



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NANOCÁPSULAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO DE
***Cladonia substellata* (VAINIO) COM POTENCIAL AÇÃO**
ANTITUMORAL

NOEMIA PEREIRA DOS SANTOS

Recife/PE- Brasil

2003

NOEMIA PEREIRA DOS SANTOS

**NANOCÁPSULAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO DE
Cladonia substellata (VAINIO) COM POTENCIAL AÇÃO
ANTITUMORAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas na área de Biotecnologia.

Orientadora:
Prof^a. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Co-Orientadora:
Prof^a. Dra. Silene Carneiro Nascimento

**NANOCÁPSULAS DE PLGA CONTENDO ÁCIDO ÚSNICO DE
Cladonia substellata (VAINIO) COM POTENCIAL AÇÃO
ANTITUMORAL**

NOEMIA PEREIRA DOS SANTOS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sócrates Eraldo Tabosa do Egito
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Silene Carneiro Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

“... Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força, não se glorie o rico nas suas riquezas; mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me conhecer e saber que eu sou o Senhor que faço beneficência, juízo e justiça na terra”;

Jeremias 9:23,24.

Dedico

Aos meus pais Antonio Luiz dos Santos (In memorian) e Severina Pereira dos Santos (In memorian), como reconhecimento ao seu apoio e dedicação proporcionada na construção de meus ideais e objetivos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

	Págs
INTRODUÇÃO.....	18

1.1 Câncer.....	19
1.1.1 Generalidades.....	19
1.1.2 Cancerologia experimental.....	20
1.2 Liquens.....	22
1.2.1 As substâncias liquênicas.....	23
1.2.2 Ácido úsnico.....	24
1.1.2.1 As propriedades biológicas do ácido úsnico.....	27
1.1.2.1.1 Ação antibiótica.....	27
1.1.2.1.2 Ação citotóxica e antitumoral.....	28
1.1.2.1.3 Ação antiviral.....	30
1.1.2.1.4 Ação antiinflamatória, antipirética e analgésica.....	31
1.1.2.2 Mecanismo de ação proposto do ácido úsnico.....	32
1.3 Sistemas de liberação controlada de fármacos.....	33
1.3.1. Sistemas nanoparticulados.....	34
1.3.1.1 Nanocápsulas.....	35
1.3.2 Nanotecnologia farmacêutica e o tratamento do câncer.....	36
1.4. Objetivos.....	40
1.4.1 Geral.....	40
1.4.2 Específicos.....	40

CAPÍTULO I

Usnic acid-loaded PLGA nanocapsules: preparation, physicochemical characterisation and <i>in vitro</i> kinetics release.....	41
---	-----------

CAPÍTULO II

Avaliação citotóxica <i>in vitro</i> de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico sobre células do câncer de pulmão, linhagem NCI –H292.....	68
--	-----------

CAPÍTULO III

Atividade antitumoral <i>in vivo</i> de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico contra o tumor sólido Sarcoma-180.....	87
3. CONCLUSÕES	111
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXO I.....	123
Normas de publicação dos periódicos selecionados	
ANEXO II.....	141
Resumos apresentados em congressos decorrentes da Tese de Doutorado	
ANEXO III.....	145
Parecer do comitê de ética	

AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador de todas as coisas, o qual me proporcionou a vida, saúde, inteligência e fortalecimento na fé, a fim de perseverar sempre a busca do objetivo almejado.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo utilizada como fonte financeira para realização do presente trabalho.

À Profa. Dra. Nereide Stela Santos-Magalhães, pela prestimosa orientação científica, moral e confiança transmitida.

À Profa. Dra. Silene C. Nascimento, pela competência, conhecimentos transmitidos, e inestimável orientação proporcionada.

Ao Prof. Dr. Nicácio H. da Silva, pela esmera dedicação, estímulo, apoio, amizade e colaboração prestada.

À Profa. Dra. Eugênia Cristina, pelo carinho, incentivo, trocas de idéias e colaboração prestada.

A Dra. Nely Kika Honda, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela preciosa colaboração, extraindo, purificando e caracterizando o ácido úsnico.

A Dra. Ana Souto Maior, por facultar as instalações do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Antibióticos, para realização das dosagens químicas em Cromatografia líquida de Alta Eficiência.

Ao Dr. José Figueredo-Silva, do Setor de Patologia - LIKA, pelo apoio e colaboração na interpretação dos exames histopatológicos.

Ao Dr. Cosme Rafael M. Salina, do Setor de Biotecnologia – LIKA, pela valiosa sugestão concedida nos cálculos estatísticos.

A Dra. Célia Maria M. B. Castro, do Setor de Microbiologia – LIKA, pela valiosa colaboração na realização dos ensaios hematológicos.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Maria Rodrigues e Suzete Mendonça, pelo suporte e dedicação dispensada.

À Carmelita B. Lima e Mário Ribeiro, do setor de Patologia - LIKA, pela amizade e eficiência no seu trabalho.

A todos funcionários do LIKA, pela amizade, dedicação e apoio técnico.

Aos funcionários da secretaria do Doutorado, pelo apoio e ajuda prestada durante todos estes anos.

Aos amigos do Setor de Bioquímica - LIKA, pela amizade, atenção e trocas de experiências.

Aos amigos do Grupo de Sistema de liberação controlada - LIKA, pela amizade, companheirismo e auxílio mútuo.

Às alunas de Iniciação Científica, Lílian, Daniele e Marcela pela ajuda e precioso apoio fornecido.

As companheiras Jaqueline Rodrigues e Roseane Ribeiro Costa pelo carinho, incentivo, dedicação, troca de conhecimentos e sugestões, importantes na concretização deste trabalho.

Aos meus familiares, e em especial as minhas irmãs Mirian, Rute e Severina pelo apoio, dedicação e confiança, fundamentais para vencer esta nova etapa da minha vida.

Ao meu noivo Valter Pedro pelo apoio, compreensão, companheirismo e incentivo, importante na conquista de nossos objetivos.

Finalmente, expresso minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho e no alcance de novos horizontes.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Modelo esquemático da anatomia de um talo liquênico (Nash, 1996): A= Algas; B= Medula; C= Córtex	23
Figura 2. Estrutura química do ácido úsnico: a) (+)-(9b-R) e (-)-(9b-S) b) ácido isoúsnico (+)-(9b-R) e (-)-(9b-S) Ingólfssdóttir (2002).....	25
Figura 3. Vias da biosíntese do ácido úsnico proposta por Taguchi et al., (1969).....	26

CAPÍTULO I

Figura 1. Microfotografia eletrônica de varredura de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico após preparação (NC10) 3.500 X.....	60
Figura 2. Evolução do pH de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico armazenado a 4°C ± 1°C (NC10).....	61
Figura 3. Evolução do conteúdo de ácido úsnico dentro de nanocápsulas de PLGA estocados a 4°C±1°C (NC10): a) Dosagens da forma suspensão b) Dosagens da forma Liofilizada.....	62
Figura 4. Perfil cinético de liberação <i>in vitro</i> de ácido úsnico a partir de nanocápsulas de PLGA (NC10).....	64

CAPÍTULO II

Figura 1. Determinação da IC₅₀ do ácido úsnico livre e encapsulado em nanocápsulas de PLGA sobre células NCI -H 292 utilizando o teste de Turkey, admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ($p < 0,05$): UA= ácido úsnico livre, UA-NC= nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico, NC= nanocápsulas de PLGA brancas..... **86**

Figure 2. Aspectos morfológicos de células NCI H-292 (40 X) após tratamento com ácido úsnico livre: controle (a) 100X (b) 200X; ácido úsnico a 2,5µg/ml (c); ácido úsnico a 5µg/ml (d). Legenda: RMC= Redução da monocamada celular; VC= Vacuolização citoplasmática CD= Células desnudas; NC= Necrose celular..... **87**

Figure 3. Aspectos morfológicos de células NCI H-292 (40 X) após tratamento com nanocápsulas contendo ácido úsnico: nanocápsulas de PLGA brancas (a); nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico (5µg/ml) (b). Legenda: MC= Monocamada celular; CMIT= Células mitóticas..... **88**

CAPÍTULO III

Figura 1. Variação da massa tumoral dos animais tratados com ácido úsnico livre e encapsulado contra tumor sólido sarcoma-180: NC= nanocápsulas de PLGA brancas; UA= ácido úsnico livre; UA-NC= nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo teste F ($p < 0,05$). As comparações das médias foram realizadas pelo teste de Turkey ($p < 0,05$). Letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$)..... **104**

Figura 2. Avaliação da atividade antitumoral do ácido úsnico livre e encapsulado contra tumor Sarcoma-180: NC= nanocápsulas de PLGA brancas; UA= ácido úsnico livre; UA-NC = nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico..... **105**

Figura 3. Análises histológicas do tumor sarcoma-180 nos animais tratados (H & E – 50X): a) controle; b) ácido úsnico livre; c) nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico. **106**

Legenda: NP= Núcleos picnóticos, NC= Necrose.....

Figura 4. Análises histológicas do fígado nos animais tratados (H & E – 50X): a) controle; b) ácido úsnico livre; c) nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico.

Legenda: IL= Infiltrado leucocitário, HD= Hepatócitos descaracterizados, VC=

Vacuolização citoplasmática..... **107**

Figura 5. Contagem de hemácias totais (Hem/mm³) da amostra de sangue de camundongos submetidos a tratamentos com ácido úsnico livre e encapsulado comparado a animais não tratados. As comparações das médias foram realizadas pelo teste de Turkey (p < 0,05). Letras iguais não diferem significativamente (p < 0,05).

Legenda: Controle (+) = animais transplantados com sarcoma-180 não tratados; UA = ácido úsnico livre; UA-NC = nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico; NC= nanocápsulas de PLGA brancas; Controle (-) = animais sadios do laboratório..... **108**

Figura 6. Contagem diferencial de linfócitos (10³/mm³) da amostra de sangue de camundongos submetidos a tratamentos com ácido úsnico livre e encapsulado comparado a animais não tratados. As comparações das médias foram realizadas pelo teste de Turkey (p < 0,05). Letras iguais não diferem significativamente (p < 0,05).

Legenda: Controle (+)= animais transplantados com sarcoma-180 não tratados; UA= ácido úsnico livre; UA-NC= nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico; NC= nanocápsulas de PLGA brancas; Controle (-) = animais sadios do laboratório..... **109**

Figura 7. Avaliação da sobrevivência de camundongos vivos transplantados com sarcoma-180 após tratamento com ácido úsnico livre, encapsulado com relação ao controle (animais não tratados)..... **110**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Otimização de nanocápsulas de PLGA contendo ácido úsnico..... 65

Tabela 2. Estabilidade acelerada de nanocápsulas PLGA contendo ácido úsnico
..... 66

Tabela 3. Caracterização físico-química de nanocápsulas PLGA contendo ácido úsnico
(NC10)..... 67

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores leucocitários de camundongos segundo a literatura..... 103

RESUMO

O ácido úsnico [2,6-Diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3[2H,9bH]-dibenzo-furadiona] (UA), composto natural obtido de diversas espécies de líquens, apresenta diferentes atividades biológicas e fisiológicas que podem apresentar grande relevância na farmacologia e clínica. Devido sua relevante ação antimitótica e antiproliferativa, existe potencial interesse de seu uso na terapia do câncer. Não obstante, o sucesso de sua aplicação clínica é limitado a sua dotada ação tóxica e pouca solubilidade em água e solventes orgânicos de alta polaridade. Nanopartículas são carreadores poliméricos que podem modificar o perfil de distribuição do fármaco no organismo. Estes vetores medicamentosos proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejada, potencializando a ação terapêutica e minimizando os efeitos colaterais. O principal objetivo deste estudo consiste em obter e caracterizar físico-quimicamente nanocápsulas de copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) contendo ácido úsnico e investigar a atividade citotóxica e antitumoral do ácido úsnico em comparação com a forma não encapsulada. Nanocápsulas contendo ácido úsnico (UA-NC) foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero. Análises físico-químicas foram realizadas imediatamente após a preparação das nanocápsulas. Subseqüentemente, elas foram submetidas a ambos os testes de estabilidade acelerada e a longo termo. A morfologia e tamanho das partículas de UA-NC foram estudados utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O teor de ácido úsnico nas nanocápsulas foi obtido através de ensaios cromatográficos e a taxa de encapsulação foi determinada após ultrafiltração e centrifugação. O perfil de liberação *in vitro* do ácido úsnico a partir das UA-NC foi determinado utilizando o método de diálise direta. O estudo da atividade citotóxica foi realizado pelo método de cultura de tecidos com células da linha contínua NCI-H 292. A viabilidade celular, foi determinada pelo Azul de Tripán e a ação citotóxica do UA e UA-NC foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Alterações morfológicas nas células NCI H292 tratadas com UA e UA-NC foram analisadas por microscopia óptica utilizando a técnica de Giemsa. A atividade antitumoral foi realizada em camundongos albinos Suíços (*mus-musculus*), frente ao tumor experimental sarcoma-180. Decorridos 24 h de implantação do tumor, foram administrados, intraperitonealmente, injeções de UA, UA-NC e placebo em dose equivalente a 15 mg/ 10 g de peso do animal. Após uma semana de tratamento, foram realizadas coletas de sangue para análises hematológicas e os animais foram sacrificados. Tumores foram removidos, mensurados e pesados e os órgãos (fígado, rins e baço) foram dissecados e submetidos a estudos

histopatológicos. A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio da massa tumoral dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle (não tratado). O ácido úsnico apresentou limitada solubilidade em óleo de girassol, podendo ser encapsulado numa concentração máxima de 1 mg/ml. A formulação manteve um aspecto inicial macroscópico leitoso com reflexo azul opalescente durante 120 dias quando mantida a temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As formulações liofilizadas de UA-NC permaneceram estáveis por um período superior a 36 meses mantendo um aspecto inicial similar. A análise por microscopia de varredura demonstrou partículas bem dispersas, esféricas e homogêneas, com diâmetro médio de 367 ± 81 nm. UA-NC em suspensão após preparação apresentaram um conteúdo de ácido úsnico de $101,7 \pm 1,7$ % e uma taxa de encapsulação de $99,4 \pm 0,16$ %. O perfil cinético de liberação revelou que as UA-NC podem ser utilizadas como sistema de liberação controlada. As concentrações requeridas para inibir 50% do crescimento celular, IC_{50} , foram de aproximadamente 10 e 11,5 $\mu\text{g/ml}$ para o ácido úsnico livre e encapsulado, respectivamente. Citoplasma irregular, com intensas áreas de vacuolização contendo material basófilo foram evidenciados nas células quando submetidas a tratamento com ácido úsnico (5 $\mu\text{g/ml}$). Esta cultura quando tratada com ácido úsnico encapsulado demonstrou uma monocamada quase semelhante ao controle. A encapsulação do UA em nanocápsulas de PLGA promoveu uma inibição tumoral de 68% quando comparado ao tratamento com o ácido úsnico livre. Análises histopatológicas dos tumores tratados revelaram intensas áreas de necroses. Ações tóxicas representadas ao nível de hepatócitos foram evidenciadas no tratamento com UA livre. Estas lesões foram significativamente reduzidas quando os animais foram tratados com ácido úsnico nanoencapsulado. Nenhuma alteração histopatológica foi evidenciada nos rins e baço dos animais tratados. Em conclusão, a encapsulação do ácido úsnico em nanocápsulas de PLGA pode ser uma alternativa promissora a ser explorada para a terapia do câncer.

ABSTRACT

The usnic acid (UA) is a low-molecular weight dibenzofuran derivative [2,6-Diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3[2H,9bH]-dibenzo-furandione] produced by some lichen genera such as *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* and *Evernia*. The UA has extensively been studied mainly because it presents substantial antimitotic activity. Its antibacterial and antimycotic properties, as well as activity against human neoplastic cell lines are well known. However, applications of UA in anticancer therapy have been rather limited due to its high *in vivo* toxicity. Alternative nanoparticulated carriers have been developed aiming to decrease toxic effects of anticancer compounds towards normal tissues and to increase their efficiency against tumors. A several limitation to usnic acid practical use is its low solubility in water and some organic solvents. Alternative nanoparticulated carriers have been developed aiming to decrease toxic effects of anticancer compounds towards normal tissues and to increase their efficiency against tumors. The objective of this work was the preparation of the encapsulated UA into nanocapsules using the biodegradable artificial polymer derived from glycolic and lactic acids (PLGA) and to investigate the cytotoxicity and the antitumoral activity of UA-NC in comparison with free usnic acid. PLGA-nanocapsules containing usnic acid (UA-NC) was prepared by interfacial deposition of preformed polymer method. The physicochemical analyses were performed immediately after nanocapsules preparation. Morphological and structure of the UA-NC was studied using a scanning electron microscope (SEM). Cytotoxicity of free and encapsulated usnic acid was analysed on NCI-H 292 cells. The cytotoxic effects of UA were evaluated by the MTT colorimetric method after 72 hours of cell incubation. Cell morphological abnormalities were observed by microscopy using the Giemsa technique. Antitumoral activity was verified against solid tumour sarcom-180 in Swiss mice, and it was estimated by the tumour inhibition. UA presents a limited solubility in sunflower oil and can be encapsulated into nanocapsules at maximum concentration of 1 mg/ml. The formulation maintained an initial similar macroscopic milky aspect with bluish opalescence reflect over 120 days for storage at $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The stability of PLGA-nanocapsules suspension stored at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ was maintained for 15 days. The lyophilised UA-NC formulation was stable for 36 months maintained an initial similar macroscopic aspect. It could be seen that UA-NC had a spherical form and well-dispersed particles with a mean diameter of $367 \pm 81\text{nm}$. Stable UA-NC suspension presented after preparation a content of $101.7 \pm 1.7\%$ of UA and an encapsulation rate of $99.4 \pm 0.16\%$. The *in vitro* kinetic profile revealed that UA-NC could be used as a controlled release system.

Concentrations required to inhibit 50% of cell growth were 10 and 11.5 $\mu\text{g/ml}$, for free UA and UA-NC, respectively. The cells treated with encapsulated UA formed a monolayer almost similar to that of the control. However, a cytoplasm vacuolization and a condensed appearance of mitotic cells were identified. The encapsulation of UA into PLGA-nanocapsules promoted a 68% increase of tumour inhibition as compared with free UA treatment. Vacuolisation of hepatocytes and a mild lymphocyte infiltration in portal spaces were observed in animals treated with free UA. However, no histological changes were noticed in the kidneys of treated animals. These results suggest the encapsulation can be a potential alternative to allow the use of UA in cancer therapy.