

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**



**ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO O ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO ISOLADO DE
Cladonia verticillaris (LÍQUEN)**

ANA CATARINA SIMONETTI

**Orientadora: Prof^ª Dr.^a. Nereide Stela Santos Magalhães
Co-Orientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito**

**Recife-PE
2004**

Simonetti, A.C.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**



**ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO O ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO ISOLADO DE
Cladonia verticillaris (LÍQUEN)**

ANA CATARINA SIMONETTI

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Bioquímica, do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco (UFPE) como pré-
requisito à obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães
Co-Orientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

**Recife-PE
2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**



**ATIVIDADE ANTITUMORAL E TOXICIDADE DE NANOCÁPSULAS
CONTENDO O ÀCIDO FUMARPROTOCETRÁRICO ISOLADO DE
Cladonia verticillaris (LÍQUEN)**

Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães (Presidente)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva
Departamento de Bioquímica-UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica-UFPE

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN

Ana Catarina Simonetti (mestranda)
Departamento de Bioquímica-UFPE

**Recife-PE
2004**

Ao meu avô, *In memoriam*, Elias de Oliveira Lima, dedico a minha determinação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver, aprender e crescer cotidianamente em um mundo repleto de imperfeições.

Aos meus pais como intermediários da minha vinda ao mundo.

Ao meu saudoso avô, Elias de Oliveira Lima, que fez com que a minha vida seguisse um rumo sólido.

À minha mãe de criação, Josefa Vitalina da Silva, que dedicou todos os momentos da sua preciosa vida para educar um alguém, com muito amor e carinho, mesmo sabendo das inúmeras dificuldades que a vida lhe traria. Obrigada mainha.

Ao meu namorado, Lenilton Júnior, por toda paciência, compreensão e resignação diante das difíceis fases ocorrentes em nossas vidas. A minha gratidão será eterna.

Aos professores do Mestrado em Bioquímica pela dedicação na arte de transmitir seus sábios conhecimentos, em especial Prof. Dr. Luis Bezerra e Prof^a. Dr^a. Maria da Paz pelo carisma por minha pessoa.

À Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães que me ofereceu a oportunidade de aprender e crescer profissionalmente, pois o seu exemplo de trabalho aliado à honestidade fez-me crer que ainda pode-se obter sucesso apoiando-se nos princípios da mera verdade.

Ao Prof. Dr. Sócrates Tabosa do Egito, Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, pela atenção e intensa contribuição na conclusão desta dissertação;

À Dr^a. Noemia Pereira dos Santos, Departamento de Antibióticos-UFPE, pela sua disposição em me ajudar na realização deste trabalho, pois seu mérito é indispensável.

Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, Departamento de Bioquímica-UFPE, pelo seu apoio no oferecimento do ácido fumarprotocetrárico e das instalações do seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira pela sua colaboração na obtenção dos produtos liquênicos.

À Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento, Departamento de Antibióticos-UFPE, pelo auxílio na realização dos testes com células e animais.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, diretor do LIKA, por ceder as instalações para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nicodemos Teles P. Filho pelo auxílio na interpretação dos laudos histopatológicos descritos nesta dissertação.

Aos amigos do Curso de Mestrado, João Soares, Rosangela Vidal, Lilia Moura, Regina Araújo, Neila Caroline, Michele Dalvina, Alexandre Libânio, Nerivan Barbosa e Ana Acácia, pelos momentos de companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica, Milena Ferraz, Marcela Wanderley e Luciano França do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA, agradeço-lhes imensamente pelo cumprimento de suas atividades com considerável responsabilidade.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica-LIKA e do grupo SLC: Rosangela Vidal, Hercília Rolim, Roseane Ribeiro, Nerivan Barbosa, Lúcio Pimentel, Simone Santos, Marcela Wanderley, Milena Ferraz, Mariane Lira, Marcília Pinheiro, Noemia Santos, Dayse Vasconcelos, João Paulo, Agenor Tavares, Luciana da Matta, Ian Porto, Lilia Moura, João Soares, Givanildo e Luciana Oliveira, pela amizade.

À Rosangela Vidal, Hercília Rolim e Luciana da Matta pelos marcantes momentos de companheirismo e amizade verdadeiros.

À Ian Porto pelo auxílio na descrição dos resultados estatísticos, pois sem a sua infinita disposição em ajudar o próximo esta dissertação não teria sido concluída.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial Miron e Neide, pois foram pessoas especiais e marcantes em minha passagem por este departamento.

Aos funcionários do LIKA Sr. Otaviano, Carmelita, Moisés, Ilma, Conceição, Felipe e Rafael pela cooperação diante das tarefas diárias.

As minhas grandes amigas, Constantina Dimou e Arlinda Leite, que me ajudaram de forma sublime ao longo das inúmeras dificuldades em minha vida pessoal;

Ao CNPq, Rede Nanobiotec-MCT/CNPq e BNB pelo suporte financeiro na realização desta dissertação.

ÍNDICE ANALÍTICO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	<i>i</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>v</i>
LISTA DE TABELAS	<i>vi</i>
ABREVIATURAS	<i>vii</i>
RESUMO	<i>vii</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Câncer	01
1.1.1. Epidemiologia.....	02
1.1.2. Cancerologia Experimental.....	02
1.1.3. Tratamento.....	03
1.2. Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos	05
1.2.1. Sistemas Nanoparticulados.....	06
1.2.1.1. Nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas).....	06
1.2.1.1.1. Aplicações Biológicas.....	08
1.2.1.1.2. Atualidades.....	09
1.2.1.1.3. Nanopartículas na Terapia do Câncer	10
1.2.1.2. Nanocápsulas.....	11
1.2.2. Microemulsões.....	13
1.3. Líquens	14
1.3.1. Função Biológica dos Líquens.....	14
1.3.2. Ácido Fumarprotocetrárico.....	15
1.3.2.1. Estrutura Química Molecular.....	15
1.3.2.2. Características Físico-Químicas.....	16
1.3.2.3. Ocorrência.....	16
1.3.2.4. Aplicações Biológicas.....	17
1.3.2.4.1. Atividade Antibacteriana.....	17
1.3.2.4.2. Atividade Antimicobacteriana.....	18
1.3.2.4.3. Atividades Citotóxica e Antitumoral.....	18
1.4. Mecanismo de Ação Proposto do Ácido Fumarprotocetrárico	19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. ARTIGO	28
5. CONCLUSÕES	48
ANEXOS	49

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética

ANEXO II

Normas para publicação do trabalho no *International Journal of Pharmaceutics*

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Figura 1: Ação dos agentes carcinogênicos no DNA.....	02
Figura 2: Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional × controlada..	05
Figura 3: Exemplos das diversas formas farmacêuticas: (A) esfera (sistema matricial) e (B) cápsula (sistema reservatório).....	07
Figura 4: Formas de liberação do princípio ativo: nanoesferas e nanocápsulas.....	07
Figura 5: Método de copolimerização interfacial para se preparar nanocápsulas.....	12
Figura 6: Microestrutura do talo liquênico: (A) Fotobionte; (B) Hifas medulares ou medula; (C) Hifas corticais ou córtex superior.....	14
Figura 7: Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico.....	16
Figura 8: Talo liquênico da <i>Cladonia verticillaris</i>	17
ARTIGO	
Figure 1: The pH evolution for nanocapsule formulations: (●) FPA-NC, and (■) FPA-NC/ME stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$	39
Figure 2: <i>In vitro</i> kinetic profile of FPA-loaded nanocapsules prepared with o/w microemulsion (FPA NC/ME).....	40
Figure 3: The cytotoxic effect of the treatment with FPA-loaded nanocapsules with or without oil-in-water microemulsion on (A) NCI-H 292 and (B) Hep-2 cells.....	41
Figure 4: Histopathological aspect of animal organs after treatments with with free FPA (I) and FPA-loaded nanocapsules with o/w microemulsion (II): (a) spleen, (b) liver and (c) kidneys. The magnificence was $20\times$ (➡ arrays denote area of necrosis).....	42
Figure 5: Evaluation of tumor weight after treatment with FPA, unloaded-nanocapsules and FPA-loaded nanocapsules (FPA-NC), without o/w microemulsion.....	43
Figure 6: Evaluation of the antitumor activity of FPA-loaded nanocapsules against Sarcoma-180: free FPA and FPA-loaded nanocapsules (FPA-NC), without o/w microemulsion.....	43
Figure 7: Histopathological aspect of animal organs after treatments with with free FPA (I) and FPA-loaded nanocapsules without o/w microemulsion (II): (a) spleen, (b) liver and (c) kidneys. The magnificence was $50\times$	44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. The nature and concentration of constituents in nanocapsule formulations.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- Drug Delivery Systems – Sistemas de Liberação de Fármacos
- FDA – Administração de Fármacos e Alimentos
- FPA - Ácido Fumarprotocetrárico
- FPA-NC - Nanocápsulas contendo o ácido fumarprotocetrárico
- FPA-NC/ME – Nanocápsulas, contendo o ácido fumarprotocetrárico, preparadas com a microemulsão O/A
- HEp-2 – Carcinoma epidermóide de laringe
- HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana –1
- HSV – Vírus do Herpes
- HPV - Papiloma Vírus Humano
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- ME – Microemulsão O/A
- NC/ME – Nanocápsulas preparadas com a microemulsão O/A
- PCR – Proteína C Reativa
- PEG - Polietilenoglicol
- PLGA- Copolímero de ácido láctico e glicólico
- MEM - Meio Mínimo Essencial
- M5076 – Sarcoma ovariano
- MDA-MB 231- Carcinoma de mama humano
- NCI-H 292 – Células de câncer de pulmão humano
- SNC – Sistema Nervoso Central

RESUMO

Nanopartículas são carreadores coloidais poliméricos utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos e podem agir como um veículo carreador de fármaco capaz de atingir tecidos ou células tumorais, enquanto protege a inativação prematura do princípio ativo durante o seu transporte. O ácido fumarprotocetrárico (FPA), uma depsidona β -orcinol, é considerado um metabólito secundário biologicamente ativo da espécie de líquens *Cladonia verticillaris*, pois as atividades antibacteriana, antimicobacteriana e antitumoral têm sido atribuídas a este ácido. As microemulsões são potentes sistemas carreadores de fármacos para as administrações oral, tópica e parenteral, pois oferecem várias vantagens, tais como: formação espontânea, estabilidade termodinâmica, melhoramento da solubilização e biodisponibilidade do fármaco. O objetivo deste trabalho baseia-se na investigação das atividades citotóxica, tóxica e antitumoral de nanocápsulas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA-50/50), contendo o ácido fumarprotocetrárico. As nanocápsulas, obtidas pelo método de deposição interfacial de copolímero pré-formado, foram preparadas sem (FPA-NC) e com o sistema de microemulsão O/A (FPA-NC/ME), como fase oleosa interna. Os parâmetros físico-químicos e de estabilidade destas preparações também foram analisados, tais como: alterações de pH; doseamento químico e determinação da taxa de encapsulação. O perfil cinético de liberação *in vitro*, foi obtido pelo método de diálise direta. Os ensaios de citotoxicidade do FPA livre e encapsulado foram realizados frente às linhagens celulares, NCI-H 292 e HEp-2, cultivadas em meio MEM (Meio Mínimo Essencial). A atividade antitumoral foi avaliada frente ao tumor sólido Sarcoma 180, em camundongos Swiss, sendo a inibição tumoral calculada pela comparação dos pesos médios dos tumores dos grupos tratado e controle, respectivamente. Os ensaios de toxicidade *in vivo* do FPA em suas formas, livre e encapsulada, foram averiguados durante 8 semanas, após o tratamento diário, utilizando a dose de 11 mg.Kg⁻¹. Ao término do tratamento, os animais foram sacrificados e os órgãos (baço, fígado e rins) foram dissecados e submetidos às análises histopatológicas. As formulações FPA-NC/ME apresentaram uma considerável estabilidade em comparação com as formulações obtidas sem este sistema, ou seja, permaneceram estáveis após os ensaios de estabilidade acelerada. Quanto ao estudo do pH, ao longo do tempo (60 dias), não foi evidenciada variação significativa em ambas formulações estudadas, FPA-NC (7,37 a 6,65) e FPA-NC/ME (7,43 a 6,88), porém apresentaram taxas de encapsulação distintas do princípio ativo, ou seja, 49,5% e 86,2%, respectivamente. O perfil cinético de liberação *in vitro* do FPA a partir das nanocápsulas/microemulsão (NC/ME) exibiu uma liberação máxima de 40,8% nas

primeiras 4 horas, considerando-se 86,2% da concentração teórica do FPA encapsulado. A viabilidade das células NCI-H 292 tratadas com FPA, NC e FPA-NC foram observadas até a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, todavia as células tratadas com FPA/ME apresentaram na concentração de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (25% de viabilidade celular) uma elevada citotoxicidade. Entretanto, as células tratadas com o sistema FPA-NC/ME apresentaram uma redução do efeito citotóxico, permitindo a determinação da IC_{50} a 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em relação as células HEp-2, a viabilidade celular foi preservada após o tratamento com FPA, NC e FPA-NC até a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que as células tratadas com FPA/ME apresentaram toxicidade a 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (~35% viabilidade celular). Contrariamente, o sistema FPA-NC/ME apresentou uma redução do efeito citotóxico. Estes resultados demonstram que o FPA livre e nanoencapsulado, sem o sistema de microemulsão O/A, não apresentaram ação citotóxica sobre as linhagens celulares estudadas, NCI-H 292 e HEp-2. O perfil de toxicidade *in vivo* foi analisado, através da análise histopatológica dos órgãos baço, fígado e rins tratados com o FPA e FPA-NC/ME. O aspecto morfológico das células esplênicas manteve-se inalterado, após o tratamento do FPA em suas formas livre e encapsulada, porém o fígado e os rins demonstraram lesões significativas, tais como: necrose nos hepatócitos e uma glomerulonefrite mesangioproliferativa, respectivamente. No estudo da atividade antitumoral evidenciou-se que a quimioterapia realizada, durante 7 dias, com FPA-NC apresentou uma inibição tumoral de 61,4%, quando comparado com a sua forma livre (58,9%), frente ao Sarcoma 180. Alterações histopatológicas nos tecidos, esplênico, hepático e renal não foram evidenciadas, após o tratamento com o FPA em suas formas livre e encapsulada, quando comparadas ao grupo controle. Estes resultados indicam que a nanoencapsulação continua sendo uma alternativa para a aplicação terapêutica de fármacos com ação anticancerígena, tanto para a obtenção de uma melhor eficácia terapêutica quanto para a minimização dos efeitos tóxicos.

ABSTRACT

The potential of controlled release in optimizing drug targeting has offered a tremendous advancement in the manipulation of novel dosage forms such as nanoparticles, which are solid colloidal polymeric carriers in size range of 1-1,000 nm. Oil-in-water microemulsions as a drug delivery system include improvement of drug solubilization. The fumarprotocetraric acid, a β -orcinol depsidone, is obtained from *Cladonia verticillaris* and its antibacterial, antimycobacterial and antitumor activities had been evaluated. The main purpose of this work is to investigate the cytotoxicity, toxicity and antitumor activity of free and fumarprotocetraric acid (FPA) encapsulated into PLGA-nanocapsules prepared by interfacial deposition of a pre-formed copolymer method. The physicochemical and stability parameters of the nanocapsules were also investigated. The cytotoxic effect of FPA on different forms, free (FPA) and encapsulated with and without oil-in-water microemulsion (FPA-NC and FPA-NC/ME), respectively, was evaluated on human lung cancer (NCI-H 292) and larynx epidermoid carcinoma (HEp-2) cells line cultured in MEM (Minimum Essential Medium). The toxicity was analyzed on Swiss mice with a daily treatment for 8 weeks. After treatment, animals were sacrificed and their organs (liver, kidneys, and spleen) were submitted to histopathological analysis. The analysis of the antitumor activity was assessed against solid tumor Sarcoma 180 in Swiss mice, and was estimated by the tumor inhibition. Results showed that the encapsulation efficiency of the fumarprotocetraric acid into PLGA-nanocapsules in different carriers was 49.5% (FPA-NC) and 86.2% (FPA-NC/ME), respectively. The kinetic profile of FPA from nanocapsule-microemulsion formulation presented a gradual augmentation of the drug release, achieving 40.8% at 4 hours. The viability of NCI-H 292 cells treated with FPA, NC and FPA-loaded nanocapsules was maintained even at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. In contrast, the cell treatment with o/w microemulsion (ME) or FPA-ME promoted a high cytotoxicity at $6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (25% cell viability). Concerning HEp-2 cells, their viability was preserved after treatment with FPA, NC or FPA-NC even at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Results showed that FPA have no cytotoxic effects on NCI-H 292 or HEp-2 cells, and FPA-loaded nanocapsules have no cytotoxic effect on NCI-H 292 cells. In contrast, the o/w microemulsion exhibited a high cytotoxicity on both cells. No behavioral alterations were observed in animals during the toxicity assay of FPA formulations. No statistically significant difference in body weight was detected for animals treated with free and encapsulated FPA in relation to the control group. However the treatment with FPA

encapsulated in NC/ME promoted pronounced injuries in liver and kidneys of animals. Cellular and renal tubules necroses were detected in kidneys. The antitumor activity promoted by free FPA, unloaded-nanocapsules and FPA-loaded nanocapsules evaluated on Sarcoma 180-bearing mice promoted 61.4% of tumor inhibition when compared with free FPA (58.9%) in relation to the control group.

Results showed that encapsulation of fumarprotocetraric acid into PLGA-nanocapsules can be a potential alternative to allow in a diversity of therapeutical applications. The nanoencapsulation with microemulsion can therefore be considered as a potential alternative to improve solubilization of lichens metabolites, such as fumarprotocetraric acid. However microemulsions prepared with Cremophor® exhibited a substancial *in vitro* and *in vivo* toxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é causado em quase todos os casos por mutação ou por ativação anormal de genes celulares que controlam o crescimento e a mitose celular. Estes genes anormais são chamados de oncogenes (Guyton & Hall, 2002).

Câncer (do latim CANCER - Caranguejo) é uma tradução latina da palavra grega carcinoma (KRVKINOS) que tem o mesmo significado. Esta palavra é utilizada para designar os tumores malignos, desde os povos antigos, e teve sua origem decorrente da semelhança com o referido crustáceo, pelo seu caráter infiltrativo. Galeno utilizou-a pela primeira vez, aproximadamente 138-201 a.C., para indicar um tumor maligno da mama em que as veias superficiais desses órgãos apareciam intumescidas, assemelhando-se à pata de caranguejo (Murrad & Katz, 1996).

Hoje está claro que o câncer é uma doença genética, pois como todas as células de um tumor possuem o oncogene pode-se concluir que o tumor é um clone mutante. Os oncogenes normalmente desempenham funções celulares básicas, em geral relacionadas à regulação da multiplicação celular. Entretanto, vários tipos de eventos podem transformar um proto-oncogene em um oncogene, estado no qual ele promove as duas principais características do câncer: multiplicação celular descontrolada, levando a um crescimento excessivo de um grupo de células chamado de tumor e a dispersão de células pelo corpo para formar novos tumores, um processo chamado metástase (Griffiths *et al.*, 1998).

O câncer pode surgir não apenas em decorrência da ativação de oncogenes promotores do crescimento, mas também devido à inativação de genes que normalmente suprimem a proliferação celular (genes supressores do câncer ou anti-oncogenes) (Robbins *et al.*, 2001).

Carcinogênese e/ou oncogênese são termos que designam o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, desde as alterações mais precoces no DNA, que supostamente ocorrem em uma só célula ou em um pequeno grupo delas, até a formação de um tumor que pode destruir o organismo hospedeiro. Este processo neoplásico é um processo dinâmico, que evolui em múltiplas etapas (Montenegro & Franco, 1999) (Figura 1).

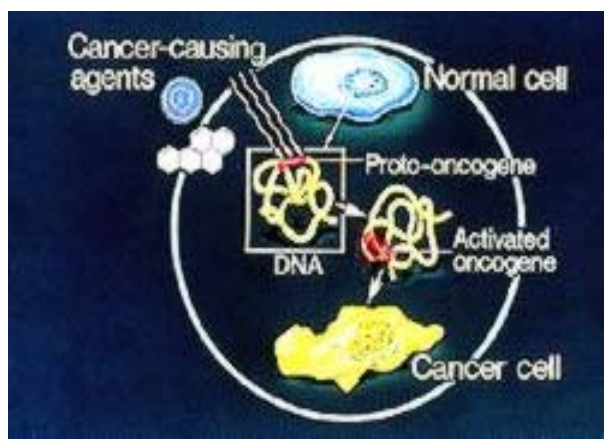


Figura 1: Ação dos agentes carcinogênicos no DNA
(<http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind/cioc/molecular/30.1.jpg>)

1.1.1. Epidemiologia

Atualmente, o câncer é considerado a segunda causa de morte no Brasil e em 1994, os neoplasmas foram responsáveis por 10,86% dos 887. 594 óbitos registrados, sendo que 53,81% dos óbitos por neoplasia ocorreram entre homens e 46,05%, entre as mulheres (Ministério da Saúde/INCA, 2003).

Na Região Nordeste, as neoplasias representam a terceira causa de morte por doença, consistindo de 6,34% dos óbitos atestados, ficando apenas 0,02 pontos percentuais depois das doenças infecciosas e parasitárias. Pernambuco apresenta uma taxa bruta de incidência de neoplasias estimada em 112,69 casos para homens e 146,42 casos para mulheres, no ano de 2003, para cada 100.000 indivíduos (Ministério da Saúde/INCA, 2003).

As taxas de sobrevivência de todos os cânceres vêm aumentando continuamente nos últimos 20 anos, tendo sido geralmente maior para as mulheres do que para os homens. As taxas de sobrevivência atuais relativas a cinco anos, para todos os cânceres, aumentaram de 18% para 29% nos homens e de 33% para 43% nas mulheres, entre 1970 e 1990 (Spence & Johnston, 2003).

1.1.2. Cancerologia Experimental

Tradicionalmente, os fármacos utilizados para o tratamento do câncer foram descobertos através da triagem, em grande escala, de substâncias químicas de síntese e

produtos naturais contra sistemas tumorais em animais, principalmente leucemias murinas (Hardman & Limbird, 1996).

A realização de testes *in vivo* e *in vitro* para detectar a atividade antitumoral de novas substâncias é de vital importância para a descoberta de novos quimioterápicos. Testes *in vivo* aplicados à cancerologia experimental têm sido os mais recomendáveis, apesar de serem dispendiosos e com respostas não muito rápidas (Rodrigues, 2001). Estes ensaios permitem a análise de um grande número de amostras, viabilizando a localização dos princípios ativos em determinadas frações obtidas durante o processo de extração de produtos de origem natural (Favaro *et al.*, 1990).

Carreadores coloidais tais como os lipossomas e nanopartículas têm sido freqüentemente utilizados para a liberação intravenosa de agentes anti-cancerígenos para tumores sólidos, devido ao rápido seqüestro desses carreadores pelos macrófagos no fígado e baço (Laverman *et al.*, 2001).

1.1.3. Tratamento

Devido à importância epidemiológica dos processos neoplásicos, inúmeras abordagens terapêuticas vêm sendo investigadas. As categorias básicas para o tratamento são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Esta última apresenta aspecto desfavorável, devido à inespecificidade do fármaco e à dificuldade em se estabelecer uma dose efetiva para destruir o máximo de células com o mínimo de efeitos colaterais para as células normais (Santos, 2003). Segundo o Ministério da Saúde/INCA (2003), a hormonioterapia, a imunoterapia e as terapêuticas combinadas também são alternativas disponíveis para o tratamento do câncer.

O potencial para tratar pacientes de câncer pelas abordagens imunológicas se mostra muito promissor para os imunologistas e oncobiólogos, pois a imunoterapia tem o potencial de ser o tratamento mais específico planejado para os tumores, devido à utilização útil de anticorpos monoclonais tumor-específicos (Abbas *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2003). O sistema imunológico necessita enfrentar as extremas dificuldades em desempenhar sua função de reconhecimento e destruição das células tumorais, pois as mesmas exibem muitas semelhanças com as células normais, apesar da sua tendência anormal de proliferação (Stites *et al.*, 1997).

Um marco muito importante no desenvolvimento racional de fármacos direcionados contra oncogenes específicos foi alcançado em 1988, quando o FDA aprovou a Herceptina, um anticorpo monoclonal contra a proteína oncogênica Erb-2, para o

tratamento de câncer metastático de mama (Cooper, 2001). A Biologia Molecular está começando a fornecer ferramentas para encontrar de forma precisa quais genes são amplificados, deletados e mutados em células tumorais em um determinado paciente, assim podendo provar a sua importância no acompanhamento e prevenção do câncer (Alberts *et al.*, 1997). Podendo-se antecipar que a metodologia baseada na proteína C reativa (PCR) tornar-se-á um procedimento de diagnóstico rotineiro tanto no rastreamento de predisposição do câncer quanto no monitoramento dos pacientes, visando o planejamento da sua terapia (Henry, 1999).

A maioria dos fármacos utilizados atualmente no tratamento de câncer ou danificam o DNA ou inibem a sua replicação. Uma nova abordagem promissora para a terapia do câncer é o uso de fármacos capazes de inibir o crescimento do tumor por interferir com a angiogênese (formação dos vasos sanguíneos), em vez de atuarem diretamente contra as células cancerosas (Cooper, 2001). Mediadores da angiogênese e proteínas que têm expressão regulada, em vasos sanguíneos recém-formados, tais como as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, representam alvos farmacológicos potentes para a terapia anti-angiogênica (Reynolds *et al.*, 2003). Além disso, pesquisas estão sendo desenvolvidas para a produção de fármacos capazes de inibir as enzimas proteinases, secretadas pelo tumor, úteis na redução do crescimento celular e desenvolvimento neoplásico (Stone & Darlington, 2000).

As células cancerosas, por crescerem mais rapidamente que as células normais da maioria dos tecidos, têm necessidades maiores de nucleotídeos como precursores na síntese de DNA e RNA, assim são, em geral, mais sensíveis aos inibidores da biossíntese de nucleotídeos do que as células normais (Nelson & Cox, 2000).

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam por vários mecanismos, porém os agentes atualmente disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais com uma maior complicação do seu uso, devendo-se considerar criteriosamente o risco *versus* benefício quando se usam esses agentes (Silva, 2002). Em decorrência da toxicidade associada aos fármacos anti-cancerígenos em tecidos normais, uma nova estratégia tem sido postulada fundamentando-se na associação de fármacos antitumorais com nanopartículas coloidais. A utilização de nanocarreadores contendo anticancerígenos visa sobrepor os mecanismos de resistência celular e não-celular e aumentar a seletividade dos fármacos em células cancerosas, enquanto reduz a toxicidade em tecidos normais (Brigger *et al.*, 2002).

1.2. Sistema de Liberação Controlada de Fármacos

O conceito pioneiro de fármacos direcionados a sítios específicos do organismo foi postulado por Erlich em 1906, definido como “balas mágicas”. A tecnologia de sistemas de liberação de fármacos, como um método comercialmente atrativo para a sua administração de forma controlada e sítio específica, surgiu no início da década de 80. Estes tipos de fármacos têm sido foco de tremenda atenção, ao longo das últimas três décadas, pois o interesse pela manutenção nos níveis terapêuticos desses fármacos coincide com a aceitação pública e médica de cada sistema (Lachman *et al.*, 2001).

A administração de formas farmacêuticas convencionais em doses múltiplas promove uma variação na concentração plasmática do fármaco, atingindo por vezes níveis subterapêuticos e tóxicos durante os intervalos entre as doses (Figura 2). Já os fármacos administrados sob sistema de velocidade controlada, permanecem em concentrações sanguíneas praticamente constantes, em função do tempo (liberação segundo cinética de ordem zero), após a administração do fármaco em dose única. Este método vem sendo útil para o tratamento de síndromes metabólicas, tais como a *diabetes melitus* insulino-dependente (Prista *et al.*, 1995; Ansel *et al.*, 2000).



Figura 2. Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: convencional × controlada (<http://Lpes.iqm.unicamp.br>)

Os sistemas de liberação de fármacos, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens e desvantagens quando comparados a outros sistemas de dosagem convencional, tais como (Prista *et al.*, 1995; Lachman *et al.*, 2001):

I) Vantagens:

- Diminuição do número de administrações diárias;
- Maior adesão do paciente ao tratamento;
- Podem ser interrompidas durante o repouso noturno para as repetições das doses medicamentosas;
- Minimização dos riscos de erro ou esquecimento, por parte dos pacientes;
- Introdução gradual do fármaco, evitando oscilações, durante o tratamento;
- Biodisponibilidade aumentada do fármaco;
- Margem de segurança aumentada para fármacos potentes;
- Redução dos efeitos adversos.

II) Desvantagens:

- Risco de acúmulo do fármaco no organismo, devido à velocidade de eliminação lenta do mesmo;
- Dificuldade de eliminação rápida dos fármacos, em casos de posologias que exigem muito rigor;
- Não permissão do fim imediato da ação terapêutica, nos casos de implantes subcutâneos;
- Perda da flexibilidade no ajustamento dos regimes posológicos;
- São concebidas para uma população normal (ausência de doença que altere a distribuição e metabolização do fármaco);
- Fatores econômicos (dispendiosos);
- Nem todos os fármacos são adequados.

1.2.1. Sistemas Nanoparticulados

1.2.1.1. Nanopartículas (Nanoesferas e Nanocápsulas)

O potencial de liberação sítio-específica, por direcionamento de fármaco, tem fornecido consideráveis vantagens na manipulação de novas formas de dosagens, tais como as nanopartículas, as quais são carreadores coloidais poliméricos sólidos com tamanho de 1-1000 nm (1 μ m) (Gaur *et al.*, 2000).

Na literatura são citados dois tipos de nanopartículas: as nanoesferas e as nanocápsulas, cada uma com características próprias. As nanoesferas exibem formato

esférico e são constituídas por uma rede polimérica densa envolvendo toda a estrutura das partículas, enquanto que as nanocápsulas são vesículas sólidas que apresentam uma cavidade interna oca, geralmente de natureza oleosa, estabilizadas por um filme interfacial de agentes tensoativos e revestidas, superficialmente, por uma parede polimérica irregular pouca espessa (Couvreur, 1985).

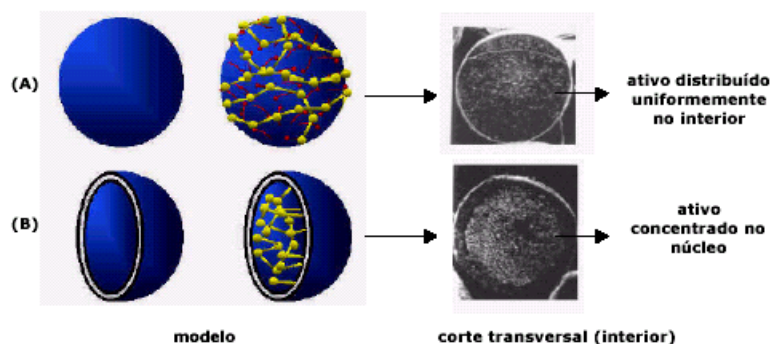


Figura 3: Formas farmacêuticas nanoparticuladas: (A) esfera (sistema matricial) e (B) cápsula (sistema reservatório) (<http://Lpes.iqm.unicamp.br>).

Os sistemas de liberação controlada do tipo polimérico são classificados de acordo com vários mecanismos de cinética de liberação, já conhecidos há algum tempo, tais como: o monolítico e o reservatório (Figura 4). No sistema sólido monolítico, o fármaco (princípio bioativo) é disperso ou dissolvido em um polímero inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero. Enquanto que, no sistema reservatório o princípio bioativo forma uma partícula interna (núcleo) envolvida por uma parede de difusão inerte (Brannon-Peppas, 1997).

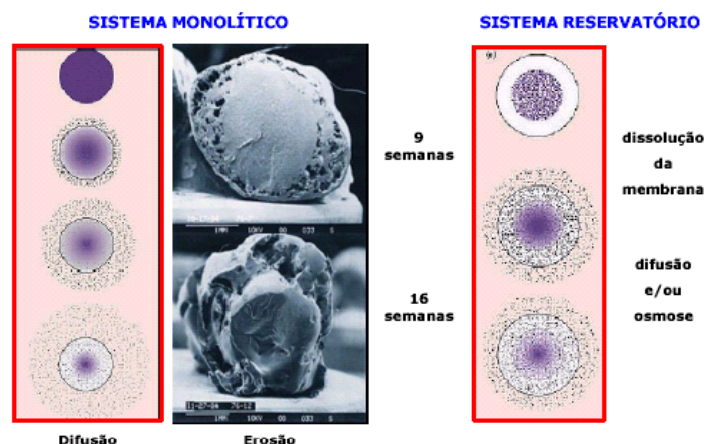


Figura 4. Mecanismos de liberação do princípio ativo a partir de nanoesferas e nanocápsulas (Brannon-Peppas, 1997).

1.2.1.1.1. Aplicações Biológicas

As nanopartículas tanto podem ser utilizadas como preparações de infusão intravascular, emulsões injetáveis para ambas administrações, parenteral e enteral, assim como formas de dosagem de vacinas para o uso de injeções subcutâneas ou intramusculares (Gibaud *et al.*, 1998; Lemoine & Preat, 1998). Estes sistemas coloidais poliméricos têm sido propostos como vetores de fármacos no sentido de modificar a sua farmacocinética, incluindo a alteração no perfil de distribuição tissular, podendo ainda aumentar a biodisponibilidade de muitas substâncias ativas (Gibaud *et al.*, 1998).

Existem inúmeras áreas promissoras para o emprego de nanopartículas, tais como a vetorização de fármacos anticancerígenos; antibióticos; fármacos de origem peptídica ou protéica; oligonucleotídeos e de uso de oftálmico (Couvreur, 1985).

Nanopartículas podem ser formuladas para uma liberação sítio-direcionada do fármaco no sistema linfático, cérebro, paredes arteriais, pulmões, fígado e baço ou para uma circulação sistêmica prolongada (Hans & Lowman, 2002). Estas utilizadas para carrear fármacos para o cérebro são de considerável importância, pois são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, obstáculo para um grande número de fármacos, tais como: antibióticos, agentes anti-neoplásicos, fármacos do sistema nervoso central (SNC), especialmente neuropeptídeos (Kreuter, 2001).

A nanoencapsulação dos oligonucleotídeos, moléculas hábeis na inibição da expressão gênica e no tratamento de infecções virais e/ou câncer, demonstra protegê-los da sua rápida degradação, promovendo a sua subsequente incorporação em diferentes tipos de células (Lambert *et al.*, 2001). A incorporação de oligonucleotídeos em carreadores poliméricos, tais como as nanopartículas, poderá melhorar não apenas a sua estabilidade e captura, mas como também modificar a localização intracelular dos mesmos (Berton *et al.*, 1999).

Carreadores coloidais nanoparticulados podem agir como um veículo carreador de fármaco capaz de atingir tecidos ou células tumorais, enquanto protegem a inativação prematura do mesmo durante o seu transporte (Brigger *et al.*, 2002). A encapsulação permite uma melhoria na estabilidade do fármaco, em decorrência da sua proteção (condições de armazenamento) e redução dos possíveis efeitos tóxicos ou adversos produzidos. O principal interesse destes carreadores baseia-se na melhoria do efeito terapêutico, pelo direcionamento das moléculas ativas em seus sítios de ação desejáveis e pelo ocasionamento de uma elevada concentração local (Guinebretière *et al.*, 2002).

Existem alguns parâmetros importantes para a eficácia da ação das nanopartículas, como carreadores de fármacos, tais como: o tamanho e potencial zeta das partículas, a taxa de encapsulação do fármaco e as suas características de liberação, visto que podem ser controlados na produção farmacêutica (Hans & Lowman, 2002).

1.2.1.1.2. Atualidades

Recentemente há um considerável interesse no desenvolvimento de nanopartículas furtivas (“StealthTM nanoparticles”), como sistema carreador de fármaco. Estas nanopartículas de longa circulação podem ser preparadas pela modificação em sua superfície com polímeros não-iônicos, flexíveis e hidrofílicos, tais como o polietilenoglicol (PEG), poloxamers e poloxaminas, promovendo assim a liberação de fármacos no reconhecimento e na retificação de seus índices de toxicidade, assim como na detecção de doenças e desordens vasculares, por métodos de imagens médicas (Moghimi & Hunter, 2000; Li *et al.*, 2001). A presença de poloxamers e poloxaminas, na superfície, diminui a adsorção protéica (opsonização), a fagocitose das nanopartículas pelas células não parenquimatosas do fígado e aumenta o alcance nos sítios de infecção, inflamação, intravascularização de tumores sólidos, e em barreiras naturais, tal como a mucosa nasal (Amiji & Park, 2000; Gref *et al.*, 2003).

Nanopartículas magnéticas estão sendo utilizadas como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética por promovem uma linfotropia adequada, ou seja, as partículas são fagocitadas pelos macrófagos dentro dos linfonodos promovendo uma elevada resolução de contraste (Brigger *et al.*, 2002).

A especificidade e a longa circulação promovidas pelas nanopartículas, em determinados tipos celulares, podem ser alcançadas através da utilização de ligantes tais como: anticorpos monoclonais, açúcares, lectinas ou fatores de crescimento. Como exemplo, pode-se citar as nanopartículas poliméricas furtivas contendo o polietilenoglicol (PEG) associado com a biotina, vitamina H solúvel em água, e conjugado com a galactose na superfície da partícula, sendo assim facilmente endocitadas pelas células hepáticas tumorais (Barrat, 2000; Kim & Kim, 2003). Estas nanopartículas também têm sido reportadas por melhorarem o direcionamento do fator- α de necrose tumoral recombinante, promovendo um maior acúmulo do fármaco no tumor (Vauthier *et al.*, 2003).

Os sistemas de liberação de fármacos preparados por polímeros biodegradáveis são consideravelmente utilizados, devido à possibilidade de liberá-los, sob forma

controlada, e de aumentar a sua eficácia, enquanto a sua toxicidade é reduzida após a administração parenteral (Magenheim & Benita, 1991; Julienne *et al.*, 1992). A mais conhecida classe de materiais biodegradáveis para a liberação controlada é a de copolímeros derivados de ácidos láctico e glicólico (PLGAs) (Jalil & Nixon, 1990). Além disso, uma nova classe importante de polímeros de poli (éter uretano) está sendo utilizada para a preparação de nanocápsulas, devido as suas excelentes propriedades físicas (flexibilidade, degradação, etc...), resistência à fibrose e considerável biocompatibilidade (Bouchemal *et al.*, 2004).

Considera-se ainda que a aplicação de nanopartículas poliméricas como formas de dosagens de liberação controlada de fármacos anticancerígenos têm proporcionado imenso interesse no desenvolvimento de sistemas efetivos para tratamento do câncer (Soppimath *et al.*, 2001).

1.2.1.1.3. Nanopartículas na Terapia do Câncer

A ação terapêutica de fármacos em células tumorais é eficaz quando alguns problemas são superados, tais como: a resistência do fármaco, no tumor, devido às barreiras fisiológicas (mecanismos não-celulares), resistência do fármaco na célula (mecanismo celular), além da distribuição, biotransformação e a excreção dos fármacos anticancerígenos no organismo. A estratégia baseia-se na associação destes fármacos com nanopartículas, as quais são capazes de sobrepor estes mecanismos e reduzir, subsequente, a sua toxicidade em tecidos normais (Brigger *et al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que o perfil de distribuição dos fármacos anticancerígenos é alterado quando os mesmos são associados às nanopartículas convencionais, pois as mesmas são rapidamente removidas da circulação sanguínea pelo sistema mononuclear fagocítico (MPS). Esta captura pelo fígado e baço reduz a probabilidade das nanopartículas penetrarem nos capilares do tumor, enquanto que os espaços intersticiais tumorais são atingidos (Lambert *et al.*, 2001).

A doxorrubicina é um dos fármacos mais prescritos na terapia do câncer, pois expressa a sua capacidade citotóxica pela inibição da síntese dos ácidos nucleicos em células cancerosas (Yoo *et al.*, 2000). Além disso, tem-se observado que a doxorrubicina associada às nanopartículas de polialquilcianoacrilato (PACA) demonstraram aumentar a sobrevida dos camundongos acometidos por metástase hepática do tumor M5076. Deste modo, propôs-se que as células de Kupffer desempenham uma função reservatória, após a fagocitose da nanopartícula, favorecendo

a elevada concentração do fármaco nas células tumorais (Soma *et al.*, 2000). A eficácia terapêutica, em sítios tumorais, também tem sido observada com nanopartículas de quitosana contendo a doxorrubicina associada à dextrana, uma macromolécula inerte e carreadora de fármacos quimioterápicos (Mitra *et al.*, 2001).

Segundo Singla *et al.*, (2002) e Mu & Feng (2003), as nanopartículas poliméricas e biodegradáveis podem também ser adotadas como carreadoras coloidais de fármacos pouco solúveis em água, tal como o paclitaxel (Taxol®), um diterpenóide pseudoalcalóide com mais de 12 000 componentes naturais com atividade anticancerígena. Considerando-se a sua elevada hidrofobicidade, as nanopartículas promovem a sua maior retenção nos sítios tumorais com as subseqüentes redução do crescimento tumoral e aumento da sobrevida dos animais tratados.

1.2.1.2. Nanocápsulas

Técnicas de nanoencapsulação resultam em produtos constituídos de partículas revestidas que agem como sistemas liberadores de fármaco. Na realidade, as nanocápsulas possuem melhor estabilidade na presença de fluidos biológicos (Ammoury, 1990; Stainmesse, 1990) durante o armazenamento e a sua preparação é apropriada para escala industrial (Colombo *et al.*, 2001).

As nanocápsulas podem ser consideradas como sendo uma alternativa de sucesso diante de outros carreadores de moléculas ativas (Ammoury, 1990; Stainmesse, 1990), pois o perfil farmacocinético do fármaco é modificado, a sua eficiência é aumentada, enquanto que a quantidade administrada e os riscos dos efeitos adversos são diminuídos (Benita, 1996). A mudança no padrão de distribuição é vitoriosa, devido ao endereçamento específico do princípio ativo em seu alvo celular ou a nível tecidual (Couvreur *et al.*, 1982; Grislain *et al.*, 1983).

Sistemas de liberação nanovesiculares variam em tamanho de 20 a 500 nm incluindo principalmente lipossomas unilamelares e nanocápsulas (Fessi *et al.*, 1989). O uso das nanocápsulas é atrativo, devido a sua cavidade central oleosa a qual possibilita um elevado nível de encapsulação de substâncias lipofílicas como a atovaquone (Cauchetier *et al.*, 2003). Fármacos lipofílicos, os quais apresentam considerável solubilidade na matrix polimérica ou na cavidade oleosa das nanocápsulas, são mais rapidamente incorporados em comparação com os componentes hidrofílicos, embora que estes últimos podem ser absorvidos em nível da superfície particular (Barrat, 2000).

O método de preparação dessas nanovesículas depende da natureza do fármaco (hidrofílico ou lipofílico) a ser encapsulado (Zambaux *et al.*, 1998).

Existem fatores limitantes na escolha no desenvolvimento de lipossomas, em relação as nanocápsulas, tais como: a sensibilidade da membrana fosfolipídica diante de um ambiente de degradação e a rápida liberação do fármaco diante da bicamada lipídica (Grit *et al.*, 1989). Adicionalmente, os lipossomas têm demonstrado uma baixa taxa de encapsulação, uma reduzida estabilidade em condições de armazenamento e uma rápida liberação de fármacos hidrossolúveis no sangue (Soppimath *et al.*, 2001). Enquanto que as nanocápsulas sólidas e biodegradáveis demonstram suas vantagens sobre os lipossomas, devido ao seu tamanho extremamente pequeno com o subsequente potencial em se localizar no sítio patológico, tal como o tumor sólido, através do mecanismo passivo de direcionamento. Considera-se ainda, que a sua elevada estabilidade e a habilidade de criar uma liberação controlada oferecem opções vantajosas (Hans & Lowman., 2002; Singla *et al.*, 2002).

Fessi *et al.*, (1989) desenvolveram um método original denominado de técnica de deposição interfacial para a obtenção de nanocápsulas, nanométricas, reprodutíveis, redispersíveis e formadas instantaneamente, as quais são constituídas por um núcleo oleoso coberto por uma fina parede de polímero pré-formado e biodegradável. Neste procedimento, através do deslocamento de um solvente semi-polar miscível, acetona, no qual o polímero está inicialmente solubilizado, para a fase aquosa constituída de tampão-fosfato pH 7,4, com conseqüente deposição do polímero, agora insolúvel, na superfície de nanogotículas emulsificadas, produzindo uma suspensão coloidal com elevada capacidade carreadora de fármacos. Este método apresenta a vantagem sobre o método de polimerização interfacial, devido à ausência de monômeros e oligômeros dos reagentes restantes do processo de polimerização (Figura 5) (Gallardo *et al.*, 1989).

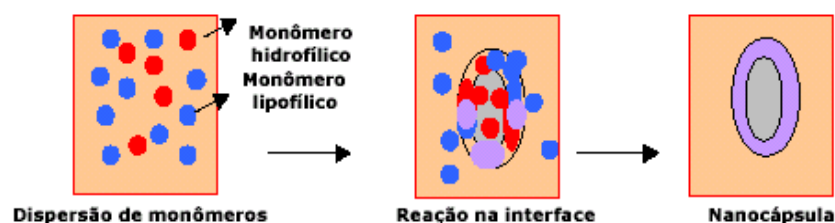


Figura 5. Método de copolimerização interfacial para se preparar nanocápsulas

(<http://Lpes.iqm.unicamp.br>)

1.2.2. MICROEMULSÕES

As microemulsões são potentes sistemas carreadores de fármacos para as administrações oral, tópica e parenteral. Estas oferecem várias vantagens, tais como: formação espontânea, estabilidade termodinâmica, melhoramento da solubilização e biodisponibilidade do fármaco, assim como a sua liberação controlada pelas vias de administração citadas anteriormente. Em decorrência da elevada capacidade de solubilização e estabilidade termodinâmica oferecidas pelas microemulsões, estes sistemas farmacêuticos são considerados veículos atrativos para a administração parenteral. Na microemulsão, o diâmetro das gotículas dispersas varia entre 10 e 75 nm (Tenjarla, 1999).

A microemulsão pode ser de três tipos: (1) óleo/água (O/A), na qual a água é a fase contínua; (2) água/óleo (A/O), na qual o óleo é a fase contínua e (3) bicontínua, na qual os volumes de água e óleo são aproximadamente iguais (Lachman *et al.*, 2001). Recentemente tem-se reportado que microemulsões óleo/água (O/A), formadas espontaneamente pela simples mistura de tensoativos, foram preparadas como um sistema de liberação de fármacos apresentando algumas vantagens, tais como: a melhoria na solubilidade do fármaco; um potencial uso parenteral e produção industrial, em larga escala, sem elevada energia de homogeneização (Park & Kim, 1999). A liberação do princípio ativo da microemulsão depende de vários parâmetros, tais como: a proporção de água e óleo nas fases contínua e descontínua, a distribuição e a difusão do fármaco em ambas fases do sistema (Trotta *et al.*, 1989).

O ácido cloníxico, pouco solúvel em água, foi incorporado em microemulsões óleo/água (O/A) visando melhorar a sua solubilidade, com a subsequente redução da dor, após injeções intramusculares ou intravenosas. Portanto, a formulação de microemulsão pode ser aplicada para fármacos que induzem dor durante injeção (Lee *et al.*, 2002). A utilização de microemulsões tem sido limitada como veículos carreadores de fármacos para a via ocular, devido a quantidade considerável de tensoativos que podem eventualmente causar irritação na mucosa ocular (Calvo *et al.*, 1996).

Atualmente as microemulsões estão sendo utilizadas em preparações farmacêuticas espermicidas, ou seja, como veículos de antibióticos ou antivirais capazes de prevenir doenças sexualmente transmissíveis, tais como o vírus HIV-1, HSV, HPV e bactérias *Neisseria gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (D'Cruz & Uckum, 2001).

1.3. LÍQUENS

Líquens são simbióticos de fungos (micobiontes) e algas (fotobiontes). Estes produzem um número considerável de componentes orgânicos, intracelulares e extracelulares, os quais podem ser facilmente extraídos de seus tecidos e classificados de acordo com a sua localização no talo (Figura 6) (Bose & Banerjee, 1976). Os produtos intracelulares são carboidratos, carotenóides, vitaminas, aminoácidos e proteínas, freqüentemente solúveis em água, enquanto que os metabólitos extracelulares são compostos resultantes de seu metabolismo secundário, classificados em quatro grupos químicos, bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (Culberson & Elix, 1972). Estes metabólitos secundários têm sido mundialmente utilizados farmacologicamente, apesar dos seus mecanismos de ação não terem sido completamente elucidados (Yamamoto *et al.*, 1998).

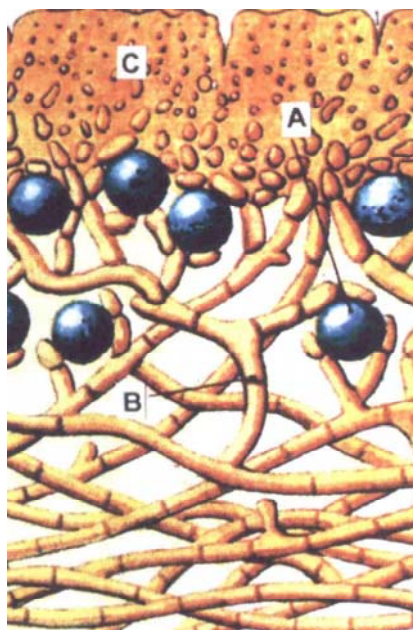


Figura 6. Microestrutura do talo líquênico: (A) Fotobionte; (B) Hifas medulares; (C) Hifas corticais (Oliveira, 2003).

1.3.1. Função Biológica dos Líquens

Os metabólitos secundários oriundos de substâncias líquênicas têm atraído a atenção de vários pesquisadores, por mais de 100 anos (Lawrey, 1986). Dentre as 20.000 espécies de líquens conhecidas, apenas uma pequena parcela tem sido analisada

e identificada como possuidora de componentes secundários biologicamente ativos (Romagni *et al.*, 2000). Atualmente, muitos liquenólogos assumem que ácidos liquênicos, isto é, àqueles componentes secundários insolúveis em água, apresentam várias funções biológicas na natureza, embora o seu mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado (Rundel, 1978).

As substâncias liquênicas são eficientes contra bactérias e fungos, impedem o desenvolvimento de tumores e células cancerosas, além de possuírem atividades farmacológica e antigerminativa, dentre outras. De fato, substâncias liquênicas de natureza fenólica têm apresentado ação comprovada contra tumores e células cancerosas (Nascimento *et al.*, 1994). Baseando-se neste dado, pode-se afirmar que há estudos indicativos na possibilidade de utilização de uma base de sulfato de zinco associada ao metabólito secundário, ácido úsnico, como terapia adjuvante do tratamento cirúrgico da lesão cérvico-vaginal causada pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) (Scirpa *et al.*, 1999).

Postula-se também que os componentes fenólicos produzem alterações hemolíticas e dérmicas, ou seja, danos nos constituintes de membrana dos eritrócitos e produção de dermatites de contato. Esta atividade é decorrente da presença de alérgenos, tais como depsídeos, depsidonas e derivatos do ácido úsnico (Hidalgo *et al.*, 1993).

Em tempos atuais, as substâncias liquênicas têm apresentado uma importante função em técnicas de biomonitoramento, ou seja, em mapeamentos dos efeitos da poluição em áreas amplas. O acúmulo de poluentes no talo poderá mostrar o padrão de distribuição de cada poluente e o perfil das condições naturais (Caviglia *et al.*, 2001).

De acordo com Yoshimura (1993), as principais funções naturais dos líquens não foram ainda completamente compreendidas, apesar de terem sido detectadas várias atividades biológicas, tais como: largo espectro de defesa contra vírus, bactérias, parasitas, predadores e contra fatores de estresse ambiental (ex.: raios ultra-violeta) (Cocchietto *et al.*, 2002).

1.3.2. Ácido Fumarprotocetrárico

1.3.2.1. Estrutura Química Molecular (C₂₂H₁₆O₁₂)

O ácido fumarprotocetrárico, uma depsidona β-orcinol, é um éster aromático contendo o grupo carboxílico em seu anel terminal, ou seja, um ácido carboxílico insaturado vinílico (Figura 7) (Edwards *et al.*, 2003).

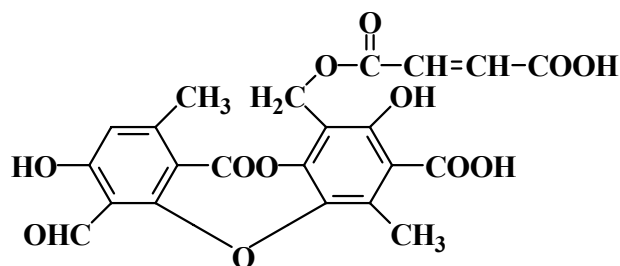


Figura. 7. Estrutura química do ácido fumarprotocetrárico (Edwards *et al.*, 2003).

1.3.2.2. Características Físico-Químicas

O ácido fumarprotocetrárico apresenta-se como cristais em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão de 250-260°C e massa molecular de 472,37. Apresenta uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em acetona hidratada (80~90%) e titulado como um ácido dibásico (Asahina & Shibata, 1954).

Segundo Asahina & Shibata (1954), a equação de hidrólise do ácido fumarprotocetrárico é descrita como tal:



1.3.2.3. Ocorrência

O ácido fumarprotocetrárico constitui um metabólito secundário de líquens. A sua biossíntese foi confirmada pela utilização de células de *Cladonia verticillaris* imobilizadas em alginato (Fontaniella *et al.*, 2000). Dados sugerem que células imobilizadas representam a melhor maneira para a produção de metabólitos liquênicos, tais como, os ácidos evérnico, úsnico e fumarprotocetrárico (Blanco *et al.*, 2002).

Espécies de *Cladonia* (ex.: *Cladonia imperialis*, *C. crinita* e *C. verticillaris*) estão entre as mais conhecidas Cladoniaceae nos trópicos da América Latina (Stocker-Worgotter, 2001). Uma nova espécie encontrada na Califórnia, *Cladonia lacryma*, similar às outras espécies da *Cladonia*, também é caracterizada pela presença do ácido fumarprotocetrárico (Hammer, 1991). Observou-se também a presença considerável deste ácido em amostras russas de *Parmelia stygia* e na medula da *Cladonia pyxidata* (Herbacher *et al.*, 1995). Enquanto que, na *Cladonia verticillaris* (Figura 8) o ácido fumarprotocetrárico é transportado da medula para o córtex, em resposta a uma

rehidratação, pois muitas espécies de líquens acumulam-se no córtex por estímulo de luz (Mateos *et al.*, 1993).



Figura. 8. Talo liquênico da *Cladonia verticillaris*.

(<http://.matisse.chem.uniroma1.it/apol>)

Líquens fenólicos têm sido reportados por formarem um anteparo protetor no córtex liquênico que filtra a radiação e, por meio disso, protegem os pigmentos fotosintéticos nas células fotobióticas. Afirmar-se que a ocorrência natural dos líquens *Cladonia verticillaris*, em regiões ensolaradas e protegidas da luz, implica mudanças no conteúdo do pigmento. Portanto, líquens que crescem em localizações ensolaradas contêm mais carboxilato metil β -orcinol, orcinol e ácido fumarprotocetrárico do que àqueles encontrados em regiões de baixa intensidade de luz (Legaz *et al.*, 1986).

1.3.2.4. Aplicações Biológicas

1.3.2.4.1. Atividade Antibacteriana

Ácido protoliquesterínico, um α -metileno- γ -lactona e o ácido fumarprotocetrárico, uma depsidona β -orcinol são considerados os principais metabólitos secundários biologicamente ativos da espécie de líquens *Cetraria islandica* (musgo irlandês). A atividade antibacteriana tem sido atribuída tanto ao ácido protoliquesterínico quanto ao ácido fumarprotocetrárico (Gudjónsdóttir & Ingólfssdóttir, 1997). Embora que, segundo Bustinza (1951), o ácido fumarprotocetrárico não tenha apresentado atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*.

1.3.2.4.2. Atividade Antimicobacteriana

Líquens vêm sendo utilizados com finalidades medicinais há décadas e alguns têm sido requisitados por serem efetivos no tratamento da tuberculose pulmonar, tais como as espécies de *Cetraria islandica* (musgo irlandês), *Lobaria pulmonaria* e *Cladonia* (Vartia, 1973).

Diversos componentes liquênicos apresentam atividade contra espécies de *Mycobacterium* e organismos Gram-positivos. Deste modo, apesar das inúmeras dificuldades encontradas na aplicação das cepas *M. tuberculosis* multifármaco-resistentes, faz-se necessário a constante busca por novos agentes antituberculosstáticos, incluindo, a re-investigação de vários metabólitos liquênicos com respectiva atividade antimicobacteriana (Gangadharam, 1993). Em decorrência da escassa solubilidade em água e a eficácia reduzida comparada aos vários antibióticos de outras fontes, os componentes liquênicos não vêm sendo usados como potentes agentes antimicrobianos (Ingólfssdóttir *et al.*, 1998).

1.3.2.4.3. Atividades Citotóxica e Antitumoral

Segundo Lima *et al.*, (1990) baseando-se em dados referentes à atividade antitumoral dos polissacarídeos e dos fenóis, obtidos de diferentes espécies de líquens, estudos foram iniciados com extratos de Cladoniaceae ocorrentes em tabuleiros arenosos do Estado da Paraíba, Brasil.

Em relação à atividade citotóxica, *Cladonia dendroides* foi a espécie cujos extratos contendo atranorina, ácido protocetrárico e ácido fumarprotocetrárico, na forma etérea, apresentou uma concentração inibitória de 50% do crescimento (CI₅₀) inferior a 50 µg/mL contra as células MDA-MB231. Isto permite supor que o princípio ativo deste extrato é a atranorina, com a provável associação ao complexo do ácido fumarprotocetrárico. Quando o extrato bruto apresenta IC₅₀ inferior a 50 µg/mL, o resultado é considerado satisfatório para o prosseguimento de estudos antineoplásicos, ou seja, menor toxicidade será ocasionada ao organismo (Nascimento *et al.*, 1994).

Segundo Oliveira (2003), o ácido fumarprotocetrárico isolado da *Cladonia verticillaris* (Raddi. Fr.) exibe atividades edematogênica e antipirética frente ao modelo experimental de inflamação aguda (edema de pata induzido por zimosan), sugerindo a ação sobre o bloqueio da síntese de prostaglandinas.

1.4. MECANISMO DE AÇÃO PROPOSTO DO ÁCIDO FUMARPROTOCETRÁRIO

Apesar do conhecimento sobre o mecanismo de inibição dos ácidos liquênicos em vários organismos, estudos recentes têm sugerido que alguns ácidos liquênicos interferem no metabolismo energético. Estes ácidos tais como: úsnico, vulpínico e a atranorina influenciam na mitocôndria e no metabolismo energético, devido as suas características físico-químicas, lipofilicidade e ionização e por exibirem características do 2,4-dinitrofenol (DNP), um clássico desacoplador da fosforilação oxidativa (Abo-Khatwa *et al.*, 1996). Segundo Vavasseur (1991), a atividade antimicrobiana destes líquens está associada ao desacoplamento da fosforilação oxidativa nas células microbianas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. *Imunologia Celular & Molecular*, 4^a ed. Ed. Revinter, Rio de Janeiro-RJ, 2003.
- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. *Imunologia Celular & Molecular*, 3^a ed. Ed. Revinter, Rio de Janeiro-RJ, 2000.
- ABO-KHATWA, A. N., AL-ROBAI, A. A. AL-JAWHARI, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. **Natural Toxins**, 4, 96-102, 1996.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. D. WATSON, J. *Biologia Molecular da Célula*, 3^a ed. Ed. Artmed, Porto Alegre-RS, 1997.
- AMIJI, M. M. & PARK, K. Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on the surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers. **Biomaterials**, 202, 1-10, 2000.
- AMMOURY, N. Etude Physico-chimique et Biologique de Vecteurs Colloïdaux Vésiculaires d'Indométacine Acide polylactique; doctoral thesis; Université Paris Sud, mention Sciences Pharmaceutiques 167, 1990.
- ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G. ALLEN JR., L. V. *Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*, 6^a ed. Editorial Premier, São Paulo-SP, 2000.
- ASAHINA, Y. & SHIBATA, S. *Chemistry of Lichen Substances*. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan, 1954.
- BARRAT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, 3(5), 163-171, 2000.
- BENITA, S. Microencapsulation – Methods and Industrial Applications. Benita, S., Ed.; Marcel Dekker, New York, 1996.
- BERTON, M., BENIMETSKAYA, L., ALLÉMANN, E., STEIN, C. A. GURNY, R. Uptake of oligonucleotide-loaded nanoparticle in prostatic cancer cells and their intracellular localization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 47, 119-123, 1999.
- BLANCO, Y., BLANCH, M., FONTANIELLA, B., LEGAZ, M. E., MILLANES, A. M., PEREIRA, E. C., VICENTE, C. Bioproduction of lichen phenolics by immobilized lichen cells with emphasis on the role of epiphytic bacteria. **Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, 92, 245-260, 2002.
- BOSE, L. & BANERJEE, N. C. Studies on antibiotics from indian lichens part I. isolation of antibiotic compounds from *Parmelia tinctorum*. **Bulletim of Botanic Society Bengal**, 30, 125-127, 1976.
- BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H., BONNET, I. ZYDOWICZ, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(etherurethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, 269, 89-100, 2004.

- BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in Controlled Drug Delivery. Disponível em < <http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>>. Acesso em novembro de 2003.
- BRIGGER, I., DUBERNET, C. COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54, 631-651, 2002.
- BUSTINZA, F. Anticacterial substances from lichens. **Endeavour**, 10(38), 95-99, 1951.
- CALVO, P., VILA-JATO, J. L. ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **Journal of Pharmaceutics Science**, 85: 530-6, 1996.
- CAUCHETIER, E., DENIAU, M., FESSI, H., ASTIER, A. PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, 250, 273-281, 2003.
- CAVIGLIA, A. M., NICORA, P., GIORDANI, P., BRUNIALTI, G. MODENESI, P. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes). **IL Farmaco**, 56, 379-382, 2001.
- COCCHIETTO, M., SKERT, N., NIMIS, L. P. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, 89, 137-146, 2002.
- COLOMBO, A. P., BRIANÇON, S., LIETO, J. FESSI, H. Project, design, and use of a pilot plant for nanocapsule production. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 27 (10), 1063-1072, 2001.
- COOPER, G. M. *A célula: uma abordagem celular*, 2ª ed. Ed. Artmed, Porto Alegre-RS, 2001.
- COUVREUR, P. Vecteurs nanoparticulaires de médicaments. In: BURI, P. et al.. Formes pharmaceutiques nouvelles. Aspects technologiques, biopharmaceutiques et médicaux. 2 ed. Paris: Lavosier, cap. 14, p. 577-611, 1985.
- COUVREUR, P., KANTE, B., GRISLAIN, L., ROLAND, M. SPEISER, P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. II: Doxorubicin loaded nanoparticles. **Journal of Pharmaceutics Science**, 71, 790-2, 1982.
- CULBERSON, C. F. & ELIX, J. A. *Lichen Substances*. Methods in Plant Biochemistry, v. 1, 1972.
- D' CRUZ, O. J. & UCKUM, F. M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles, **Contraception**, 64, 113-123, 2001.
- EDWARDS, H. G. M., NEWTON, E. M., WYNN-WILLIAMS, D. Molecular structural studies of lichens substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of Molecular Structure**, 1-11, 2003.
- FAVARO, O. C. N., OLIVEIRA, M. M., ROSSINI, A., KAMARA, C. R., PINTO, A. V. PINTO, M. C. Seleção por meio de Células KB de substâncias e extratos potencialmente ativos em quimioterapia do câncer. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro. 62 (3) 271-224, 1990.

- FESSI, H.; PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N. E. BENITA, S. N. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, 55, 1-4, 1989.
- FONTANIELLA, B., LEGAZ, M. E., PEREIRA, E. C., SEBASTIAN, B. VICENTE, C. Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Biotechnology Letters**, 22(10), 813-817, 2000.
- GALLARDO, M. M., ROBLOT-TREUPEL, L., MAHUTEAU, J., GENIN, I., COUVREUR, P., PLAT, M. PUISIEUX, F. Nanocapsules et nanosphères d'alkyl-cyanoacrylate, interactions principe actif/polymère. *Proc. APGI, 5th International Conference on Pharmaceutical Technology*, pp.36-45, Paris 1989.
- GANGADHARAM, P. R. J. Drug Resistance in Tuberculosis, In: Reichman, L. B., Hershfield, E. S. (Eds.), *Tuberculosis, A Comprehensive International Approach*. Marcel Dekker, New York, pp. 293-328, 1993.
- GAUR, U., SAHOO, S. K., DE, T. K., GHOSH, P. C., MAITRA, A. GHOSH, P. K. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. **International Journal of Pharmaceutics**, 202, 1-10, 2000.
- GIBAUD, S.; ROUSSEAU, C.; WEINGARTER, C.; FAVIER, R.; DOUAY, L.; ANDREUX, J. P. COUVREUR, P. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). **Journal of Controlled Release**, 52, 131-139, 1998.
- GREF, R., COUVREUR, P., BARRAT, G. MYSLAKINE, E. Surface-engineered nanoparticles for ligand coupling. **Biomaterials**, 24, 4529-4537, 2003.
- GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R. C. GELBART, W. M. *Introdução à Genética*, 6^a ed. Ed. Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro-RJ, 1998.
- GRISLAIN, L., COUVREUR, P. LENAERTS, V. Pharmacokinetic and distribution of a biodegradable drug-carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, 15, 355-45, 1983.
- GRIT, M., DE SMIDT, J. H., STRUIJKE. CROMMELIN, D. J. A. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, 50, 1-6, 1989.
- GUÐJÓNSDÓTTIR, G. A. & INGÓLFSDÓTTIR. K. Quantitative determination of protolichesterinic and fumarprotocetraric acids in *Cetraria islandica* by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 757, 303-306, 1997.
- GUINEBRETIERE, S., BRIANON, S., FESSI, H., TEODORESCU, V.S. BLANCHIN, M.G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science & Engineering**, 21, 137-142, 2002.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*, 10^a ed. Ed. Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro-RJ, 2002.
- HAMMER, S. A preliminary synopsis of the species of *Cladonia* in California and adjacent Oregon. **Mycotaxon**, 40, 169-197, 1991.

- HANS, M. L. & LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, 1, 0-0, 2002.
- HARDMAN, G. J., LIMBIRD, E. L. GOODMAN & GILMAN – As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 ed. Mc Graw Hill, 1996.
- HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*, 19ª ed. Ed. Mande, São Paulo-SP, 1999.
- HERBACHER, S., GIEZ, I., EMBACHER, G., FIEDLER, K., MAX, W., TRAWOGER, A., TURK, R., LANGE, O. L. PROKSCH, P. Sequestration of lichen compounds by lichen-feeding members of the Arctiidae (Lepidoptera). **Journal of Chemical Ecology**, 21(12), 2079-2089, 1995.
- HIDALGO, M. E., FERNÁNDEZ, E. QUILHOT, W. Photohemolytic activity of lichen metabolites. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 21, 37-40, 1993.
- INGÓLFSDÓTTIR, K., CHUNG, G. A. C., SKÚLASON, V. G., GISSURARSON, S. R. VILHJÁLMUR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 6, 141-144, 1998.
- JALIL, R. & NIXON, J. R. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative and release properties. **Journal of Microencapsulation**, 297-325, 1990.
- JULIENNE, M. C., ALONSO, M. J., GOMEZ AMONZA, J. L. BENOIT, J. P. Preparation of poly (DL-lactide-glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: application of experimental designs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 18, 1063-1077, 1992.
- KIM, I. & KIM, K. Development of polymeric nanoparticulate drug delivery systems: evaluation of nanoparticles based on biotinylated poly (ethylene glycol) with sugar moiety. **International Journal of Pharmaceutics**, 257, 195-203, 2003.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 47, 65-81, 2001.
- LACHMAN, L., LIBERMAN, H. A. KANING, J. L. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. v. II. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.
- LAMBERT, G., FATTAL, E. COUVREUR, P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 47, 99-112, 2001.
- LAVERMAN, P., CARSTENS, M. G., STORM, G. MOGHIMI, S. M. Recognition and clearance of methoxypoly (ethyleneglycol) 200-grafted liposomes by macrophages with enhanced phagocytic capacity. Implications in experimental and clinical oncology. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1526, 227-229, 2001.
- LAWREY, J. D. Biological role of lichens substances. **The Bryologist**, 89 (2), 111-122, 1986.

- LEE, J., PARK, K., LIM, S., LEE, M. KIM, C. Microemulsion formulation of clonixic acid: solubility enhancement and pain reduction. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 54, 43-49, 2002.
- LEGAZ, M. E., VICENTE, C., GALLO, M. XAVIER-FILHO, L. Lichen phenols from *Cladonia dendroides* thalli. **Lichen Physiology and Biochemistry**, 2, 13-21, 1986.
- LEMOINE, D. & PREAT, V. Polymeric nanoparticles as the delivery system for influenza virus glycoproteins. **Journal of Controlled Release**, 54, 15-27, 1998.
- LI, Y., PEI, Y., ZHOU, Z., ZHANG, X., GU, Z., DING, J., ZHOU, J. GAO, X. PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- α carriers. **Journal of Controlled Release**, 71, 287-296, 2001.
- LIMA, R. C., NASCIMENTO, S. C., PEREIRA, E. C. CAMPOS-TAKAKI, G. M. Atividade citotóxica e antitumoral de extratos liquênicos. **Bol. Soc. Brot.**, 63, 339-348, 1990.
- MAGENHEIM, B. & BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, 1, 221-241, 1991.
- MATEOS, J. L., PEDROA, M. M., MOLINA, M. D., PEREIRA, E. C., VICENTE, C. LEGAZ, M. E. Involvement of Phytochrome-mediated cyclic-AMP in the synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 31(5), 667-674, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER-PRO-ONCO. "O Problema do Câncer no Brasil". 4ª ed. Rio de Janeiro, 2003.
- MITRA, S., GAUR, U., GHOSH, P. C. MAITRA, A. N. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal Controlled Release**, 74, 317-323, 2001.
- MOGHIMI, S. M. & HUNTER, C. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. **Tibtech October**, 18, 2000.
- MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M. *Patologia Processos Gerais*, 4ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo-SP, 1999.
- MU, L. & FENG, S. S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. **Journal of Controlled Release**, 86, 33-48, 2003.
- MURRAD, A. M. & KATZ, A. *Oncologia: Bases Clínicas do Tratamento*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.
- NASCIMENTO, S. C., PEREIRA, E. C., OLIVEIRA, A. F. M., SILVA, N. H., BOITARD, M. BERIEL, H. Screenig de Atividade Citotóxica de Extratos Liquênicos: Cladoniaceae. **Acta Botânica Brasileira**, 8 (1), 1994.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger. Princípios da Bioquímica*, 3ª ed. Ed. Sarvier, São Paulo-SP, 2000.

- OLIVEIRA, M. S. **Atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória do extrato bruto e do ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (Líquen)**, 2003. 82 p. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- PARK, K. & KIM, C. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 181, 173-179, 1999.
- PRISTA, N., ALVES, A.C. MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*, 4^a ed. v. III. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1995.
- REYNOLDS, A. R., MOGHIMI, S. M. HODIVALA-DILKE, K. Nanoparticle-mediated gene delivery to tumour neovasculature. **Trends in Molecular Medicine**, 9, 1, 2003.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*, 6^a ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2001.
- RODRIGUES, O. G. **Estudo *in vitro* para avaliação das alterações morfológicas das células Hep2, NCIH-292 e TVT canino produzidas por imunoparvum e *in vivo* para verificação dos seus efeitos terapêuticos**, 2001. 127p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- ROMAGNI, J. G., MEAZZA, G., NANAYAKKARA, N. P. DAYAN, F. E. The phytotoxic lichen metabolite, usnic acid, is a potent inhibitor of plant ρ -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **FEBS Letters**, 480, 301-305, 2000.
- RUNDELL, P. W. The ecological role of secondary lichen substances. **Biochemical Systematics and Ecology**, 6, 157-170, 1978.
- SANTOS, N. P. **Nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico de *Cladonia substellata* com potencial ação antitumoral**, 2003. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- SCIRPA, P., SCAMBIA, G., MASCIULLO, V., BATTAGLIA, F., FOTI, E., LOPEZ, R., VILLA, P., MALECORE, M. MANCUSO, S. Terapia adjuvante con un preparato a base di zinco solfato e acido usnico delle lesioni genitali da Human Papilloma Vírus (HPV) dopo trattamento chirurgico distruttivo. **Minerva Gynecology**, 51, 255-260, 1999.
- SILVA, P. *Farmacologia*, 6^a ed. Ed. Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro-RJ, 2002.
- SINGLA, A. K., GARG, A. AGGARWAL, D. Paclitaxel and its formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, 235, 179-192, 2002.
- SOMA, C. E., DUBERNET, C., BARRAT, G., BENITA, S. COUVREUR, P. Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M2076 cells *in vitro*. **Journal of Controlled Release**, 68, 283-289, 2000.
- SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R. RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, 70, 1-20, 2001.
- SPENCE, R. A. & JOHNSTON, P. G. *Oncologia*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2003.

- STAINMESSE, S. Etude Galénique d'un Nouveau Procédé d'Obtention de Vecteurs Colloïdaux Submicroniques à Partir d'une Protéine ou d'un Polymère Synthétique; doctoral thesis; Université Paris Sud, mention Sciences Pharmaceutiques 129, 1990.
- STITES, D. P., TERR, A. I. PARSLOW, T. G. *Imunologia Médica*, 9^{ed}. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 1997.
- STOCKER-WORGOTTER, E. Experimental studies of the lichen symbiosis: DNA-analyses, differentiation and secondary chemistry of selected mycobionts, artificial resynthesis of two- and tripartite symbioses. **Symbiosis**, 30(2-3), 207-227, 2001.
- STONE, T. & DARLINGTON, G. Pills, potions, poisons. How drugs work?. Oxford – University Press, 2000.
- TENJARLA, S. Microemulsions: an Overview and Pharmaceutical Applications. **Critical ReviewsTM in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 16 (5), 61-521, 1999.
- TROTTA, M., GASCO, M. R. MOREL, S. Release of drugs from oil-water microemulsions. **Journal of Controlled Release**, 10, 237-243, 1989.
- VARTIA, K.O. Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian, V., Hale, M. E. (Eds.), **The Lichens**. Academic Press, New York, pp. 547-561, 1973.
- VAUTHIER, C., DUBERNET, C., CHAUVIERRE, I., BRIGGER, P. COUVREUR, P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 93, 151-160, 2003.
- VAVASSEUR, A., GAUTIER, H., THIBAUD, M. LASCÈVE, G. Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis* L. **Journal of Plant Physiology**, 139, 90-94, 1991.
- ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., MAINCET, P., DELLACHERIE, E., ALONSO, M. J., LABRUDE, P. VIGNERON, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. **Journal of Controlled Release**, 50, 31-40, 1998.
- YAMAMOTO, Y., KINOSHITA, Y., MATSUBARA, H., KINOSHITA, K., KOYAMA, K., TAKAHASHI, K., KURUKAWA, T. YOSHIMURA, I. Screening of biological activities and isolation-active compounds from lichens. **Recent Research and Development in Phytochemistry**, 2, 1998.
- YOO, H. S., OH, J., LEE, K. H. PARK, T. G. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. **Journal of Controlled Release**, 68, 419-431, 2000.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL:

Determinar as atividades citotóxica, tóxica e antitumoral de um sistema carreador de fármaco, nanocápsulas de copolímero biodegradável de ácido láctico e glicólico (PLGA), contendo o ácido fumarprotocetrárico, extraído de *Cladonia verticilaris*, visando uma possível aplicação anticancerígena e tuberculostática.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Encapsular o ácido fumarprotocetrárico em nanocápsulas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA 50/50), utilizando o óleo de soja ou uma mistura de microemulsão (O/A) e óleo de soja, como fase oleosa interna;
- 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 fumarprotocetrárico a partir das nanocápsulas;
- Estudar a citotoxicidade do ácido fumarprotocetrárico, livre e encapsulado, frente às células humanas de câncer de pulmão (NCI-H 292) e câncer epidermóide de laringe (HEp-2);
- Determinar a toxicidade *in vivo* do ácido fumarprotocetrárico, livre e encapsulado, em modelos animais murinos;
- Analisar a atividade antitumoral *in vivo* do ácido fumarprotocetrárico, livre e encapsulado, frente ao Sarcoma 180, em camundongos.

ARTIGO

**ANTITUMOR ACTIVITY AND TOXICITY OF FUMARPROTOCETRARIC
ACID-LOADED NANOCAPSULES**

**Trabalho a ser submetido ao
“International Journal of Pharmaceutics”**

Antitumor activity and toxicity of fumarprotocetraric acid-loaded nanocapsules

Ana C. Simonetti^{a,b}, Noemia P. Santos^a, Milena. S. Ferraz^a, Daniele B. Cruz^a, Silene C. Nascimento^c, Eugênia C. Pereira^c, Nicácio H. Silva^b, Nely K. Honda^d, Nicodemos T. Pontes^a, E. Sócrates T. Egito^c and Nereide S. Santos-Magalhães^{a,b *}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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

^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE

^cDepartamento de Antibióticos, Setor de Farmacologia, Laboratório de Cultura de Células e Cancerologia Experimental, UFPE, Brasil

^dUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, Laboratório de Produtos Naturais, UFMS, Brasil

^eUniversidade Federal do Rio Grande do Norte, Laboratório de Sistemas Dispersos, UFRN, Brasil

Keywords: Fumarprotocetraric acid; Nanocapsules; Microemulsions; Cytotoxicity; Toxicity; Antitumor activity

*Corresponding author

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães (✉)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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, Brazil

Tel: +55-081-32718587; fax: +55-081-32718485

E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

Nanoparticles are polymeric colloidal carriers used as drug delivery systems. Oil-in-water microemulsions as a drug delivery system include improvement of drug solubilization. The main purpose of this work is to investigate the cytotoxicity, toxicity and antitumor activity of free and fumarprotocetraric acid (FPA), obtained from *Cladonia verticillaris*, encapsulated into PLGA-nanocapsules.

Results showed that the efficiency of the fumarprotocetraric acid into PLGA-nanocapsules in different carries was 49.5% (FPA-NC) and 86.2% (FPA-NC/ME) respectively. The viability of NCI-H 292 and HEp-2 cells treated with FPA, NC and FPA-loaded nanocapsules was observed even at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. In contrast, the NCI-H 292 and HEp-2 cells treated with o/w microemulsion (ME) or FPA-ME promoted a high cytotoxicity at $6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 25% and 35% cell viability, respectively. The treatment with FPA encapsulated in NC/ME promoted pronounced injuries in liver and kidneys of animals. However the antitumor activity promoted by free FPA, unloaded-nanocapsules and FPA-loaded nanocapsules evaluated on Sarcoma 180-bearing mice promoted 61.4% of tumor inhibition when compared with free FPA (58.9%) in relation to the control group.

The nanoencapsulation with microemulsion without Cremophor® can therefore be considered as a potential alternative to improve solubilization of lichens metabolites, such as fumarprotocetraric acid.

1. Introduction

The key purpose of nanotechnology is the design of miniaturized drug carrier systems to achieve suitable stability, improved absorption, controlled release, quantitative transfer and, therefore, the expected pharmacodynamic activity (Santos-Magalhães *et al.*, 2000). The potential of site specific delivery in optimizing drug targeting has provided a tremendous advancement in handling new dosage forms such as nanoparticles, which are solid colloidal polymeric carriers in size range of 1-1,000 nm (Gaur *et al.*, 2000).

Nanoparticles may act as a drug vehicle able to target tumor tissues or cells, to a certain extent, while protecting the drug from a premature inactivation during its transport. Thus, in order to deliver therapeutic agents to tumor cells *in vivo*, one must overcome the following challengers: (i) drug resistance at the tumor level due to physiological barriers (noncellular based mechanisms), (ii) drug resistance at the cellular level (cellular mechanisms), and (iii) distribution, biotransformation, and clearance of anticancer drugs in the body (Brigger *et al.*, 2002).

Nanovesicular drug delivery systems varying in size from 20 to 500 nm encompasses mainly unilamellar liposomes and nanocapsules (Fessi *et al.*, 1989). Nanocapsules are an attractive choice because of their oil-based central cavities, which allow a high encapsulation level for lipophilic substances such as atovaquone (Cauchetier *et al.*, 2003). The two main factors that have limited the practical applications of liposome technology are the sensitivity of phospholipid membranes to environmental degradation, and rapid drug leakage across the phospholipidic bilayer (Grit *et al.*, 1989). Furthermore, many liposomes have presented a low encapsulation efficiency, a poor storage stability, and a rapid leakage of water-soluble drugs in the blood (Soppimath *et al.*, 2001).

Microemulsions have been proposed as potential drug carrier systems for oral, topical and parenteral administration. They offer the advantage of spontaneous formation, thermodynamic stability (Tenjarla, 1999). Moreover, further advantages of o/w microemulsions as a drug delivery system include improvement of drug solubilization and bioavailability, potential for parenteral use, easy manufacturing and scale-up, and production on large industrial scale without high-energy homogenization (Park & Kim, 1999).

Lichens are symbionts of fungi and algae. They commonly produce a large number of organic compounds, which can easily be isolated from their tissues (Bose and Banerjee, 1976). Lichenic metabolites exhibit many pharmacological properties such as antimicrobial (Bustinza, 1951; Pereira, 1991), cytostatic (Ravinskaya and Vainhstein, 1975; Lawrey, 1977), antitumor (Fukuoka *et al.*, 1968) and other activities (Appa-Rao and Prabhakar, 1987).

The fumarprotocetraric acid, a β -orcinol depsidone, is an aromatic aldehyde that contains an ester side chain with a vinylic unsaturated carboxylic acid (Edwards *et al.*, 2003). The biosynthesis of the fumarprotocetraric acid has normally been confirmed by using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris* (Fontaniella *et al.*, 2000).

The protolichesterinic acid, an α -methylene- γ -lactone, and the fumarprotocetraric acid, a β -orcinol depsidone, are considered the major biologically active secondary metabolites in the lichen *Cetraria islandica* (L.) Ach., also known as Iceland moss. Its antibacterial activity has been attributed to protolichesterinic acid as well as fumarprotocetraric acid. Lichens have long been used for medicinal purposes throughout the ages and some, such as *Cetraria islandica* (Iceland moss), *Lobaria pulmonaria* e *Cladonia* species were widely reputed to be effective in the treatment of pulmonary tuberculosis (Vartia, 1973).

The present work is concerned with the preparation of injectable nanocapsules of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) prepared with and without o/w microemulsion as oily internal phase. Fumarprotocetraric acid was encapsulated in both colloidal carriers in order to compare the antitumor activity of such systems. Furthermore, physicochemical properties, cytotoxicity, and toxicity of these preparations were investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Poly (D,L-lactic-acid-co-glycolic acid) polymer (PLGA) 50:50 was purchased from Birmingham Polymers (USA); soya phosphatidylcholine (Epikuron 200) was obtained from Lucas Meyer (Germany); poloxamer (Synperonic F-68[®]) was generously supplied by ICI (England); analytical grade solvents, monobasic potassium phosphate, sodium hydroxide and all other reagents with analytical grade were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); HPLC grade acetonitrile was obtained from SIGMA-

Aldrich (USA). Fumarprotocetraric acid (FPA) was extracted from *Cladonia verticillaris* (Paraíba, Brazil), and characterized at the Chemistry Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Brazil. Human lung cancer (NCI-H 292) and larynx epidermoid carcinoma (HEp-2) cell lines were obtained from the 'Animal Cell Catalogue', Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil.

2.2. Methods

2.2.1. Formulation of microemulsions

The microemulsions were composed of Epikuron 200[®] as surfactant (S), Cremophor[®] RH 40 as cosurfactant (CS), Captex[®] 200 as oily phase (O), and pH 7.4 phosphate buffer, as aqueous phase (A). The Epikuron 200, Cremophor[®] RH 40 and Captex were mixed, and then, the aqueous phase was poured into under shaking with an Ultra Turrax apparatus (22,000 rpm for 5 min). The air incorporated to the system was removed by ultra-sound (ultra-sound cleaner, 5 min) and the system was refrigerated for 48 h at 4°C. Following another homogenizing cycle was carried out using the same previous conditions (Ultra-Turrax). Finally, the system was filtrated by 0.8 mm STAR membrane (Damasceno, 2004).

2.2.2. Formulation of fumarprotocetraric acid loaded-nanocapsules

Two different nanocapsule formulations containing fumarprotocetraric acid (FPA) were prepared using the copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA 50/50). The first one consisted in using soybean oil as oily phase, whereas the other one was prepared with a mixture of soybean oil and an oil-in-water microemulsion as the oily phase.

Nanocapsules formulations were manufactured according to the interfacial deposition of a pre-formed copolymer method (Fessi *et al.*, 1989). Briefly, the organic phase was prepared as follows. The polymer, the phospholipid and the soybean oil were each separately dissolved in 27 ml of acetone. The fumarprotocetraric acid was solubilized either in the soybean oil or in an oil-in-water microemulsion previously prepared (Damasceno, 2004). Acetonic phospholipid solution was obtained by increasing the temperature to 40°C. After dissolution, both organic solutions were mixed and maintained at 40°C under magnetic stirring at 150 rpm. The aqueous phase was consisted of poloxamer in 50 mL of a phosphate buffer solution at pH 7.4 at 0.2 M.

Finally, the organic solution was poured into the aqueous phase under magnetic stirring at 150 rpm. The acetone, which rapidly diffused towards the aqueous phase, was then removed under reduced pressure at 40°C. The colloidal suspension was concentrated to a 10 mL final volume by removing water under the same conditions. Two formulations containing FPA were obtained: FPA-loaded nanocapsules (FPA-NC) and FPA-loaded nanocapsules with microemulsion (FPA-NC/ME). Unloaded similar formulations termed NC and NC-ME were also prepared as control. Formulation parameters such as the nature and the volume of the organic and aqueous phase, the nature and the concentration of surfactants and polymer have relevant implications on the particle size distributions (Jullienne *et al.*, 1992).

2.2.3. Physicochemical characterization and stability assesment of FPA-loaded nanocapsules

The physicochemical analysis of FPA-NC and FPA-NC/ME was carried out immediately after preparation. Parameters such as the macroscopic aspect, pH changes, fumarprotocetraric acid content and encapsulation ratio were analyzed. All formulations were visually observed in order to determine the homogeneity and possible change in appearance. Color, viscosity, material deposition, aggregate formation, creaming, flocculation or eventual phase separation were evaluated. The pH changes were monitored by means of a digital pH-meter with a glass electrode.

Formulated nanocapsules were submitted to both accelerated and long-term stability testing aiming to state the formulation durability. The nanocapsule formulations were subjected to centrifugation (6,000 rpm for 1 h), mechanical stress (150 strokes/min at 37°C during 48 h) and freeze-thawing cycles (16 h at -18°C $\pm$ 1°C, and 8 h at 25°C $\pm$ 1°C) (Jullienne *et al.*, 1992). Long-term stability of nanocapsule suspensions stored at 4 $\pm$ 1°C was examined. Physicochemical properties of preparations were evaluated at 7, 15, 30, 45 and 60 days or until unstability signs.

2.2.4. Assay of the fumarprotocetraric acid

The fumarprotocetraric acid was assayed by high-performance liquid chromatography (Waters chromatograph system, USA). The FPA loaded into nanocapsules was extracted with 200 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) under

ultrasonic agitation for 5 minutes and completed to 10 mL with mobile phase acetonitrile/water (9:1). The FPA quantification was performed according to an isocratic method. The chromatographic run was performed using a Bondapack C18 column (10 mm particle size, 125 Å, 300 mm × 3.9 mm I.D., Waters, USA) and a mobile phase consisted of acetonitrile/water (9:1) at a flow-rate of 1 mL/min. The fumarprotocetraric acid peak was detected at a wavelength of 254 nm, with a retention time of about 1.8 min. The calibration curve was prepared with solutions of FPA with DMSO ranging in concentration from 2 to 10 mg/mL. The total sample volume injected into HPLC system was 20 mL.

2.2.5. Fumarprotocetraric acid encapsulation efficiency

The encapsulation ratio of FPA into nanocapsules was determined after ultrafiltration performed through ultracentrifugation using ultrafreeÒ units (Millipore, USA) for 1 h. The FPA concentration in the supernatant was determined by HPLC as above described. The FPA encapsulation ratio was calculated on the basis of the total FPA content into the nanocapsule formulation.

2.2.6. In vitro release profile of FPA loaded-nanocapsules

The in vitro release profile of FPA from nanocapsules was determined according to Santos-Magalhães et al., (1995). An aliquot of 5 mL of the fumarprotocetraric acid loaded-colloidal suspensions were directly placed into a dialysis bag (cellulose membrane, cut off 12, 000, Sigma-Aldrich-D9652). The sample introduced in an dialysis bag was then placed into 250 mL of a solution (phosphate buffer, pH 7.4). The system was thermostated at $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and maintained under magnetic stirring at 140 rpm. At given time intervals (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360 minutes and 24, 48, 72 h), 2 mL aliquots of the dissolution medium was withdrawn and the FPA content was measured by the HPLC assayed as above described. The FPA released amount was calculated in relation to the initial content of FPA into nanocapsules. Assays were performed in triplicates and results were expressed in percentage of the mean values and their deviation.

2.2.7. Cytotoxicity of FPA loaded-nanocapsules

The cytotoxic effect of free and encapsulated fumarprotocetraric acid was evaluated on human lung cancer cell (NCI-H 292) and larynx epidermoid carcinoma cell line (HEp-2). The cytotoxicity was evaluated by the colorimetric technique using 3-(4,5-dimethylthiazole-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Mosmann, 1983 modified by Alley *et al.*, 1988). Cell suspensions were diluted to 10^5 .cells.mL⁻¹ and aliquots of 220 µL of such a suspension were seeded on 96 well plates. After 24 hours, samples of free and encapsulated FPA were placed in contact with NCI-H 292 and HEp-2 cells at different concentration ranging from 6.25 µg.mL⁻¹ to 50 µg.mL⁻¹. After 72 h incubation of cells, a solution of MTT (25 µL/well) was added and plates were incubated for 2 hours. The supernatant was removed and DMSO (100 µL/well) was added to dissolve the formazan crystals. The reading of plates was carried out at 590 nm. The maintenance of cells and all experiments were carried out at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. DMSO (2%) and unloaded nanocapsules were used at the same sample concentrations as controls. Each dosage group was assessed in quadruplicate. Results are expressed as the mean values of viable cells and their respective deviation.

2.2.8. Toxicity of FPA- loaded nanocapsules

The toxicity of FPA was assessed in Swiss albino mice, which were randomly divided in four groups with six animals each one. Animals received daily intraperitoneal injections of free, unloaded-nanocapsule and encapsulated fumarprotocetraric acid (FPA, NC and FPA-NC/ME) at a dose of 11 mg/kg body weight for 8 weeks. The control group was treated with buffered phosphate saline (pH 7.4). After treatment, animals were sacrificed and their organs (liver, kidneys, and spleen) were submitted to histopathological analyses. Sample tissues were preserved in a 10% buffered-formaline solution until paraffin inclusions. Slices of sample tissues (4 µm) were prepared, and a staining with haematoxyline and eosine was developed before examination by optical microscopy (Olympus BH-2, Japan).

2.2.9. Antitumor activity of FPA loaded-nanocapsules

The antitumor activity of FPA loaded-nanocapsules was evaluated in mice against Sarcoma 180. Tumor ascytic cells (5.10^6 cells.mL⁻¹ suspension) were

subcutaneously inoculated into male Swiss mice (34-41 g body weight, 45-60 days old). Four groups of six animals were randomly established as control and treated groups. Chemotherapy started after 24 h of tumor implantation by intraperitoneal injections of free FPA or FPA loaded-nanocapsules (FPA-NC) at a dose of 15 mg.kg⁻¹ per day for 7 days. The control groups were treated with buffered phosphate saline (pH 7.4) or unloaded nanocapsules. After a week treatment, animals were sacrificed, tumor and organs (liver, spleen and kidneys) were removed. Tumor weights were measured and tumor inhibition was then calculated for treated animal groups in relation to the untreated control group. Animal organs were submitted to histopathological analyses as above described. Animal experiments were performed according to the National Cancer Institute (NCI) (Geran *et al.*, 1972) with the approval of the Ethic Committee for Animal Experimental Assays of the Federal University of Pernambuco, Brazil.

3. Results and discussions

3.1. Preparation of fumarprotocetraric acid-loaded nanocapsules (FPA-NC)

Initially, an attempt to optimize the amount of FPA incorporated in PLGA-nanocapsules were performed to guide the choice of a stable formulation. The concentration of constituents and parameters of formulations were varied (table 1). Several FPA-NC and FPA-NC/ME formulations were developed and evaluated according to their initial physicochemical characteristics and their long-term stability. The FPA showed limited solubility in different solvents including acetone. In order to solve this solubility issue, FPA was solubilized in an oil-in-water microemulsion previously prepared. Therefore FPA (5 mg) was incorporated in the o/w microemulsion (1.5 mL) and then introduced in the soybean oily phase. Furthermore, acetone (7 mL) was added to the oily phase to provide a better drug solubilization. The influence of the type and concentration of the oil was also analyzed. Concerning the oil nature, it was verified that soybean oil allowed more stable nanocapsules than sunflower oil. The influence of the concentration of PLGA (50/50) on the stability of nanocapsules was evaluated varying from 0.270 to 0.150 g. An amount of 150 mg of PLGA (50/50) was considered enough to obtain stable nanocapsules with a better physicochemical aspect after submission to accelerated testing (centrifugation, mechanical stress and freeze-thawing cycles). A 1:1 hydrophilic-hydrophobic surfactant ratio was required to maintain the equilibrium of this system.

Table 1. The nature and concentration of constituents in nanocapsule formulations

Constituents	Formulations									
	NC1	NC2	NC3	NC4	NC5	NC6	NC7	NC8	NC9	NC10
PLGA (50:50mg)	270	200	250	150	150	150	200	200	150	150
Epikuron 200 (mg)	253	200	200	150	150	150	200	200	200	220
Poloxamer (mg)	250	200	200	150	150	150	200	200	200	220
Soybean Oil (mg)	270	200	250	150	150	150	200	200	150	150
Microemulsion (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*FPA (mg)	80	10	10	15	10	20	10	10	10	10
Acetone (ml)	28	26	27	26	28	28	22	26	40	30
DMSO (ml)	-	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.8	0.2	-	-
Phosphate buffer solution (pH 7.4 at 0.2M)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Final Volume	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

*FPA - Fumar Protocetraric Acid

Constituents	Formulations									
	NC11	NC12	NC13	NC14	NC15	NC16	NC17	NC18	NC19	NC20
PLGA (50:50mg)	150	150	140	130	120	120	120	120	110	110
Epikuron 200 (mg)	200	170	160	160	160	150	150	130	120	120
Poloxamer (mg)	200	170	160	160	160	150	150	130	120	120
Soybean Oil (mg)	120	120	100	100	100	110	100	100	100	100
Microemulsion (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*FPA (mg)	10	10	10	15	10	10	10	10	5	5
Acetone (ml)	38	30	30	26	30	30	28	33	28	30
DMSO (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0.1	-
Phosphate buffer solution (pH 7.4 at 0.2M)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Final Volume	10	10	10	10	10	10	30	10	10	10

Constituents	Formulations									
	NC21	NC22	NC23	NC24	NC25	NC26	NC27	NC28	NC29	NC30
PLGA (50:50mg)	125	150	125	125	120	130	150	150	150	130
Epikuron 200 (mg)	100	150	150	100	130	120	125	125	120	125
Poloxamer (mg)	100	150	150	100	130	120	125	125	120	125
Soybean Oil (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Microemulsion (ml)	-	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-
*FPA (mg)	-	-	-	-	-	-	-	5	6	7
Acetone (ml)	25	25	25	26	25	25	28	27	30	30
DMSO (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphate buffer solution (pH 7.4 at 0.2M)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Final Volume	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

3.2. Stability assessment of fumarprotocetraric acid-loaded nanocapsules

Nanocapsules suspension presented an initial macroscopic aspect of a colloidal fluid with bluish hue reflect. This property is a preliminary evidence for the formation of nanocapsules.

Nanocapsule suspensions prepared with and without o/w microemulsion were submitted to mechanical resistance testing. Only the preparation with o/w microemulsion maintained stability after mechanical agitation and centrifugation of nanocapsules. Both nanocapsule suspensions hold stability even after the seventh freeze-thaw cycle. The stability of both nanocapsule formulations was maintained for two months when stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. A slight decrease in pH values was observed over a period of 60 days for the nanocapsules. The pH varied from 7.37 to 6.65 and from 7.43 to 6.88 for FPA-NC and FPA-NC/ME formulations, respectively (Fig. 1).

The encapsulation efficiency of the fumarprotocetraric acid into PLGA-nanocapsules in different carriers was 49.5% (FPA-NC) and 86.2% (FPA-NC/ME) respectively.

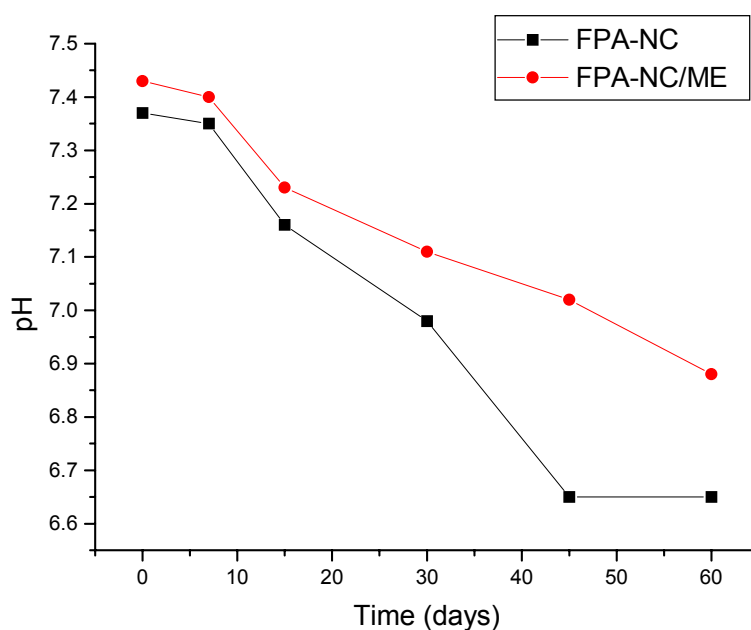


Figure 1. The pH evolution for nanocapsule formulations: (●) FPA-NC, and (■) FPA-NC/ME stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3. *In vitro* release kinetic of FPA-loaded nanocapsules

The kinetic profile of FPA from nanocapsule-microemulsion formulation presented a gradual augmentation on the drug release, achieving 40.8% at 4 hours (Fig. 2). Considering that the FPA encapsulation ratio of this system was 86.2%, less than 50% of the encapsulated drug was released during 4 h, when a bulk saturation was observed.

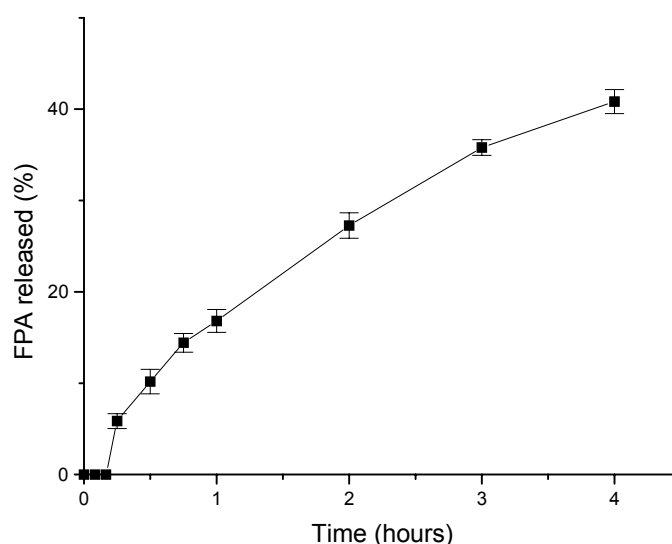


Figure 2. *In vitro* kinetic profile of FPA-loaded nanocapsules prepared with o/w microemulsion (FPA-NC/ME).

3.4. Cytotoxicity activity of FPA loaded-nanocapsules

The cytotoxicity of the fumarprotocetraric acid on NCI-H 292 and HEp-2 cells after 72 h incubation at different concentrations is shown in figure 4. The viability of NCI-H 292 cells treated with FPA, NC and FPA-loaded nanocapsules was observed even at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 3a). In contrast, the cell treatments with o/w microemulsion (ME) or FPA-ME promoted a high cytotoxicity at $6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (25% cell viability). Nevertheless, treatments with FPA-loaded nanocapsules-microemulsion system promoted a reduction on the cytotoxic effect allowing the determination of the IC_{50} ($12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Concerning HEp-2 cells (Fig. 3b), their viability was preserved after treatment with FPA, NC or FPA-NC even at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The treatment with FPA o/w microemulsion (ME) and FPA-ME promoted a similar cytotoxic effect (~35% cell viability) at $6.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Results showed that FPA have no cytotoxic effects on NCI-H

292 or HEp-2 cells, and FPA-loaded nanocapsules have no cytotoxic effect on NCI-H 292 cells. In contrast, the o/w microemulsion exhibited a high cytotoxicity on both cells.

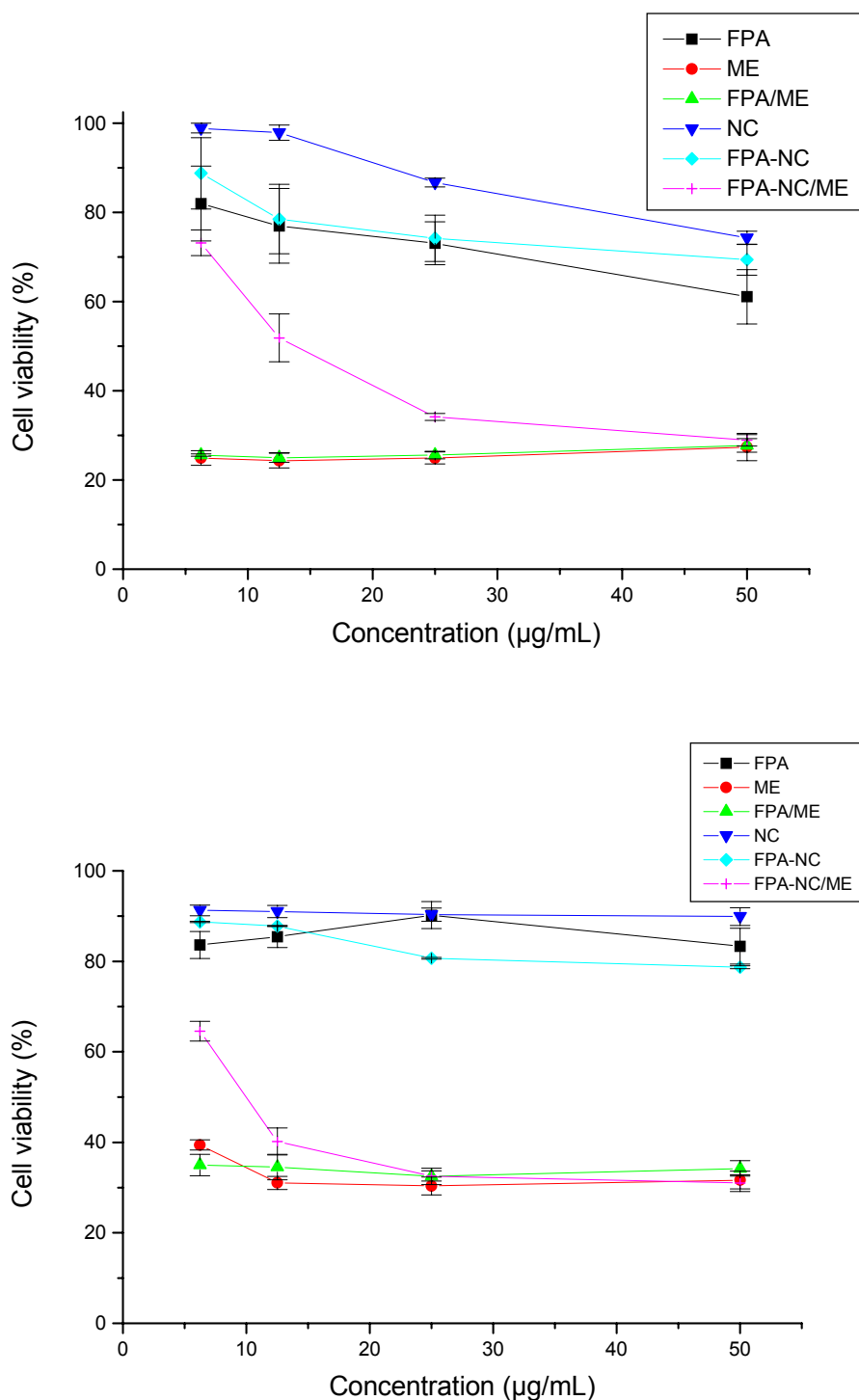


Figure 3. The cytotoxic effect of the treatment with FPA-loaded nanocapsules with or without oil-in-water microemulsion on (A) NCI-H 292 and (B) HEp-2 cells.

3.5. Toxicity of FPA-loaded nanocapsules

No behavioral alterations were observed in animals during the toxicity assay. No statistically significant difference in body weight was detected for animals treated with free and encapsulated FPA in relation to the control group. Histopathological analysis of spleen, liver and kidneys of animals treated with free FPA and FPA-loaded nanocapsules prepared with microemulsions are illustrated in figure 4. No alterations on animal organs were revealed after treatment with FPA suspension (Fig. 4.Ia/b/c). After treatment with unloaded and FPA-loaded nanocapsules-microemulsion, no significant alteration was detected in animal spleen (Fig. 4.IIa), which preserved their primary folliculus. However the treatment with FPA encapsulated in NC/ME promoted pronounced injuries in liver (Fig. 4.IIb) and kidneys (Fig. 4.IIc) of animals. Cellular and renal tubules necroses were detected in kidneys with an accentuated mesangioproliferated glomerulonephrites. Furthermore intense areas of necroses in hepatocytes were observed.

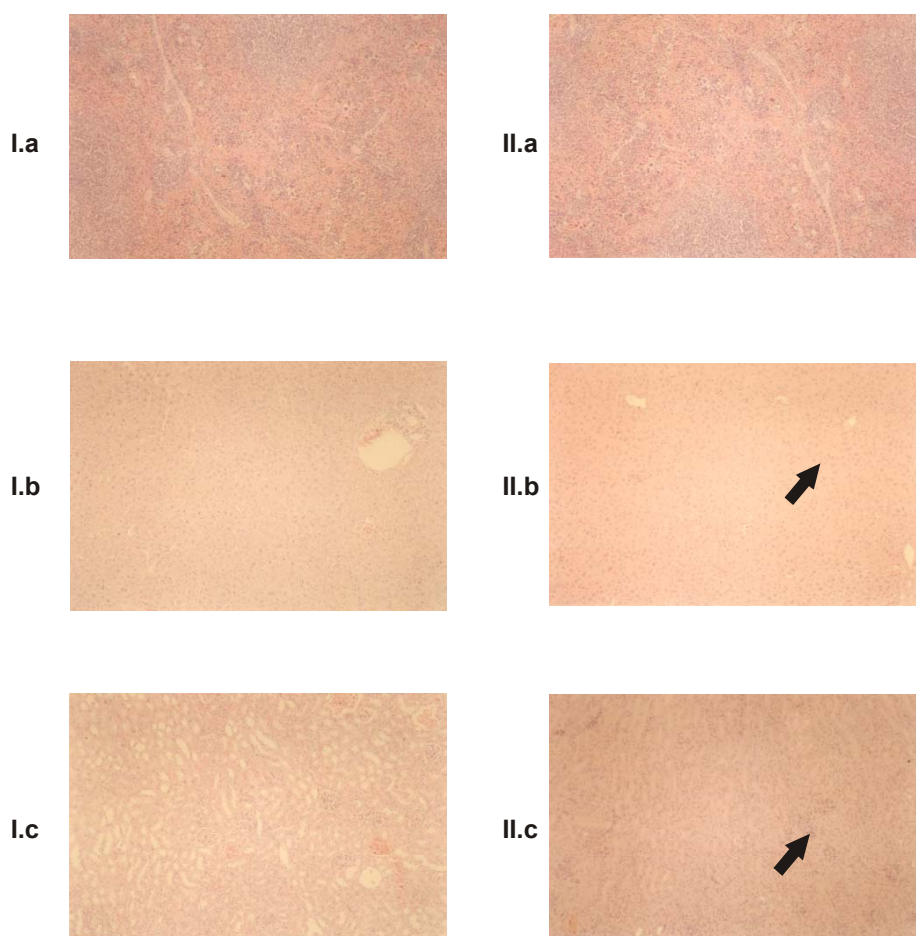


Figure 4. Histopathological aspect of animal organs after treatments with with free FPA (I) and FPA-loaded nanocapsules with o/w microemulsion (II): (a) spleen, (b) liver and (c) kidneys. The magnificence was 20× (➡ arrays denote area of necrosis).

3.7. Antitumor activity of FPA loaded-nanocapsules on Sarcoma-180 tumor

The antitumor activity promoted by free FPA, unloaded-nanocapsules and FPA-loaded nanocapsules were evaluated on Sarcoma 180-bearing mice Fig. 5 and Fig.6, respectively. Fumarprotocetraric acid-loaded nanocapsules promoted 61.4% of tumor inhibition when compared with free FPA 58.9 % in relation to the control group. Furthermore, unloaded nanocapsules exhibited a tumor inhibition of 6.0%.

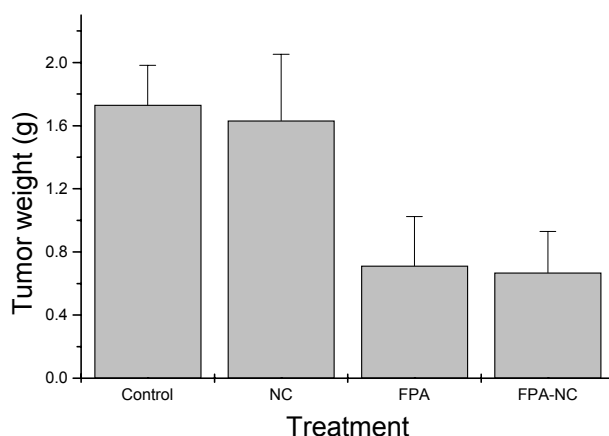


Figure 5. Evaluation of tumor weight after treatment with FPA, unloaded-nanocapsules and FPA-loaded nanocapsules (FPA-NC), without o/w microemulsion.

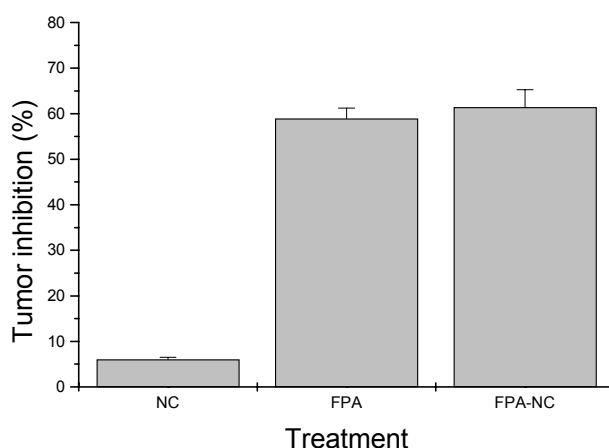


Figure 6. Evaluation of the antitumor activity of FPA-loaded nanocapsules against Sarcoma-180: free FPA and FPA-loaded nanocapsules (FPA-NC), without o/w microemulsion.

3.7.1. Histopathological analysis

No histological alterations were observed in organs of animals treated with free (Fig. 7.I) and FPA-loaded nanocapsules (Fig. 7.II). No morphological alterations were observed in spleen, liver and kidneys of the animals treated with free FPA and FPA-loaded nanocapsules, differently of showing extensive areas of necrosis and angioproliferated glomerulonephrites of groups treated with oil-in-water microemulsion.

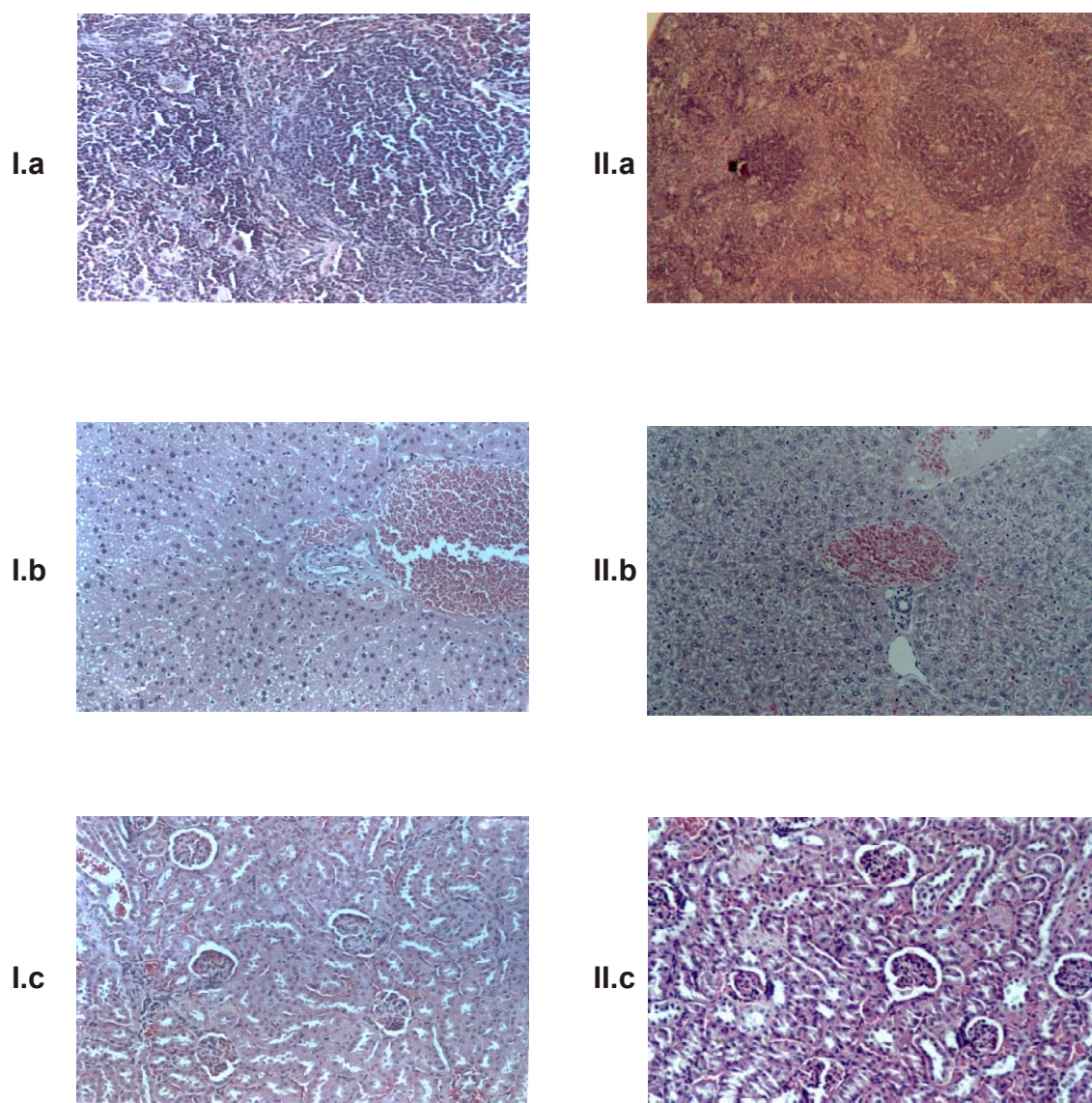


Figure 7. Histopathological aspect of animal organs after treatments with with free FPA (I) and FPA-loaded nanocapsules without o/w microemulsion (II): (a) spleen, (b) liver and (c) kidneys. The magnificence was 50 $\times$.

4. Conclusions

Results showed that encapsulation of a poorly water soluble drugs, fumarprotocetraric acid, into PLGA-nanocapsules can be a potential alternative to allow in a diversity of therapeutical applications. The nanoencapsulation with oil-in-water microemulsion can therefore be considered as a potential alternative to improve solubilization of lichens metabolites, such as fumarprotocetraric acid. However o/w microemulsions prepared with Cremophor® exhibited *in vitro* and *in vivo* toxicity.

Acknowledgements

This work received financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and a grant from the Brazilian Programm on Nanobiotechnology (CNPq/MCT-Nanobiotec).

References

- ALLEY, M. C., SCUDIERO D. A., MONKS A., HURSEY M. L., CZERWINSKI, M. J., FINE, D. L., ABBOTT, B.J., MAYO, J.G., SHOEMAKER, R.H., BODY, M. R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.**, 48, 589-601.
- APPA-RAO, A. V. N. AND PRABHAKAR, M. C., 1987. Pharmacological actions of leprapinic acid: a lichen metabolite. **Fitoterapia**, 58 (4), 221-228.
- BOSE, L. AND BANERJEE, N. C., 1976. Studies on antibiotics from indian lichens part I. isolation of antibiotic compounds from *Parmelia tinctorum*. **Bull. Botan. Soc. Bengal.**, 30, 125-127.
- BRIGGER, I., DUBERNET, C. COUVREUR, P., 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv. Drug Del. Rev.**, 54, 631-651.
- BUSTINZA, F., 1951. Anticacterial substances from lichens. **Endeavour**, 10 (38), 95-99.
- CAUCHETIER, E., DENIAU, M., FESSI, H., ASTIER, A., PAUL, M., 2003. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer in vitro characteristics. **Int. J. Pharm.**, 250, 273-281.

DAMASCENO, B. P. G. L., 2004. **Estudo do comportamento físico-químico e farmacotológico da anfotericina B em microemulsões do tipo O/A**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Brasil.

EDWARDS, H. G. M., NEWTON, E. M., WYNN-WILLIAMS, D., 2003. Molecular structural studies of lichens substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **J. Mol. Struct.**, 1-11.

FESSI, H.; PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J. P., AMMOURY, N. E., BENITA, S. N., 1989. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharma.**, 55, 1-4.

FUKUOKA, F., NAKANISHI, M., SHIBATA, S., NISHIKAWA, Y., TAKEDA, TANAKA, M., 1968. Polysaccharides in lichens and fungi II. Antitumor activities on sarcoma-180 of the polysaccharide preparations from *G. esculenta*, *C. Islandica*, and some other lichens. **Gann**, 59, 421-432.

FONTANIELLA, B., LEGAZ, M. E., PEREIRA, E. C., SEBASTIAN, B. VICENTE, C., 2000. Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Biotechnol. Letters**, 22 (10), 813-817.

GAUR, U., SAHOO, S. K., DE, T. K., GHOSH, P. C., MAITRA, A., GHOSH, P. K., 2000. Biodistribuiton of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. **Int. J. Pharma.**, 202, 1-10.

GERAN, R. I., GREENBERG, N. H., MacDONALD, M. M., SCHUMACHER, A. M., ABBOT, B. J., 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems, 3^a ed. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 3, Part III, 2.

GRIT, M., DE SMIDT, J. H., STRUIJKE., CROMMELIN, D. J. A., 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. **Int. J. Pharma.**, 50, 1-6.

JULIENNE, M. C., ALONSO, M. J., GOMEZ AMONZA, J. L., BENOIT, J. P., 1992. Preparation of poly (DL-lactide-glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribuiton: application of experimental designs. **Drug Devel. Ind. Pharm.**, 18, 1063-1077.

LAWREY, M., 1977. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia species*. **Bull. Torrey Bot. Club**, 104 (1), 49-52.

MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Met.**, 65, 55-63.

PARK, K. & KIM, C. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 181, 173-179, 1999.

PEREIRA, E. C. G., CAMPOS-TAKAI, G. M., SILVA, N. H., VICENTE, C., LEGAZ, M. E., XAVIER-FILHO, L., 1991. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Bol. Soc. Brot.**, 64, 173-186.

RAVINSKAYA, A. P. AND VAINSTEIN, E. A., 1975. Effect of some ecological factors on the content of lichen substances. **Ekologia**, 6 (3), 82-85.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., FESSI, H., PUISIEUX, F., BENITA, S. SEILLER, M., 1995. An in vitro release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of chlofibrade. **J. Microencap.**, 12, 2, 195-205.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V. M. W., CAETANO, M. N. P., 2000. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int. J. Pharm.**, 208, 71-80.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R. RUDZINSKI, W. E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, 70, 1-20.

TENJARLA, S., 1999. Microemulsions: an Overview and Pharmaceutical Applications. **Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.**, 16 (5), 61-521.

VARTIA, K.O. Antibiotics in lichens., 1973. In: Ahmadjian, V., Hale, M. E. (Eds.), **The Lichens**, Academic Press, New York, pp. 547-561.

5. CONCLUSÕES

- Foram obtidas nanocápsulas de PLGA, contendo o ácido fumarprotocetrárico, preparadas sem (FPA-NC) e com o sistema de microemulsão O/A (FPA-NC/ME), como fase oleosa interna, e na concentração de 0,5 mg/mL, com uma taxa de encapsulação de 49,5 e 86,2%, respectivamente.
- O perfil cinético de liberação *in vitro* do ácido fumarprotocetrárico a partir de nanocápsulas (FPA-NC/ME) demonstrou uma liberação máxima de 40,8%, nas primeiras 4 horas, demonstrando uma liberação gradual ao longo do tempo.
- A viabilidade das células NCI-H 292 e HEp-2 tratadas com FPA, NC e FPA-NC foram observadas até a concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em contraste, o tratamento realizado com as formulações ME, FPA-ME e FPA-NC/ME exibiram elevada citotoxicidade, em ambas linhagens.
- O perfil de toxicidade *in vivo* demonstrou que o FPA encapsulado com o sistema microemulsão promoveu lesões significativas, hepática e renal, confirmadas através da análise histopatológica dos órgãos.
- Evidenciou-se que formulações preparadas sem o sistema de microemulsão O/A promoveram uma inibição tumoral de 61,4%, quando comparado com a sua forma livre (58,9%), frente ao Sarcoma 180.
- Alterações histopatológicas não foram observadas, após o tratamento quimioterápico com o FPA em ambas formas, livre e encapsulada, quando comparadas ao grupo controle.
- A nanoencapsulação com o sistema de microemulsão O/A pode ser considerada uma alternativa para melhorar a solubilização de substâncias lipofílicas pouco solúveis em água, tal como o ácido fumarprotocetrárico. Entretanto, microemulsões preparadas com o Cremophor® promove uma considerável toxicidade *in vitro* e *in vivo*;
- Estes resultados indicam que a nanoencapsulação continua sendo uma alternativa para a aplicação terapêutica de fármacos com ação anticancerígena, tanto para a obtenção de uma melhor eficácia terapêutica quanto para a minimização dos efeitos tóxicos.

ANEXOS
