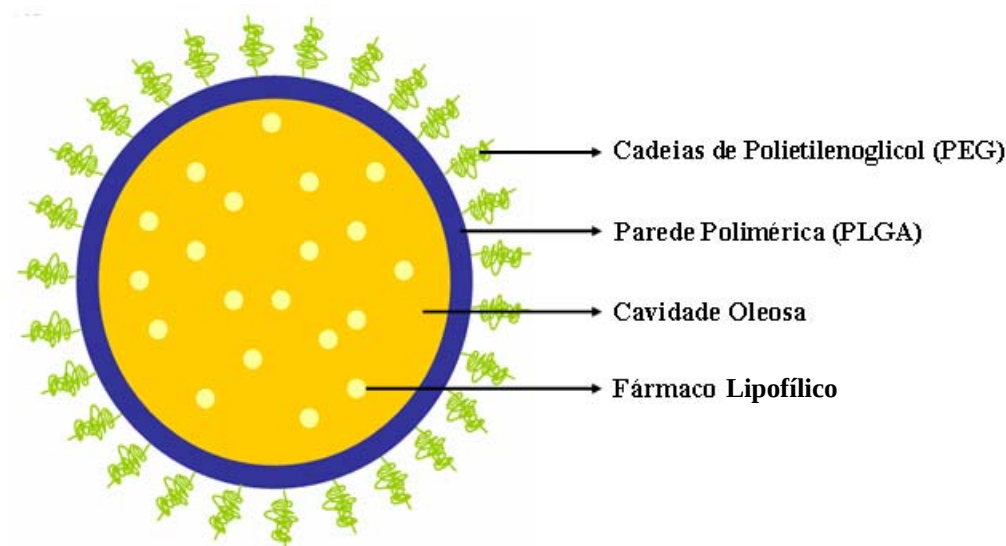


FIGURA 5. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas contendo cadeias de polietilenoglicol em sua superfície (furtivas).

O polietilenoglicol é um polímero hidrofílico, biodegradável e biocompatível que é usado na área farmacêutica para aumentar a biocompatibilidade dos materiais que entram em contato com o sangue (DORATI et al., 2007).

A natureza hidrofílica e flexível das cadeias de PEG na superfície das nanopartículas permite a essas cadeias adquirir uma conformação mais estendida quando estão livres numa solução. Conseqüentemente, quando as opsoninas e outras proteínas são atraídas para a superfície da partícula por forças de Van der Waals e outras forças, elas encontram as cadeias de PEG na superfície estendidas e começam a comprimi-las. Essa compressão modifica as cadeias de PEG para uma conformação mais condensada e de alta energia. Essa mudança na conformação cria uma força opoente repulsiva que, quando é grande o suficiente, pode

completamente equilibrar e/ou sobrepor à força atrativa entre a opsonina e a superfície da partícula (OWENS e PEPPAS, 2006).

Mosqueira e colaboradores (2001) mostraram que ligações covalentes das cadeias do polietilenoglicol reduzem a depuração das nanocápsulas pelos componentes do sangue após administração intravenosa e altera a biodistribuição destes dispositivos em camundongos.

Neste contexto, o desenvolvimento de um novo sistema de liberação controlada de medicamentos, nanocápsulas furtivas, capazes de viabilizar a administração do ácido úsnico em uma formulação que melhore sua solubilidade, bem como, diminua a dose terapêutica diminuindo os efeitos tóxicos e permaneça mais tempo na corrente sanguínea aumentando a eficácia terapêutica, torna-se uma inovação útil no desenvolvimento de alternativas para o tratamento do câncer.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral das nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico, visando uma futura aplicação terapêutica.

2. Objetivos Específicos

- Preparar nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico;
- Determinar as características físico-químicas das nanocápsulas, a fim de se estabelecer um perfil de estabilidade desse sistema carreador de fármaco;
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* do ácido úsnico, a partir das nanocápsulas;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* das nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.39, p.173, 1993.

ARANGO, M. A.; PONCHEL, G.; ORECCHIONI, A. M.; RENEDO, M.J.; DUCHÊNE, D.; IRACHE, J. M. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. **European journal of Pharmaceutical Sciences**. v.11, p.333-341, 2000.

ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. *Chemistry of Lichens Substances*. **Japan Society for the Promotion of Science**, Tokyo, 1954.

(BRASIL, 2007) Ministério da saúde. Levantamento avalia situação do câncer no Brasil Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude> > Acesso em: Abril de 2008.

BUSTINZA, F. Anticacterial substances from lichens. **Endeavour**. v. 10, p. 95-99, 1951.

CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, Paris, v.84, n.4, p.329-334, 2002.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P. L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 137-146, 2002.

DE CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Mícron**, v. 36, p. 155-161, 2005.

DORATI, R. GENTA, I; COLONNA ,C; MODENA ,T; PAVANETTO, F; PERUGINI, P; CONTI,B. Investigation of the degradation behaviour of poly(ethylene glycol-co-D,L-lactide) copolymer. **Polymer Degradation and Stability**, v.92, p.1660-1668, 2007.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 465-468, 2007.

FORSSSEN, E.; WILLIS, M. Ligand-targeted liposomes, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, p. 249-271, 1998.

FRANK, M; FRIES, L. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunology Today**, v.12, p.322–326,1991.

GREF, R.; DOMB, A.; QUELLEC, P.; BLUNK, T.; MULLER, R. H.; VERBAVATZ, J. M.; LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 215-233, 1995.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**. v. 26, p. 57-64, 2008.

HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 439-451, 2004.

INDEX MERCK. An enciclopedia of chemicals, drugs and biological. 11th ed., Rahway Merck & Co., 1606p., 1989.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A. C.; SKÚLASON, V.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 141-144, 1998.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Molecule of interest Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729-736, 2002.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2008, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal> > Acesso em: Março de 2008.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL. H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 1, p. 193-212, 2005.

KRISHNA, D. R.; VENKATARAMANA, D. Pharmacokinetics of D(+)-usnic acid in rabbits after intravenous and oral administration. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 20, p. 909-911, 1992.

LIRA, M. C. B. Complexo de Inclusão Ácido Úsnico : β -Ciclodextrina : Preparação, Caracterização e Nanoencapsulação em Lipossomas. 2007. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UFPE.

LIRA, M. C. B. Estudo da utilização de fucana como agente de direcionamento de nanopartículas para macrófagos. 2009. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFPE.

LIRA, M. C. B.; FERRAZ, M. S.; DA SILVA, D. G. V. C.; CORTES, M. E.; TEIXEIRA, K. I.; CAETANO, N. P.; SINISTERRA, R. D.; PONCHEL, G.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, p. 215-224, 2009.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach, **S. T. P. Pharma**, v. 1, p. 221-241, 1991.

MOINARD-CHÉCOT, D; CHEVALIER, Y; BRIANÇON, S; BENEY, L; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Jornaul of colloid and interface science**. v.317, p.458-468, 2008.

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

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; GULIK, A.; BOURDON, O.; GREF, R.; LABARRE, D.; BARRATT, G.. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocápsulas. **Biomaterials**. v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MULLER, R.H., WALLIS, K.H., TROSTER, S.D., KREUTER, J. In vitro characterization of poly(methyl-methaerylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate. **Journal of Controlled Release**, v.20, p, 237–246, 1992.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Appl Microbiol Biotechnolol**. V. 56, p. 9-16, 2001.

NEFF, G. W.; REDDY, K. R.; DURAZO, F. A.; MEYER, D.; MARRERO, R.; KAPLOWITZ, N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid. **Journal of Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1061-1067, 2004.

NISHIOKA, Y.; YOSHINO, H. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 55-64, 2001.

NISHIYAMA, M.; EGUCHI, H. Recent Advances in Cancer Chemotherapy: Current Strategies, Pharmacokinetics, and Pharmacogenomics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 367–368, 2009.

NORMAN, M.E., WILLIAMS, P., ILLUM, L. Human serum albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres. **Biomaterials**, v.13, p. 841–841, 1992.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induce gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 59-65, 2006.

Organização mundial de Saúde (OMS). National cancer control programmes. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/nccp/> > Acesso em: setembro de 2008.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 307, p. 93–102, 2006.

PERACCHIA, M.T.; FATTAL, E.; DESMAELE, D.; BESNARD, M.; NOEL, J.P.; GOMIS, J.M.; APPEL, M.; D'ANGELO, J.; COUVREUR, P. Stealth[®] PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. **Journal of Controlled Release**, v.60, p. 121–128, 1999.

PLARD J.; BAZILE, D. Comparison of the safety profiles of PLA50 and Me.PEG-PLA50 nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 16, p.173–183, 1999.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V. ; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres : development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

PRAMYOTHIN, P.; JANTHASOOT, W.; PONGNIMITPRASERT, N.; PHRUKUDOM, S.; RUANGRUNGSI, N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 381-387, 2004.

PROSKA, B.; STURDIKOVA, M.; PRONAYOVA, N.; LIPTAJ, T.. (+)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. **Pharmazie**, v. 51, p. 195-196, 1996.

RIBEIRO-COSTA, R. M.; ALVES, A. J.; SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; GONÇALVES, E. C. P.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 371-384, 2004.

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; 2000. p. 213-68.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E. C. G.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal Drug Delivery Science Technology**, v. 15, p. 355-361, 2005.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M. M. B.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. H.; SANTOS-MAGALHAES, N. S. **Eur J Pharm Biopharm**, v.64, p.154–160, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SINGH, R.; LILLARD JR, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 86, p. 215–223, 2009.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 1, 1996.

Takai, M.; Uehara, Y.; Beisler, J. A. Usnic Acid Derivatives as Potential Antineoplastic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. V. 22, 1979.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, p. 145-160, 2005.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1532–1555, 2006.

VAUTHIER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR, P.. **S T P Pharma Sciences S.T.P.**, v.1, p. 109, 1991.

VIJAUAKUMAR, C. S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M. K.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A. B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, v. 71, p. 564-566, 2000.

WANDERLEY, M.S.O. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Sistema Nanoparticulado Contendo Ácido Úsnico. 2007. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Mestrado em Bioquímica, UFPE.

ZHOU, S.; LIAO, X.; LI, X.; DENG, X.; LI, H. Poly-DL-lactide-co-poly (ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems. **Jornal of Controlled Release**, v. 8, n. 2-3, p. 195-205, 2002.

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

Nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico: Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral

Fábio José Fidélis Almeida^{1,2}, Milena Sales Ferraz^{1,3}, Larissa Morgana Santos Mendes¹,
Noemia Pereira da Silva Santos^{1,4}, Nereide Stela Santos-Magalhães^{1,2,3*}

¹Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
(LIKA)

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFPE

⁴Departamento de Biologia, Centro Acadêmico de Vitória, UFPE

*** Autor para correspondência:**

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brasil

Tel: +55 81 21268484; fax: +55 81 21268485

E-mail: nssm@ufpe.br

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral das nanocápsulas convencionais e furtivas contendo ácido úsnico (AU), visando uma futura aplicação terapêutica. Após testes de estabilidade das nanocápsulas em suspensão armazenadas a 4°C durante o período de 60 dias, não foram observadas modificações significativas relacionadas ao pH, tamanho e índice de polidispersão das partículas. Estes resultados comprovam a estabilidade dos nanocarreadores desenvolvidos. Ademais, as nanocápsulas convencionais e furtivas apresentaram eficiência de encapsulação do ácido úsnico e cargas de superfície adequadas. Uma liberação de AU em torno de 60% a partir das nanocápsulas de PLGA e PLGA-PEG foi alcançada em 48 h. O estudo *in vivo* comprovou a atividade antitumoral do AU livre e ainda foi observado que a nanoencapsulação do fármaco potencializou sua atividade anticancerígena. No entanto, não houve diferença significativa entre as preparações convencionais e furtivas. Em suma, foram obtidas nanocápsulas de PLGA-PEG furtivas estáveis com atividade biológica significativa, indicando que estes nanocarreadores são uma alternativa viável para a utilização do AU na terapia anticancerígena.

Unitermos: Câncer, ácido úsnico, nanocápsulas furtivas, PLGA-PEG, atividade antitumoral.

ABSTRACT

The goals of this study were to develop, characterize and evaluate the antitumor activity of conventional and stealth nanocapsules containing usnic acid (UA), intend to a future therapeutic application. After stability tests of nanocapsules in suspension form stored at 4°C for 60 days, no significant changes related to the pH, size and polydispersity of particles were observed. These results confirm the stability of nanocapsules. Moreover, both conventional and stealth nanocapsule formulations showed appropriate encapsulation efficiency and surface charges. A release of UA around 60% from the nanocapsules of PLGA and PLGA-PEG was achieved in 48 hours. The *in vivo* study confirmed the antitumor activity of free UA and showed that the drug loading into nanocapsules potentiated its antitumor activity. Summarizing, stable stealth PLGA-PEG nanocapsules were obtained with significant biological activity, indicating that these nanocapsules are an alternative to the use of UA in the anticancer therapy.

Keywords: Cancer, usnic acid, stealth nanocapsules, PLGA-PEG, antitumor activity.

INTRODUÇÃO

Apesar das melhorias no tratamento do câncer, os regimes quimioterápicos existentes que utilizam agentes anticancerígenos clássicos apresentam algumas limitações, que inclui um índice terapêutico estreito e efeitos citotóxicos em células sãs. Além disso, a resposta à quimioterapia pode variar significativamente entre os pacientes. Portanto, uma evolução da metodologia tradicional, baseada na necessidade de aumentar a eficácia terapêutica dos fármacos e diminuir a toxicidade em células normais, está sendo alcançada pela nanotecnologia farmacêutica (Harley e Frenkel, 2008; Nishiyama e Eguchi, 2009).

Os sistemas de liberação controlada nanométricos apresentam vantagens com relação aos sistemas terapêuticos convencionais no tratamento do câncer. Eles são capazes de manter constante e dentro da faixa terapêutica a concentração plasmática do fármaco, assegurando uma maior biodisponibilidade e uma redução dos efeitos colaterais, diminuindo o número de dosagens requeridas, realçando, assim, a adesão do paciente ao tratamento (Mora-Huertas et al., 2010). Desta forma, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores, tais como as nanopartículas, que são dispositivos multifuncionais, capazes de diagnosticar e tratar, de forma eficaz e segura, doenças com elevado índice de mortalidade como o câncer (Singh e Lillard Jr, 2009).

A fim de desenvolver novas alternativas para o tratamento do câncer, as substâncias de origem natural vêm recebendo atenção especial, dentre essas, o ácido úsnico (AU), um derivado liquênico que se destaca por apresentar várias atividades biológicas, incluindo a atividade antitumoral (Santos et al., 2005; 2006). No entanto, o AU apresenta algumas características desfavoráveis, tais como baixa solubilidade em água e uma elevada hepatotoxicidade (Ingólfssdóttir, 2002; Pramyothin et al., 2004; Santos et al., 2006). Com o

objetivo de contornar esses entraves da utilização do AU na terapêutica, foi proposta a nanoencapsulação em nanocápsulas convencionais de ácido polilático e glicólico (PLGA) (Santos et al., 2005; 2006). Esses trabalhos demonstraram o aumento da eficácia do AU pela nanoencapsulação. No entanto, o principal obstáculo ao uso das nanocápsulas convencionais é a sua rápida remoção da circulação sanguínea pelo sistema fagocitário mononuclear (Gref et al., 1995). Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento um novo sistema de liberação controlada capaz de viabilizar a administração do ácido úsnico por via parenteral. Nanocápsulas furtivas, de longa circulação sanguínea, preparadas com um copolímero de PLGA e polietilenoglicol (PLGA-PEG) contendo AU são então propostas para melhorar a sua eficácia e diminuir a hepatotoxicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Ácido úsnico, poloxamer 188 (Synperonic[®] F68), óleo de soja e Urethane[®] foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Fosfatidilcolina de soja (Epikuron[®] 200) foi adquirida da Lipoid (Dusseldorf, Alemanha). O copolímero de D, L-ácido láctico e ácido glicólico (PLGA 50/50, viscosidade inerente 0,57 dl / g) foi adquirido de Birmingham Polymers (EUA). O copolímero dibloco de PLGA e polietilenoglicol covalentemente ligado (PLGA-PEG, Resomer[®] RGP d50105; PLGA 50/50 45 kDa, contendo aproximadamente 10% PEG 5kDa) foi fornecido pela Boehringer Ingelheim (Alemanha). Os solventes utilizados no estudo foram obtidos da Merck (Hamburg, Alemanha). A água foi purificada por osmose reversa (Milli-Q, Millipore[®],EUA).

Preparação das nanocápsulas

As nanocápsulas convencionais (NC-PLGA) e furtivas (NC-PLGA-PEG) contendo ácido úsnico foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado proposto por Santos e colaboradores (2005). Resumidamente, uma mistura orgânica constituída por polímero (PLGA ou PLGA-PEG) (0,15 g), fosfatidilcolina de soja (0,15 g), óleo de soja (0,15 g) e ácido úsnico (0,01 g), foi dissolvida em acetona (15 mL). Esta fase orgânica foi adicionada lentamente e sob agitação mecânica (150 rpm) na fase aquosa contendo poloxamer solubilizado em 45 mL de tampão fosfato pH 7,4. As nanocápsulas foram formadas imediatamente após a mistura, e permaneceram sob agitação magnética por 30 minutos. O solvente orgânico foi removido sob evaporação a vácuo (Eyela NAJ-160, Tokyo Rikakikai Co. Ltd, Japão). Em seguida, a suspensão coloidal foi concentrada a um volume final de 10 mL para obter uma concentração de 1,0 mg/mL de ácido úsnico. As suspensões de nanocápsulas foram armazenadas a 4°C para os estudos de estabilidade.

Estudo de estabilidade e caracterização das nanocápsulas convencionais e furtivas

A estabilidade das nanocápsulas convencionais sem (NC-PLGA) e com ácido úsnico (NC-PLGA/AU) e as nanocápsulas furtivas sem (NC-PLGA-PEG) e com o ácido úsnico (NC-PLGA-PEG/AU), foram avaliadas através de estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo. Com relação aos estudos de atividade acelerada, após a preparação, amostras das suspensões de nanocápsulas foram submetidas à centrifugação (3.500 rpm por 1 hora a 25°C) e agitação mecânica horizontal (180 revoluções/min durante 48 horas a 37°C). O aspecto macroscópico (formação de sedimento, cremagem, exsudato oleoso, separação de fases) e microscópico (presença de aglomerados, cristais de AU e óleo), a avaliação do pH, a

determinação do tamanho e do índice de polidispersão das partículas foram avaliados após cada ensaio. Para avaliação da atividade a longo prazo, as amostras de nanocápsulas (armazenadas a 4°C) foram analisadas quanto aos aspectos macro e microscópicos, variações do pH, tamanhos de partículas e índices de polidispersão, em intervalos de tempos pré-determinados.

A caracterização físico-química foi realizada após a preparação das suspensões de nanocápsulas. As nanocápsulas convencionais e furtivas foram avaliadas com relação à distribuição do tamanho de partículas, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação, carga de superfície e cinética de liberação *in vitro*.

Tamanho de partículas e índice de polidispersão

O tamanho médio, a distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das nanocápsulas foram determinados por espectroscopia de autocorrelação de fótons (PCS), utilizando analisador de partículas a laser DelsaTMNano-S (Beckman Coulter, UK) em intervalos de tempo de: 0, 15, 30, 45 e 60 dias. As análises foram realizadas utilizando amostras diluídas em água deionizada (2:1) a 25°C com ângulo fixo de 90°. Os resultados obtidos através de três experimentos independentes foram apresentados como média $\pm$ D.P.

Determinação da eficiência de encapsulação

A concentração de ácido úsnico encapsulado nas nanocápsulas foi determinada por espectrofotometria UV após a aplicação da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação utilizando unidades filtrantes Microcon[®] (Millipore, EUA). Após a centrifugação das amostras de nanocápsulas (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japão) a 10.000 rpm por 1 h a 4°C, a

concentração de ácido úsnico no sobrenadante foi determinada a 280 nm (ULTROSPEC[®] 3000 Pro, Amersham Biosciences, Suécia), utilizando um método validado (Siqueira-Moura et al, 2008). Desta forma, a eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela diferença entre as concentrações do fármaco total na preparação e não encapsulada (livre no sobrenadante).

Carga de superfície

O potencial de carga superficial (potencial zeta) das nanocápsulas contendo ácido úsnico foi determinado por mobilidade eletroforética utilizando um Zetatrac Legacy (Microtrac, EUA). O potencial zeta das nanocápsulas foi medido após diluição em água deionizada a 25°C. Os resultados (média $\pm$ D.P.) são representantes de três experimentos independentes.

Estudo de liberação in vitro

Os estudos de liberação *in vitro* do ácido úsnico a partir das nanocápsulas convencionais e furtivas foram efetuados através da técnica de diálise em condições *sink*. Uma alíquota de 2 mL de ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas foi inserido em membrana de diálise (membrana de celulose *cut-off* = 15-20 $\times$, Sartorius, Göttingen, Alemanha), selada e imersa em becker contendo 250 mL de solução tampão fosfato (pH 7,4 , 0,2 M). O sistema foi mantido sob agitação a 100 rpm, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 h. Em intervalos de tempo pré-determinados (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 30, 48, 50, 52, 54, 72, 74, 76, 78, 80 e 96 h) alíquotas de 1 mL do meio foram retiradas e o ácido úsnico foi quantificado por espectrofotometria UV a 280 nm utilizando metodologia previamente validada (Siqueira-Moura et al., 2008). Após a retirada de cada alíquota, o meio da cinética foi repostado com uma

quantidade igual da solução tampão fosfato (1 mL) a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como porcentagem dos valores médios e seus respectivos desvios-padrão.

Ensaio de atividade antitumoral *in vivo*

Para desenvolvimento do estudo de atividade antitumoral foram utilizados 25 camundongos machos, albinos, da linhagem Swiss, com 45 a 60 dias de idade, e peso entre 40 a 50 gramas, procedentes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE (Recife, Brasil). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ração e água *ad libitum* e aclimatizados para um ciclo claro:escuro de 12 h:12 h. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 23076.020870/2009-63).

Primeiramente, foi inoculada uma suspensão celular ($5,0 \times 10^6$ células mL^{-1}) do tumor ascítico Sarcoma-180 (com sete dias de implantado), via subcutânea na região subaxilar dos camundongos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, consistindo de cinco animais cada. O tratamento foi iniciado 24 h após inoculação do tumor, e mantido durante sete dias consecutivos com injeções diárias (via i.p.) de uma suspensão de ácido úsnico em solução de bicarbonato de sódio (pH 8,0) ou do ácido úsnico nanoencapsulado (nanocápsulas convencionais e furtivas) utilizando uma dose de 15 mg / kg / dia durante sete dias. Os grupos controle foram tratados com solução salina. Após o tratamento os animais foram anestesiados com Urethane® e sacrificados por punção cardíaca.

A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado de acordo com a seguinte fórmula: %

inibição do tumor = $(C - T)/C \times 100$, onde C é o peso do tumor do grupo controle e T é o peso do tumor dos grupos tratados com ácido úsnico.

As amostras sanguíneas foram coletadas em microtubos MiniCollect® K3EDTA (Greiner Bio-One, Austria) para análise hematológica. Os parâmetros hematológicos, incluindo concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude de distribuição de células vermelhas (RDW), contagem de células brancas (WBC) e contagem de células vermelhas (RBC), foram analisados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

Os tumores e órgãos (fígado, rins, baço, coração e pulmão) dos animais foram dissecados, pesados e adequadamente tratados para posterior análise histopatológica. Os tecidos foram mantidos em solução tamponada de formalina a 10% até inclusões em parafina. Cortes (4 mm) da amostra de tecidos, fixados em Hematoxilina e corados em Eosina (HE) foram analisados por microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan). As análises histopatológicas foram realizadas no Centro Acadêmico de Vitória.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste t de Student's ($p \leq 0.05$). Os resultados experimentais foram expressos no formato de média $\pm$ D.P.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo de estabilidade e caracterização das nanocápsulas

Com relação aos testes de estabilidade acelerada, todas as formulações apresentaram estabilidade quando submetidas aos testes de simulação de transporte e armazenamento por agitação mecânica, ou seja, as formulações de nanocápsulas mantiveram suas aparências macroscópicas iniciais quando submetidas a testes de resistência ao estresse mecânico. Ademais, as formulações não apresentaram modificações físico-químicas significativas quando submetidas à centrifugação que simula a passagem acelerada do tempo.

No armazenamento a longo prazo a 4°C, a estabilidade das suspensões de nanocápsulas foi mantida por 60 dias. Após este período, apesar de apresentar homogeneidade macroscopicamente, as formulações apresentaram sinais microscópicos de instabilidade, tais como gotículas de óleo e presença de cristais de ácido úsnico. Esses resultados demonstram que ocorre instabilidade das nanocápsulas com liberação de moléculas do fármaco da cavidade oleosa interna, que cristalizam no meio aquoso externo das nanocápsulas.

Análise de pH

O pH das formulações foi avaliado logo após a preparação e por um período de 60 dias. Todas as formulações apresentaram um decréscimo nos valores de pH com o transcorrer do estudo, porém esta diminuição não foi significativa ($p \leq 0,05$) entres os grupos estudados (Tabela I). A variação de pH das nanocápsulas pode ter ocorrido devido à degradação dos constituintes das nanocápsulas, tais como o óleo, o polímero e os fosfolipídeos, tornando o

meio levemente ácido. Além disso, o ácido úsnico, no caso das nanocápsulas que continham o fármaco, vai sendo liberado por estes nanocarreadores com o passar do tempo, sendo também responsável por essa diminuição do pH. Resultados semelhantes foram obtidos em nanocápsulas de PLA, onde ocorreu um decréscimo significativo no pH das formulações (de $4,6 \pm 0,2$ a $3,8 \pm 0,1$) devido à degradação do PLA produzindo ácido láctico livre (Guterres et al., 1995) e em nanocápsulas de PLGA (de $7,40 \pm 0,03$ a $6,98 \pm 0,05$), também por degradação de seus constituintes (Santos et al., 2005).

TABELA I. Variação do pH das formulações das nanocápsulas convencionais e furtivas com e sem ácido úsnico durante o armazenamento a 4°C por 60 dias.

Formulações	Tempo (dias)					
	0	7	15	30	45	60
NC-PLGA	7,12±0,14	7,10±0,01	7,02±0,01	7,01±0,10	7,01±0,02	6,88±0,02
NC-PLGA-PEG	7,22±0,18	7,16±0,11	7,14±0,13	7,14±0,16	7,10±0,12	6,97±0,14
NC-PLGA/AU	7,30±0,02	7,25±0,15	7,25±0,21	7,24±0,15	7,21±0,18	7,07±0,19
NC-PLGA-PEG/AU	7,42±0,04	7,41±0,04	7,41±0,01	7,38±0,04	7,38±0,02	7,28±0,01

NC-PLGA e NC-PLGA-PEG = nanocápsulas convencionais e furtivas sem ácido úsnico, respectivamente.

NC-PLGA/AU e NC-PLGA-PEG/AU = nanocápsulas convencionais e furtivas com ácido úsnico, respectivamente.

Avaliação do tamanho e do índice de polidispersão das partículas

A distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das nanopartículas são parâmetros importantes a serem avaliados durante o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, visto que indicam o grau de uniformidade de tamanho e da dispersão de uma amostra (Schaffazick et al., 2003).

Os resultados obtidos na avaliação do diâmetro médio de partículas das suspensões de nanocápsulas após a preparação encontram-se demonstrados na Figura 1. Partículas

apresentando diâmetro médio menor que 150 nm foram obtidas com a utilização de PLGA e PLGA-PEG, tamanho este considerado apropriado para administração *in vivo* de nanocápsulas através da via intraperitoneal (Santos et al., 2006). Além disso, os valores iniciais de índice de polidispersão menores que 0,3 (Figura 2) indicam a presença de populações monodispersas de partículas ou apresentando uma faixa estreita de distribuição do tamanho das partículas. Por outro lado, a utilização dos polímeros diblocos PLGA-PEG nas nanocápsulas furtivas conduziu a um aumento de aproximadamente 20% do tamanho das partículas. Este efeito ocorre devido à presença das cadeias de PEG na superfície das nanocápsulas, as quais são responsáveis pelo aumento do seu diâmetro (Mosqueira et al., 2001).

No presente estudo, o tamanho e o índice de polidispersão das nanocápsulas também foram avaliados durante 60 dias como pode ser visualizado nas Figuras 1 e 2, onde não foi observado um aumento significativo destes dois parâmetros ao longo do tempo de armazenamento. Esses resultados mostram que com o passar do tempo, as nanocápsulas contendo ou não com o fármaco, mantiveram sua estabilidade quanto ao tamanho de partículas.

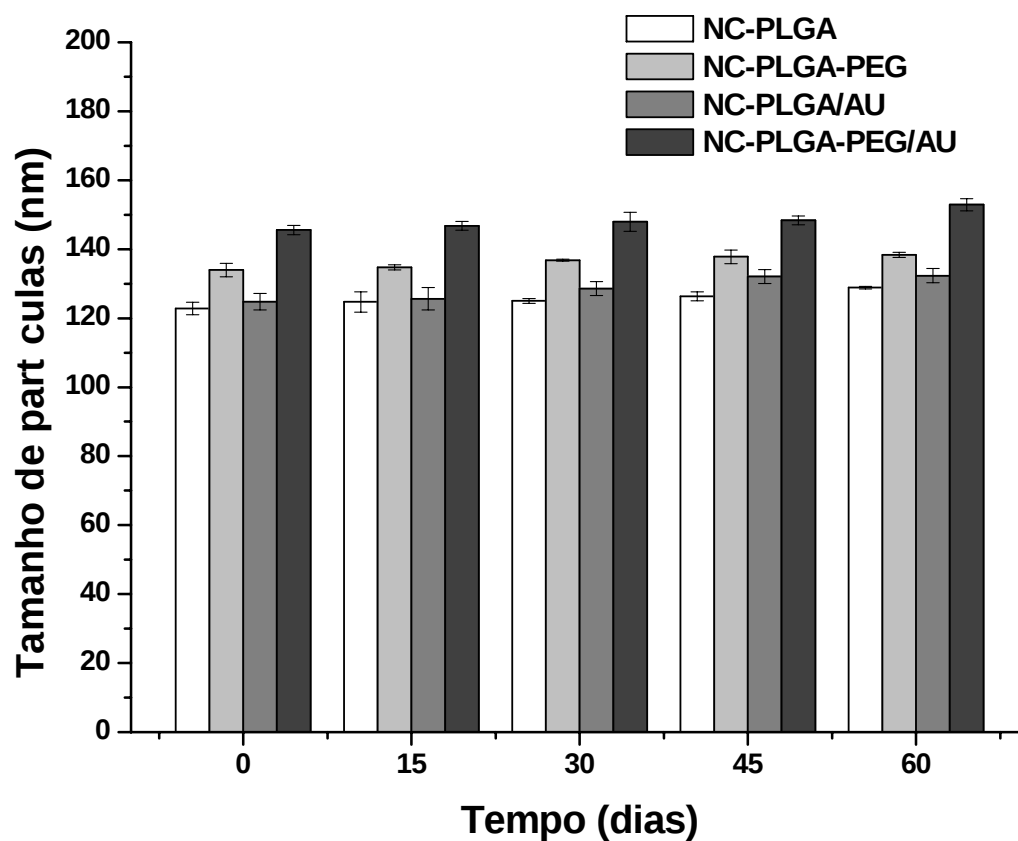


FIGURA 1. Variação do tamanho de partículas médio das nanocápsulas convencionais e furtivas com e sem ácido úsnico durante o armazenamento a 4°C por 60 dias: NC-PLGA= nanocápsulas convencionais sem ácido úsnico; NC-PLGA-PEG = nanocápsulas furtivas sem ácido úsnico; NC PLGA/AU = nanocápsulas convencionais com ácido úsnico; NC-PLGA-PEG/AU = nanocápsulas furtivas com ácido úsnico.

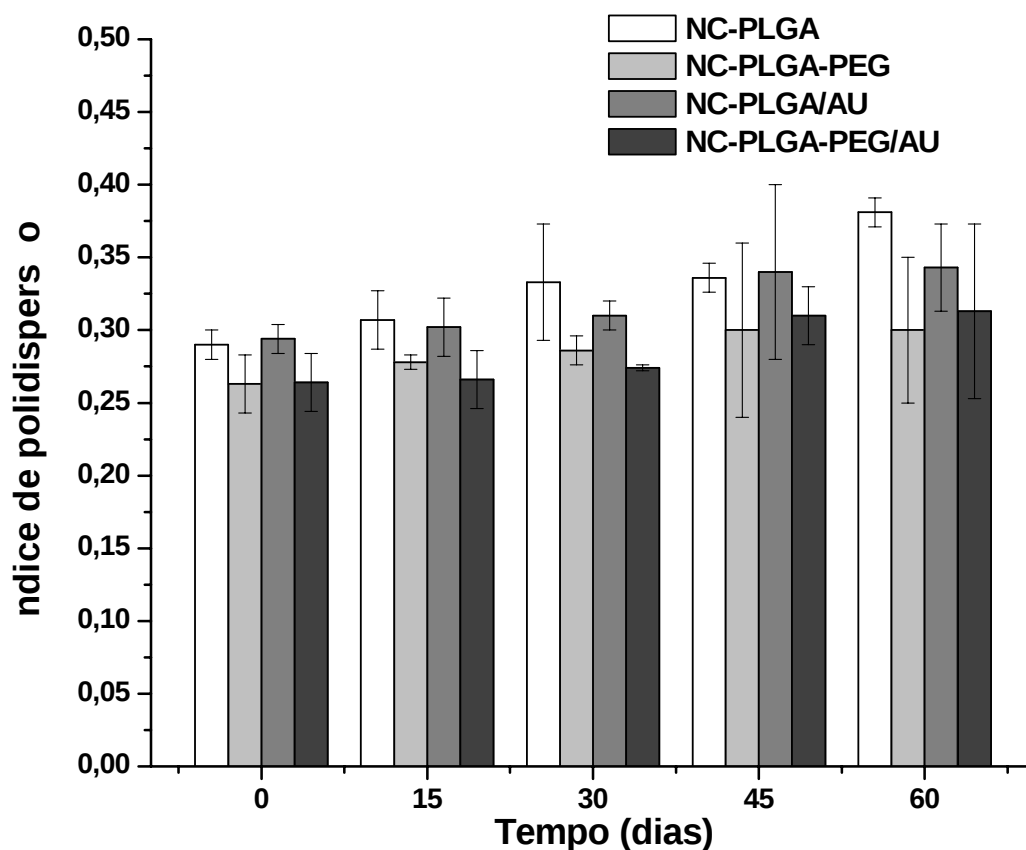


FIGURA 2. Variação do índice de polidispersão das nanocápsulas convencionais e furtivas com e sem ácido úsnico durante o armazenamento a 4°C por 60 dias. NC-PLGA= nanocápsulas convencionais sem ácido úsnico; NC-PLGA-PEG = nanocápsulas furtivas sem ácido úsnico; NC PLGA/AU = nanocápsulas convencionais com ácido úsnico; NC-PLGA-PEG/AU = nanocápsulas furtivas com ácido úsnico.

Determinação da eficiência de encapsulação

Neste estudo, valores elevados da eficiência de encapsulação do ácido úsnico em nanocápsulas convencionais (NC PLGA/AU = $97,1 \pm 0,26\%$) e furtivas (NC PLGA-PEG/AU = $96,8 \pm 0,30\%$) foram obtidos. Esses resultados corroboram com resultados anteriores obtidos

por Santos e colaboradores (2005) para nanocápsulas convencionais (NC-PLGA/AU) contendo AU ($99,4 \pm 0,2\%$).

Segundo Cauchetier e colaboradores (2003), quando se utiliza a técnica da nanoprecipitação são obtidas nanocápsulas com alta capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos de um modo efetivo e reprodutível, devido a sua cavidade central oleosa. De fato, a incorporação de fármacos lipofílicos em nanocápsulas tem demonstrado ser altamente dependente do grau de lipofilia do fármaco e de sua afinidade pelo óleo empregado na preparação das nanocápsulas, além do pH do meio. Resultados de eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos em suspensões de nanocápsulas de aproximadamente 100% foram verificados em diversos trabalhos (Ammoury et al., 1990; Guterres et al., 1995; Rodrigues Jr et al., 1995).

Carga de superfície

Os valores de potencial zeta das nanocápsulas situaram-se na faixa de -18,96 a -29,42 mV, indicando uma boa estabilidade das formulações. O potencial zeta é um parâmetro que está relacionado à carga de superfície de partículas em suspensão e depende principalmente da natureza química do polímero, da natureza química do agente estabilizante e do pH do meio. Quando as nanocápsulas são preparadas a partir de polímeros de poliéster, são obtidos valores de potencial negativos devido à presença de grupos carboxílicos terminais do polímero. Porém, a literatura não relata nenhum valor específico para medição de potencial zeta, no entanto, na maioria dos casos relatados na literatura, os valores de potencial zeta das nanocápsulas apresentam-se na faixa de -20 a -30 mV, o que permite prever uma boa

estabilidade coloidal, devido a uma alta energia de limitação entre partículas (Mora-Huertas et al., 2010).

Entretanto, valores mais negativos do potencial zeta foram obtidos para as nanocápsulas convencionais ($-29,42 \pm 0,39$ mV) e furtivas ($-27,09 \pm 1,72$ mV) contendo ácido úsnico com relação às nanocápsulas convencionais ($-20,33 \pm 2,11$ mV) e furtivas ($-18,96 \pm 1,66$ mV) sem ácido úsnico. Estes valores de potencial zeta das nanocápsulas contendo ácido úsnico indicam presença de uma maior quantidade de cargas negativas na superfície das partículas e sugerem a presença de moléculas do fármaco adsorvidas na parede polimérica das nanocápsulas, além daquelas encapsuladas na cavidade oleosa interna. Essa configuração das nanocápsulas NC-PLGA/AU ou NC-PLGA-PEG/AU contendo moléculas de AU na parede polimérica aumenta o potencial zeta em aproximadamente 10 mV e impede o mascaramento das cargas negativas dos grupos carboxílicos terminais do PLGA pelas moléculas de PEG (Neckel; Lemos-Senna et al., 2005). De acordo com a literatura, o potencial zeta pode ser utilizado para avaliar se o fármaco encontra-se no interior da matriz polimérica de nanopartículas ou cavidade oleosa de nanocápsulas ou adsorvido na superfície de nanocarreadores (Magenheim e Benita, 1991; Calvo et al., 1997; Wischke e Schwendeman, 2008).

Estudo de liberação in vitro

Os perfis de liberação do ácido úsnico a partir das nanocápsulas convencionais e furtivas estão demonstrados na Figura 3. Efeitos *burst* de $14 \pm 1,71\%$ e $12 \pm 0,35\%$ foram observados nas primeiras 2 h de liberação do AU a partir de NC-PLGA/AU e NC-PLGA-PEG/AU respectivamente. O máximo de liberação do fármaco foi atingido em 48 h em torno

de $60 \pm 0,09\%$ e $57 \pm 0,66\%$ do seu conteúdo inicial, para as nanocápsulas convencionais e furtivas, respectivamente.

As cinéticas de liberação do ácido úsnico a partir das formulações NC-PLGA/AU e NC-PLGA-PEG/AU foram ajustadas pelo modelo exponencial baseado na lei de difusão de *Fick* de acordo com a equação $M_t / M_\infty = (1 - k_1 \cdot e^{-k_2 t})$, com excelente grau de correlação com os dados experimentais, $r \geq 0,98$. A partir deste modelo exponencial, foram determinadas as constantes de velocidade de liberação (k_2) do fármaco para as nanocápsulas convencionais e furtivas, sendo de $0,134 \pm 0,026$ e $0,107 \pm 0,003$, respectivamente.

As cinéticas de liberação do AU durante as primeiras doze horas das formulações NC-PLGA/AU e NC-PLGA-PEG/AU para foram ajustadas com o modelo linear de raiz quadrada do tempo (inserts A e B da Figura3, respectivamente). Os sistemas apresentaram um perfil de liberação gradual e controlado até 12 h, com velocidades de $297,96 \pm 3,14 \mu\text{g/h}$ e $288,63 \pm 5,04 \mu\text{g/h}$ para NC-PLGA/AU e NC-PLGA-PEG/AU, respectivamente. Destes resultados do perfil de cinética de liberação *in vitro*, verifica-se que a presença das cadeias de PEG na superfície das nanocápsulas furtivas não afetou de forma significativa a velocidade de liberação do ácido úsnico a partir das nanocápsulas.

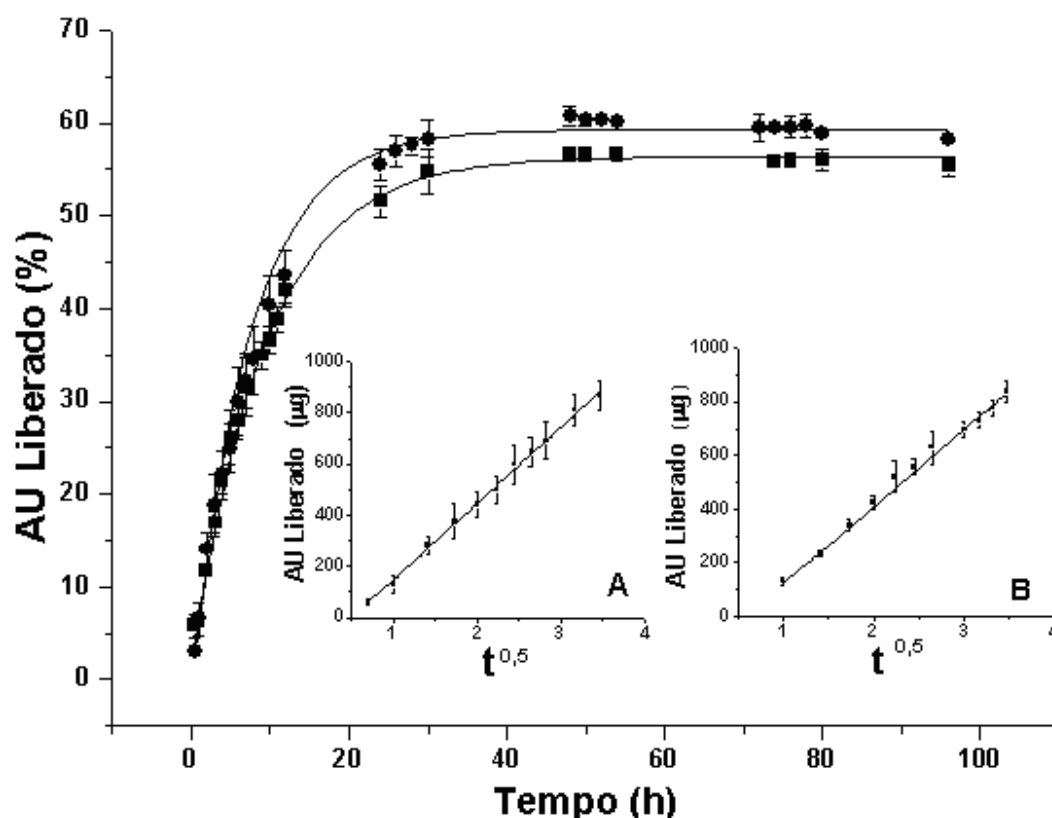


FIGURA 3. Perfil de liberação do ácido úsnico a partir das nanocápsulas convencionais (●) e furtivas (■) sob condições *sink*. Cada ponto representa a média de três experimentos diferentes $\pm$ desvio padrão. As linhas representam o ajuste ao modelo exponencial baseado na lei de difusão de Fick.

Insert: Gráfico do ajuste da liberação do ácido úsnico pela raiz quadrada do tempo ($t = 12h$) das nanocápsulas NC-PLGA/AU (A) e NC-PLGA-PEG/AU (B). As linhas representam o delineamento do modelo linear.

Ensaio de atividade antitumoral

O estudo da atividade antitumoral mostrou que o ácido úsnico nanoencapsulado promoveu uma inibição da massa tumoral em torno de $54,58 \pm 3,58\%$ e $56,87 \pm 7,41\%$ para as nanocápsulas convencionais e furtivas, respectivamente (Figura 4). Portanto, destes resultados não são observadas variações significativas na atividade antitumoral do AU em relação aos dois nanocarreadores. Quando comparado ao grupo tratado com o fármaco livre, observou-se

que a nanoencapsulação potencializou a ação do fármaco em torno de 26%, pois a forma livre inibiu apenas $29,31 \pm 10,96\%$ do crescimento tumoral.

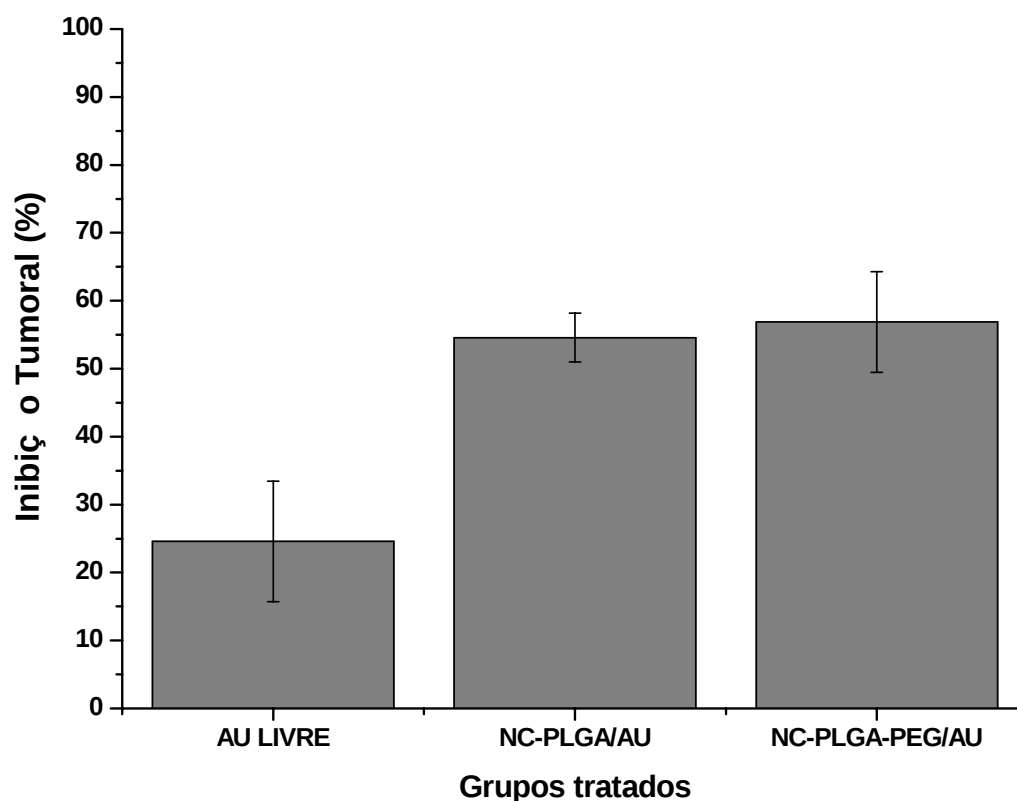


FIGURA 4. Avaliação da atividade antitumoral do ácido úsnico livre e nanoencapsulado frente a Sarcoma 180 em camundongo: AU Livre (ácido úsnico em suspensão), NC-PLGA/AU (ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas convencionais) e NC-PLGA-PEG/AU (ácido úsnico encapsulado em nanocápsulas furtivas).

Em relação à análise hematológica dos animais (Tabela II), alterações significantes não foram observadas nos índices hematométricos dos animais tratados e não tratados, quando comparados com o controle negativo, exceto nos níveis de WBC. Neste caso, foi observada uma elevação nos níveis do WBC, quando comparamos os animais inoculados com sarcoma-180 com os saudáveis (Controle negativo = $3,2 \pm 0,12$). Isso pode ser um indicativo de que o

organismo dos animais doentes está passando por um processo inflamatório, justificando assim o aumento nos níveis de células brancas no sangue. Contudo, nos animais tratados com o ácido úsnico nanoencapsulado, este aumento foi menor ($WBC = 10,5 \pm 0,52$ e $10,5 \pm 0,10$, nanocápsulas convencionais e furtivas, respectivamente) quando comparado ao grupo tratado com o ácido úsnico livre ($WBC = 12,4 \pm 1,22$), sugerindo que houve uma maior eficácia na ação do fármaco e, conseqüentemente, uma diminuição do processo inflamatório associado ao tumor.

TABELA II. Análise hematológica de animais tratados com ácido úsnico livre e nanoencapsulado.

Formulações	Parâmetros Hematológicos							
	WBC $10^3/\mu\text{l}$	RBC $10^6/\mu\text{l}$	Hb g/dL	Hct (%)	VCM	HCM	CHCM	RDW
^a Controle (-)	$3,2 \pm 0,12$	$10,4 \pm 0,03$	$18,5 \pm 0,05$	$51,0 \pm 0,44$	$52,8 \pm 0,49$	$17,8 \pm 0,05$	$33,4 \pm 0,57$	$16,6 \pm 0,45$
^b Controle (+)	$14,0 \pm 1,22$	$9,4 \pm 0,40$	$16,2 \pm 0,81$	$52,9 \pm 2,40$	$55,6 \pm 0,25$	$18,1 \pm 0,11$	$32,4 \pm 0,05$	$17,8 \pm 0,17$
AU	$12,4 \pm 1,22$	$8,5 \pm 0,15$	$16,1 \pm 0,35$	$52,2 \pm 0,69$	$57,4 \pm 0,30$	$18,3 \pm 0,05$	$31,9 \pm 0,34$	$20,5 \pm 0,30$
NC PLGA/AU	$10,5 \pm 0,52$	$9,1 \pm 0,05$	$16,6 \pm 0,01$	$53,7 \pm 0,32$	$58,9 \pm 1,07$	$17,3 \pm 0,55$	$30,5 \pm 0,34$	$21,3 \pm 0,86$
NC PLGA-PEG/AU	$10,5 \pm 0,10$	$8,7 \pm 0,39$	$15,8 \pm 0,17$	$50,1 \pm 0,85$	$58,5 \pm 0,88$	$17,1 \pm 0,15$	$33,1 \pm 0,20$	$21,5 \pm 0,37$

^a Controle (-) animais saudáveis e controle (+) animais com Sarcoma 180 não tratados. ^b Contagem de células brancas (WBC), contagem de células vermelhas (RBC), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude de distribuição de células vermelhas (RDW).

A análise histopatológica do tumor e do fígado dos animais tratados e não-tratados com AU livre e encapsulado em nanocápsulas convencionais e furtivas estão representadas nas Figuras 5 e 6 respectivamente. Micrografias dos tumores revelaram células pleomórficas e anaplásicas, com relações ao núcleo-citoplasma aumentadas. Os núcleos intensamente corados das células neoplásicas demonstravam cromatina frouxa e nucléolos proeminentes. Observaram-se várias figuras de mitoses típicas e atípicas. O estroma estava constituído por escassas fibras colágenas e delicados capilares. Áreas de necrose variáveis e focos de

hemorragia também foram detectados, além da invasão de tecido muscular estriado esquelético, tecido adiposo unilocular, nervos e vasos sanguíneos, caracterizando, portanto, um comportamento agressivo local. Nos animais tratados com ácido úsnico livre e nanoencapsulado, áreas de necrose intensa foram observadas, como podem ser visualizadas na Figura 5, confirmando a ação antitumoral do ácido úsnico frente ao Sarcoma-180 (Santos et al., 2006).

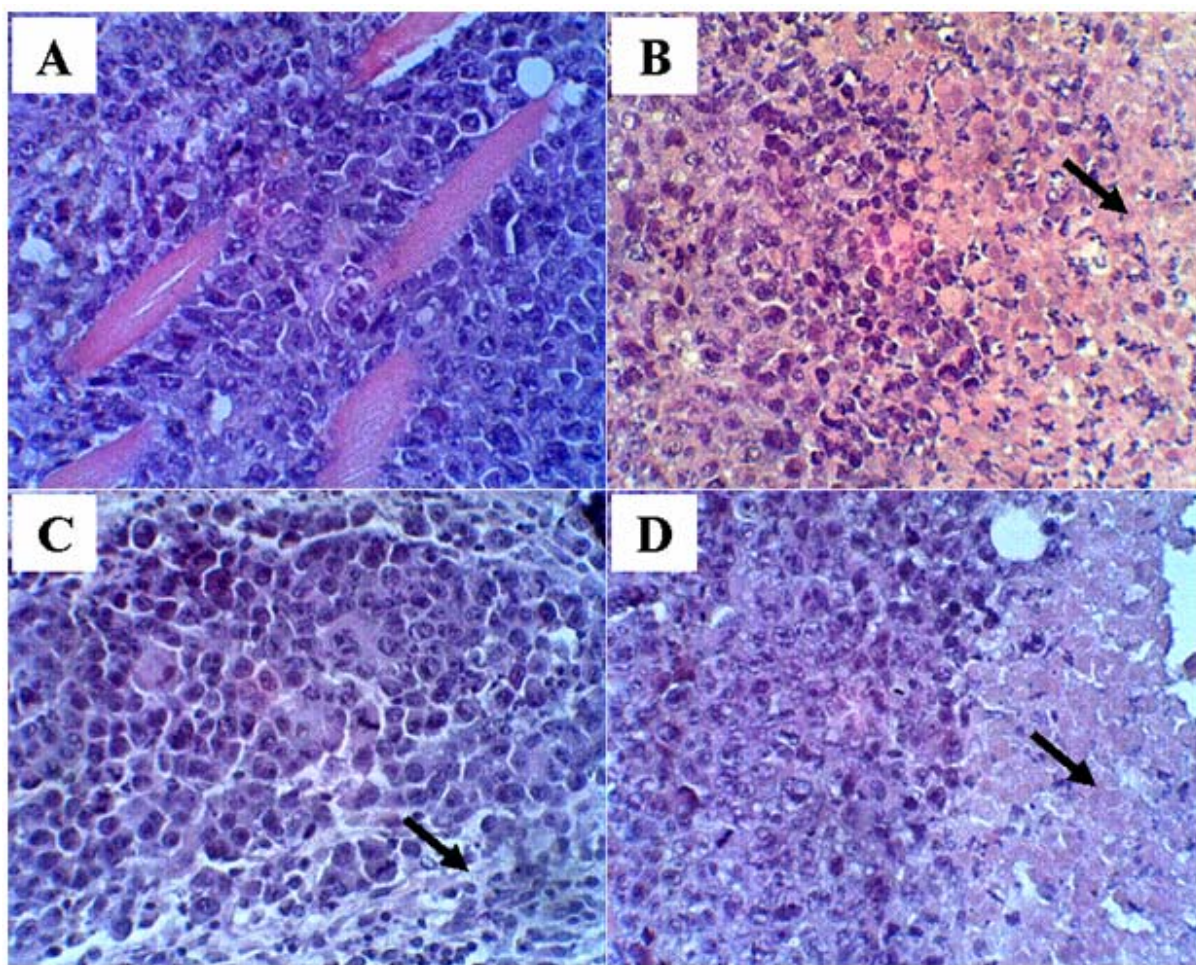


FIGURA 5. Análise histopatológica do tumor dos animais (HE, 400x): A) Grupo controle; B) AU livre; C) Nanocápsulas convencionais contendo AU; D) Nanocápsulas furtivas contendo AU. As setas indicam áreas de necrose.

Alterações histológicas não foram observadas no baço, rins, coração ou pulmão de qualquer um dos animais tratados com ácido úsnico livre ou encapsulado, entretanto, no estudo histopatológico do fígado alterações foram encontradas. Este órgão apresentou arquitetura lobular com veias hepáticas regularmente distribuídas nos animais. O sistema porta de todos os animais estava bem conservado. No seio do lóbulo, os hepatócitos dos animais do grupo controle apresentaram na grande extensão do parênquima como elementos isomorfos com hepatócitos bem preservados. No entanto, no fígado dos animais tratados com o fármaco livre, foram identificadas degeneração microvacuolar e alterações nucleares nos hepatócitos. Porém, estas alterações foram reduzidas de forma significativa quando os animais foram tratados com o composto nanoencapsulado (Figura 6).

Esses resultados corroboram dados anteriores descritos na literatura (Santos et al., 2006). Pramyothin e colaboradores (2004) constataram que o ácido úsnico age alterando a integridade da membrana celular, permitindo a liberação de enzimas hepatoespecíficas, principalmente das transaminases, além de causar destruição da função mitocondrial. Esse dano hepatocelular foi confirmado quando indivíduos, nos Estados Unidos, que consumiram LipoKinetix[®], um suplemento dietético que contém ácido úsnico como componente, apresentaram falência aguda do fígado (Neff et al., 2004). Essa destruição se dá devido ao aumento da produção de oxigênio reativo, uma forma de radical livre, pela cadeia transportadora de elétrons, levando à morte celular (Han et al., 2004).

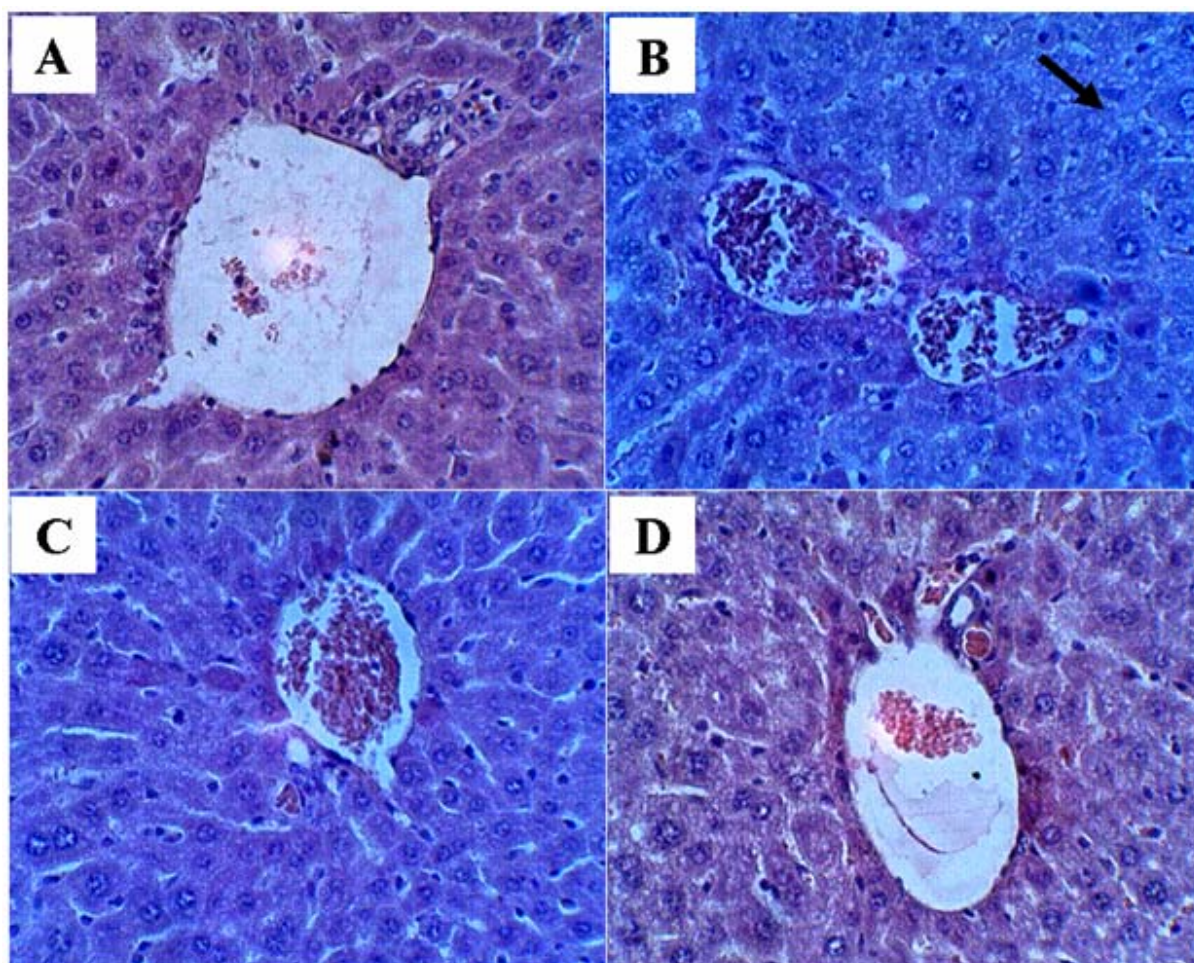


FIGURA 6. Análise histopatológica do fígado dos animais (HE, 400x): A) Grupo controle; B) AU livre; C) Nanocápsulas convencionais contendo AU; D) Nanocápsulas furtivas contendo AU. A seta indica área de degeneração microvacuolar.

CONCLUSÕES

Com o presente estudo, foram obtidas nanocápsulas convencionais e furtivas estáveis, sem variações significativas de pH, tamanho de partículas e índice de polidispersão das nanocápsulas sob a forma de suspensão durante o armazenamento a 4°C por 60 dias. Em relação à caracterização, foram obtidas eficiências de encapsulação elevadas do ácido úsnico, próximas a 100%, além de cargas de superfície que garantem a estabilidade das partículas de

acordo com a literatura. Através do estudo da cinética de liberação *in vitro*, conseguiu-se traçar um perfil de liberação do ácido úsnico com um máximo de aproximadamente 60% em 24 h. Na avaliação da atividade antitumoral, confirmou-se a atividade anticancerígena do ácido úsnico livre, a qual foi potencializada após a sua encapsulação em nanocápsulas convencionais e furtivas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro parcial (Processo No. 474071/2007-3) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD INF/nº1415/2007).

REFERÊNCIAS

Ammoury, N.; Fessi, H.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F.; Benita, S.. In vitro release kinetic pattern of indomethacin from poly-(D,L-lactide) nanocapsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 79, p. 763–767, 1990.

Calvo, P.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M. J.. Effect of lysozyme on the stability of polyester nanocapsules and nanoparticles: stabilization approaches. **Biomaterials**. v. 18, p. 1305-1310, 1997.

Cauchetier, E. ; Deniau, M. ; Fessi, H. ; Astier, A.; Paul, M.. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 250, p. 273-281, 2003.

Gref, R.; Domb, A.; Quellec, P.; Blunk, T.; Muller, R. H.; Verbavatz, J. M.; Langer, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 215-233, 1995.

Guterres, S.S.; Fessi, H.; Barratt, G.; Devissaguet, J. P.; Puisieux F.. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 113, p. 57-63, 1995.

Haley, B.; Frenkel, E.. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**. v. 26, p. 57-64, 2008.

Han, D.; Matsumaru, K.; Rettori, D.; Kaplowitz, N.. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 439-451, 2004.

Ingólfssdóttir, K.. Molecule of interest Usnic acid. **Phytochemistry**, v. 61, p. 729-736, 2002.

Magenheim, B.; Benita, S.. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach, **S. T. P. Pharma**, v. 1, p. 221-241, 1991.

Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A.. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 385, p. 113-142, 2010.

Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D.; Barratt, G.. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocápsulas. **Biomaterials**. v. 22, p. 2967-2979, 2001.

Neckel G. L.; Lemos-Senna, E.. Preparação e Caracterização de Nanocápsulas Contendo Camptotecina a partir do Ácido poli (D,L-lático) e de Copolímeros Diblocos do Ácido Poli (D,L-lático) e Polietilenoglicol. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 24, p. 504-11, 2005.

Neff, G. W.; Reddy, K. R.; Durazo, F. A.; Meyer, D.; Marrero, R.; Kaplowitz, N. Severe hepatotoxicity associated with the use of weight loss diet supplements containing ma huang or usnic acid. **Journal of Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1061-1067, 2004.

Nishiyama, M.; Eguchi, H.. Recent Advances in Cancer Chemotherapy: Current Strategies, Pharmacokinetics, and Pharmacogenomics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 367–368, 2009.

Pramyothin, P.; Janthasoot, W.; Pongnimitprasert, N.; Phrukudom, S.; Ruangrunsi, N.. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat

hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 381-387, 2004.

Rodrigues Jr., J. M.; Fessi, H. ; Bories, C.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.-Ph.. Primaquine-loaded poly (lactide) nanoparticles: physicochemical study and acute tolerance in mice. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 126, p. 253-260, 1995.

Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Silva, J. F.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S.. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal Drug Delivery Science Technology**, v. 15, p. 355-361, 2005.

Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Wanderley, M. S. O.; Pontes-Filho, N. T.; Silva, J. F.; Castro, C. M. M. B.; Pereira, E. C.; Silva, N. H.; Honda, N. H.; Santos-Magalhaes, N. S.. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.64, p.154–160, 2006.

Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

Singh, R.; Lillard Jr, J. W.. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 86. p. 215–223, 2009.

Siqueira-Moura, M. P.; Lira, M.C.B.; Santos-Magalhães, N.S.. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 621-628, 2008.

Wischke, C.; Schwendeman, S. P.. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 364, p. 298–327, 2008.

CONCLUSÕES

- Foram obtidas nanocápsulas convencionais e furtivas estáveis, sem variações significativas de pH, tamanho de partículas e índice de polidispersão ao longo do estudo, sendo desta forma possível a realização dos demais experimentos do trabalho;
- Em relação à caracterização, foram obtidas elevadas eficiências de encapsulação, próximas a 100%, sendo isso possível devido às nanocápsulas apresentarem um núcleo oleoso o qual favorece a encapsulação do ácido úsnico por ser uma molécula lipofílica. Além disso, as cargas de superfície obtidas estavam de acordo com a literatura, onde foi possível diferenciar as nanocápsulas convencionais e furtivas e as que continham ou não o ácido úsnico;
- As nanocápsulas de PLGA e PLGA-PEG apresentaram perfis de liberação gradual e controlada do ácido úsnico até as primeiras 12h da cinética, atingindo um máximo de fármaco liberado em torno de 60 % do seu conteúdo inicial em 48h, confirmando assim que as nanocápsulas apresentaram características de sistemas de liberação controlada. Além disso, as nanocápsulas convencionais apresentaram uma velocidade de liberação do ácido úsnico levemente maior em relação às furtivas, sugerindo que essa diferença pode ter ocorrido devido à presença das cadeias de PEG que estão na superfície das nanocápsulas, dificultando a liberação do ácido úsnico;

- Na avaliação antitumoral, confirmou-se a atividade anticancerígena do ácido úsnico livre, onde foi observada uma redução de aproximadamente 30% da massa tumoral, a qual foi potencializada após a encapsulação do princípio ativo nas nanocápsulas convencionais e furtivas, elevando essa inibição para em torno de 55%;
- Não foram observadas alterações significantes nos índices hematimétricos dos animais tratados e não tratados, quando comparados com o controle negativo, exceto nos níveis de WBC onde um aumento foi observado. Contudo, os animais tratados com o ácido úsnico nanoencapsulado, este aumento foi menor quando comparado ao grupo tratado com o ácido úsnico livre, sugerindo que houve uma maior eficácia na ação do fármaco e, conseqüentemente, uma diminuição do processo inflamatório;
- Na análise histopatológica, os animais tratados com ácido úsnico livre e nanoencapsulado, apresentaram áreas de necrose intensa, confirmando a ação antitumoral do ácido úsnico frente ao Sarcoma-180. Alterações histológicas não foram observadas no baço, rins, coração ou pulmão de qualquer um dos animais tratados com ácido úsnico livre ou encapsulado, entretanto, no estudo histopatológico do fígado, alterações foram encontradas, contudo, estas alterações foram reduzidas de forma significativa quando os animais foram tratados com o ácido úsnico encapsulado.
- Estes resultados sugerem que a nanoencapsulação do ácido úsnico pode potencializar sua atividade antitumoral, desse modo permitindo o seu uso para aplicação terapêutica.

ANEXOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** / *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* tem por finalidade publicar os seguintes tipos de publicação: **Artigos originais** relacionados com as áreas de conhecimento das Ciências Farmacêuticas, **Trabalhos de atualização ou de revisão**, que serão incluídos quando solicitados a especialistas pela Comissão de Publicações ou quando submetidos em forma de Abstract para avaliação quanto ao interesse. Ressalta-se a necessidade de se incluir visão crítica dos autores, inserindo os seus trabalhos no tema e avaliando em relação ao estado de arte no País. **Notas Prévias** relativas a novas metodologias e resultados parciais, cuja originalidade justifique a publicação rápida. Nesse caso, o limite é de 2.000 palavras, excluindo-se tabelas, figuras e referências. Pode-se incluir, no máximo, uma figura, tabela e 10 referências. **Resenhas** elaboradas por especialistas segundo sugestão da Comissão de Publicações. Suplementos temáticos e aqueles relativos a eventos científicos podem ser publicados mediante aprovação prévia da Comissão de Publicações. Os trabalhos elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros podem ser apresentados em língua portuguesa, inglesa ou espanhola. Devem ser originais e inéditos e destinar-se exclusivamente à **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** / *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Escopo e política

Os manuscritos submetidos à Revista, que atenderem as "Instruções aos autores", são encaminhados ao Editor Científico, que indicará dois revisores especialistas no tema abordado (veja Relação dos Consultores - 2003 e gráfico 10). Após a revisão, cujo caráter anônimo é mantido durante todo o processo, os manuscritos são enviados à Comissão de Publicação, que decidirá sobre a publicação. Manuscritos recusados, passíveis de reformulação, poderão ser re-submetidos após reestruturação, como novo trabalho, iniciando outro processo de avaliação. Manuscritos condicionados à reestruturação serão reavaliados pelos revisores. Manuscritos enviados aos autores para revisão devem retornar à Editoria dentro de, no máximo, dois meses, caso contrário terão o processo encerrado.

Forma e preparação de manuscritos

Instruções para apresentação dos trabalhos

1. Estrutura dos originais

1.1.Cabeçalho: constituído por:

- Título do trabalho: deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.
- Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrónico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.

1.2 Resumo (em português): deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras. Os membros da Comissão poderão auxiliar autores que não são fluentes em português.

1.3 Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica e observando o limite máximo de 6(seis) unitermos.

1.4 Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

1.5 Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos devem fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

1.6 Resultados e Discussão: deverão ser acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado, devendo se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

1.7 Conclusões: Quando pertinentes, devem ser fundamentadas

no texto.

1.8 Resumo em inglês (ABSTRACT): deve acompanhar o conteúdo do resumo em português.

1.9 Unitermos em inglês: devem acompanhar os unitermos em português.

1.10 Agradecimentos: devem constar de parágrafos, à parte, antecedendo as referências bibliográficas.

1.11 Referências: devem ser organizadas de acordo com as normas da ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

2. Apresentação dos originais

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço duplo). Utilizar Programa Word for Windows. Os autores devem encaminhar o trabalho acompanhado de carta assinada pelo autor de correspondência, que se responsabilizará pela transferência dos direitos à RBCF.

3. Informações adicionais

3.1 Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), com apenas a inicial em maiúsculo e seguida do ano de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e acrescentar a expressão *et al.* (*em itálico*).

3.2 Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias, etc) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e reproduzidas em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif. e/ou bmp. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a laser.

Ilustrações coloridas somente serão publicadas mediante pagamento pelos autores.

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas na apresentação no texto e na citação com apenas a inicial em maiúsculo.

3.3 Nomenclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.

Envio de manuscritos

Os trabalhos devem ser remetidos por correio eletrônico, anexando à mensagem os arquivos correspondentes.

E-mail: rbcf@edu.usp.br

Secretaria de edição:

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 950

Caixa Postal 66083

05315-970 - São Paulo - SP - Brasil

Contato telefônico: Fone: (011) 3091.3804 FAX: (011) 3097.8627