

**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**

**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.

Atividade Antitumoral e Toxicidade de Nanocápsulas...

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 ±1°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× (➡ 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×	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 a 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.