



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI**

**LAÉRCIO BRANDÃO DE ARRUDA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E  
FURTIVAS CONTENDO  $\beta$ -LAPACHONA**

**RECIFE**

**2013**

**LAÉRCIO BRANDÃO DE ARRUDA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E  
FURTIVAS CONTENDO  $\beta$ -LAPACHONA**

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

Orientadora: Profa. Nereide Stela Santos Magalhães, Dra.

**RECIFE**

**2013**

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A779d Arruda, Laércio Brandão de.  
Desenvolvimento, caracterização e avaliação das atividades citotóxica e antitumoral de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo  $\beta$ -lapachona / Laércio Brandão de Arruda. – 2013.  
49 f.: il.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2013.

Inclui referências e apêndices.

1. Nanocápsulas. 2. Farmacocinética. 3. Citotoxicidade. 4. Vetorização de fármacos. I. Magalhães, Nereide Stela Santos (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-246)

**LAÉRCIO BRANDÃO DE ARRUDA**

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E  
FURTIVAS CONTENDO  $\beta$ -LAPACHONA**

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

Aprovada: 30/08/2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Nereide Stela Santos Magalhães, Dra. (Presidente)  
Departamento de Farmácia – UFPE

---

Profa. Noemia Pereira da Silva Santos, Dra. (Examinador Titular)  
Departamento de Histologia do Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE

---

Profa. Milena Sales Ferraz, Dra. (Examinador Titular)  
Departamento de Ciências Biológicas – UFPE

---

Profa. Beate Saegesser Santos, Dra. (Suplente Interno)  
Departamento de Farmácia – UFPE

---

Profa. Mariane Cajubá de Britto Lira, Dra. (Suplente Externo)  
Departamento de Bioquímica do Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo seu Amor e por sua presença em meus caminhos;

Aos meus pais, José Laércio de Arruda e Jeane Valéria Brandão de Paiva Arruda, Por serem meus guias, meus exemplos e minha fortaleza. Amo muito vocês;

Aos meus avós, José Severino e Dona Terezinha que já não estão mais entre nós. A meu avô José Marciano. E um agradecimento especial a minha avó Nair que tanto esperou por este momento. Amo você vó;

Ao meu irmão Lucas pelo companheirismo ao longo dos anos e minha irmã Larissa, que onde estiver, com certeza estará feliz com este momento. Amo vocês;

A todos meus familiares, com carinho especial a minha tia Josineide, que participa de minha vida como uma segunda mãe. Te amo tia;

À minha namorada, Priscila (Xinha), pelo amor, respeito, compreensão, parceria e por ficar ao meu lado nos piores momentos. Amo você;

Aos meus amigos de mais longa data, Anderson R., Joálisson, Samuel, Tássio, Matheus, Walfrido, Gláucio, Thiago Henrique, Bruno, Felipe Bezerra, Everton, Sérgio, Zé Milton, Flávio, Samir, Salomão, Gustavo, Carlos Renato e Jonathan pela parceria de anos.

Aos meus amigos Abelardo, Thiago Sena, Rafaela, Salvana, Luma, Renato, Diego, Luciana, Edilânio, Ronmilson, Flávia, Alan, Evanilson, Márcia, Ingrid, Albert, Anne, que apareceram no percurso da minha vida e também fazem parte desta conquista;

À minha orientadora Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães pela oportunidade de fazer parte do grupo SLC, pela confiança depositada em mim, pela paciência e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado de coração!!

À Profa. Dra. Noemia Pereira da Silva Santos pela oportunidade, paciência, conselhos e por ter sido peça fundamental na conclusão desse trabalho;

A Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva por ter me recebido muito bem em seu laboratório e pela ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigado!

A Dra. Jaciana dos Santos Aguiar pela disponibilidade e grande colaboração na realização dos testes in vitro. Obrigado!

A Doutora Milena Ferraz por ter aceitado meu convite em pleno aniversário. Obrigado pelas broncas e conselhos dados. Não consigo expressar o quanto sou grato por isso. Valeu Mii!!

Ao futuro doutor Fábio Fidélis pela amizade, ajudas, conselhos, brincadeiras, músicas, e principalmente pelas broncas dadas ao longo desse período. Muito obrigado!!

A todos os amigos que fazem parte do grupo de sistema de liberação controlada de fármacos, em especial: Rafaela, Isabella, Catarine, Lais, Cássia, Larissa Morgana, Larissa Chaves, Camilla, Thiers, Sarah, Ana Lígia, Tiago, Rebecca, João Neto, Hanna, Ada, Marília, Katyane, Victor, Bárbara Miguel, camila, pela amizade, alegrias e tristezas durante os momentos que passamos juntos;

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica do LIKA-UFPE pela convivência em laboratório;

A todos os funcionários do LIKA, em especial ao Sr. Otaviano Costa, Rafael Padilha, Moisés Melo, Filipe Maria Helena, Hilma, Conceição, Vera e Edson. Obrigada por todo o suporte;

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

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

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Departamento de Antibióticos (CCB-UFPE) e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE-PE) pela disponibilidade da infraestrutura e suporte dado a este trabalho.

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

## RESUMO

Este estudo descreve como nanocápsulas convencionais e furtivas foram desenvolvidas e caracterizadas, para viabilizar o carreamento da  $\beta$ -lapachona para sua utilização na terapêutica do câncer. Primeiramente, a  $\beta$ -lapachona foi encapsulada em nanocápsulas de Poli-( $\epsilon$ )-caprolactona (PCL) e em nanocápsulas do copolímero Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)- polietileno glicol (PCL-PEG), seguindo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Estas nanocápsulas foram caracterizadas pelo tamanho de partícula, índice de polidispersão, eficiência de encapsulação e cinética de liberação *in vitro*. A avaliação da citotoxicidade foi realizada seguindo o método MTT, através de viabilidade celular de linhagem de células de leucemia promielocítica aguda (HL-60), câncer de mama (MCF-7), carcinoma de laringe humana (HEp-2) e carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292). E por fim, a atividade antitumoral *in vivo* da  $\beta$ -lapachona foi avaliada em camundongos machos Swiss inoculados com células de Sarcoma 180 (S-180), e estes animais receberam doses diárias de 20 mg/kg/dia de  $\beta$ -lapachona encapsulado em nanocápsulas furtivas (NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap) ou  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap) em suspensão por 7 dias. Os resultados demonstraram que o método de preparação foi eficiente na formação de nanocápsulas monodispersas (PDI < 0,3), com tamanhos compreendidos entre 150 e 200 nm e com uma eficiência de encapsulação do fármaco de  $98 \pm 0,91\%$  e  $97 \pm 1,3\%$  para as nanocápsulas convencionais e furtivas, respectivamente. O perfil da cinética de liberação *in vitro* evidenciou uma liberação máxima da  $\beta$ -lapachona, através das nanocápsulas, em torno de  $62,18 \pm 3,93\%$  e  $66,29 \pm 1,74\%$  para PCL/ $\beta$ -lap e PCL-PEG/ $\beta$ -lap, respectivamente. No estudo de citotoxicidade, a  $\beta$ -lapachona apresentou um efeito antiproliferativo relevante apenas na linhagem de MCF-7 ( $IC_{50}$  0,39  $\mu$ g/mL), onde ficou praticamente igual ao padrão DOX ( $IC_{50}$  0,32  $\mu$ g/mL). De maneira geral a  $\beta$ -lapachona, quando encapsulada, apresentou valores de  $IC_{50}$  maiores que a  $\beta$ -lapachona livre, com exceção na linhagem NCI-H292, o que provavelmente, deve-se ao fato de um mecanismo de captura celular diferenciado. Dessa forma o ensaio de MTT se mostrou bastante eficiente na avaliação de citotoxicidade da  $\beta$ -lapachona livre e encapsulada em relação ao padrão de análise (DOX). Nos estudos *in vivo* a atividade antitumoral da  $\beta$ -lapachona nanoencapsulada promoveu uma inibição da massa tumoral acima de 49,29%, quando comparado ao grupo controle, e de aproximadamente 15% quando comparado com o fármaco livre.

**Palavras-chaves:** Nanocápsulas. Farmacocinética. Citotoxicidade. Vetorização de fármacos.

## ABSTRACT

This study describes how conventional and stealth nanocapsules were developed and characterized to facilitate the conduction of  $\beta$ -lapachone for their use in cancer therapy. First, the  $\beta$ -lapachone has been encapsulated in nanocapsules Poly ( $\epsilon$ )-caprolactone (PCL) and nanocapsules in the copolymer poly (caprolactone  $\epsilon$ ) - polyethylene glycol (PCL-PEG) by the method of pre-polymer interfacial deposition formed. These nanocapsules have been featured by the particle size, polydispersity index, encapsulation efficiency and in vitro release profile. The cytotoxicity assayment was performed following the method MTT cell viability through the lineage of acute promyelocytic leukemia cells (HL-60), breast cancer (MCF-7), human laryngeal carcinoma (HEp-2) and human pulmonary mucoepidermoid carcinoma (NCI-H292). Finally, the in vivo antitumor activity of  $\beta$ -lapachone was evaluated in male Swiss mice inoculated with Sarcoma 180 cells (S-180), and these animals received daily doses of 20 mg/kg/day of  $\beta$ -lapachone encapsulated stealth nanocapsules (NC-PEG-PCL/ $\beta$ -lap) or  $\beta$ -lapachone ( $\beta$ -lap) in suspension for 7 days. The results showed that the preparation method was efficient in the formation of nanocapsules monodisperse (PDI <0.3), with sizes ranging between 150 and 200 nm and having a drug encapsulation efficiency of 98% and 97% for conventional and nanocapsules furtive, respectively. The profile of the in vitro release kinetics showed a maximum release of  $\beta$ -lapachone through the nanocapsules, around  $62.18 \pm 3.93\%$  and  $66.29 \pm 1.74\%$  for PCL/ $\beta$ -lap and PCL-PEG/ $\beta$ -lap, respectively. At cytotoxicity assayment  $\beta$ -lapachone presents a relevant antiproliferative effect only on MCF-7 cell line (IC<sub>50</sub> 0,39  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) where the result was barely equal when compared with standard analysis DOX (IC<sub>50</sub> 0,32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Thus, the MTT assay was very efficient in evaluating  $\beta$ -lapachone cytotoxicity of free and encapsulated compared to standard analysis (DOX). In studies in vivo antitumor activity of  $\beta$ -lapachone nanocoated promoted an inhibition of tumor mass up to 49.29% when compared to the control group, and approximately 15% when compared to the free drug.

**Keywords:** Nanocapsules. Pharmacokinetics. Cytotoxicity. Drug delivery systems.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da $\beta$ -lapachona .....	14
Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura da $\beta$ -lapachona .....	15
Figura 3 - Diferentes tipos de nanocarreadores .....	21
Figura 4 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas.....	23
Figura 5 - Estruturas de nanopartículas de PCL-PEG, com diferentes configurações e representação esquemática da inibição do reconhecimento das opsoninas .....	24
Gráfico 1 - Perfil farmacocinético de doses múltiplas ou em sistema de liberação controlada de fármacos.....	20
Quadro 1 - Atividade citotóxica da $\beta$ -lapachona em diferentes linhagens de células tumorais .....	18

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
$\beta$ -lap	$\beta$ -lapachona
CIM	Concentração inibitória mínima
Colab.	Colaboradores
COX-2	Ciclo oxigenase 2
D.P.	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EE	Eficiência de encapsulação
FDA	Food and drug administration
IC <sub>50</sub>	Concentração do fármaco que inibe 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KG-1	Linhagem de leucemina mielóide aguda humana
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NC	Nanocápsulas
NC-PCL/ $\beta$ -lap	Nanocápsulas convencionais com a $\beta$ -lapachona
NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap	Nanocápsulas furtivas com a $\beta$ -lapachona
NQO1 NAD(P)H	Quinona oxidoreductase 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCL	Poli-( $\epsilon$ )-caprolactona
PEG	Polietilenoglicol;
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Polímero de ácido láctico
PLGA	Copolímero de ácido láctico e glicólico
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SFM	sistema fagocitário mononuclear
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
Via i.p.	Via intraperitoneal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1	CÂNCER.....	13
2.2	$\beta$ -LAPACHONA .....	14
<b>2.2.1</b>	<b>Propriedades químicas da <math>\beta</math>-lapachona .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Atividades biológicas da <math>\beta</math>-lapachona.....</b>	<b>15</b>
<i>2.2.2.1</i>	<i>Atividade antimicrobiana .....</i>	<i>15</i>
<i>2.2.2.2</i>	<i>Atividade antiviral .....</i>	<i>16</i>
<i>2.2.2.3</i>	<i>Atividade antiparasitária .....</i>	<i>16</i>
<i>2.2.2.4</i>	<i>Antiinflamatória .....</i>	<i>16</i>
<i>2.2.2.5</i>	<i>Atividade antifúngica .....</i>	<i>17</i>
<i>2.2.2.6</i>	<i>Antitumoral.....</i>	<i>17</i>
<i>2.2.2.7</i>	<i>Atividade antiproliferativa.....</i>	<i>18</i>
<b>2.2.3</b>	<b>Mecanismo de ação e toxicologia da <math>\beta</math>-lapachona .....</b>	<b>18</b>
2.3	NANOTECNOLOGIA.....	19
2.4	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS .....	20
2.5	NANOPARTÍCULAS .....	22
2.6	NANOPARTÍCULAS FURTIVAS .....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>29</b>
	<b>APÊNDICE A - ARTIGO.....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas para o tratamento do câncer, com o objetivo de erradicar as células tumorais sem interferir no funcionamento normal dos organismos vivos. A eficiência da atual terapia do câncer é limitada principalmente pela toxicidade associada com os fármacos antineoplásicos aos tecidos normais (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012).

A  $\beta$ -lapachona é uma substância química do grupo das naftoquinonas, que pode ser obtida facilmente após tratamento do lapachol, substância amarela extraída do cerne do ipê-roxo (*Tabebuia avellanae*). Diversas pesquisas têm demonstrado excelente potencial antineoplásico desta molécula, agindo contra diversos tipos de câncer, por mecanismos particulares de apoptose e necrose. Porém sua baixa solubilidade em água limita sua ação sistêmica e aplicações *in vivo*. Com estas limitações, se faz necessário a criação de novas formas farmacêuticas para melhorar, principalmente, a sua biodisponibilidade (ALMEIDA et al., 2009; LI; AVERBOUK; PARDEE, 1993; NASONGKLA, 2003).

A Nanotecnologia é uma ciência que engloba qualquer tipo de desenvolvimento tecnológico dentro da escala nanométrica, envolve a criação e manipulação de materiais na escala atômica e molecular. Na área de ciências farmacêuticas a nanotecnologia engloba o desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos de liberação controlada de fármacos em escala manométrica (KAWASAKI; PLAYER, 2005).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos, ou “drug delivery systems”, estão sendo usados com diferentes drogas para vários tratamentos tendo como objetivo principal controlar de forma determinada a taxa de liberação/entrega do fármaco, realizando uma administração terapêutica efetiva de uma droga por um período de tempo e em doses contínuas, e permitindo também a condução do fármaco a locais específicos para sua atuação, funcionando como nanocarreadores (PANYAM; LABHASETWAR, 2003).

Dentre estes sistemas se destacam as nanocápsulas, que possuem uma cavidade interna, geralmente preenchida com óleos, estabilizada por um filme interfacial de agentes tensoativos e revestidos superficialmente por uma parede polimérica biodegradável pouco espessa. Estes dispositivos nanoparticulados biodegradáveis, tem apresentado vantagens no aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos, porém, quando aplicados diretamente por via intravenosa, são rapidamente removidos pelo sistema fagocitário mononuclear (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Para evitar o reconhecimento das nanocápsulas pelo SFM, foram desenvolvidas as nanocápsulas furtivas ou

de longa duração. Foi visto que a modificação da superfície das nanocápsulas, pela ligação de cadeias do polímero polietileno glicol (PEG), forma uma espécie de “nuvem” de cadeias hidrofílicas nestas superfícies, o que impede a remoção desses dispositivos, aumentando assim, o tempo de permanência na corrente sanguínea (MOSQUEIRA et al., 2001). Portanto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas modernos capazes de viabilizar a administração da  $\beta$ -lapachona, um potente agente antineoplásico, em uma formulação que melhore sua solubilidade e distribuição. Sendo assim, o objetivo deste trabalho será encapsular a  $\beta$ -lapachona em nanocarreadores poliméricos para avaliar suas características e aplicações.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é uma patologia que ocorre em diversos tipos celulares, invadindo tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para tecidos adjacentes e outras regiões do corpo. É caracterizada pelo crescimento desordenado de células ocasionado por alterações genéticas adquiridas, podendo essas mutações ser causadas tanto por fatores genéticos como por fatores ambientais (SEIR, 1998).

Das patologias que acometem o ser humano, o câncer é uma das principais causas de morte no planeta, tendo sido responsável por cerca de 13% de todos os óbitos registrados em 2008, dos quais 70 % ocorreram em países de baixa e média renda. Estima-se que em 2030 ocorrerão 13.1 milhões de mortes por câncer no mundo inteiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Os planos de tratamento mais comuns para o câncer incluem cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, algumas dessas intervenções comumente destroem indistintamente células tumorais e não tumorais levando a inúmeros efeitos colaterais (RIBEIRO-COSTA et al., 2004). Em alguns casos mais específicos os tratamentos podem envolver hormonoterapia, imunoterapia e até transplante de células tronco, podendo todos esses tratamentos serem utilizados individualmente ou de forma complementar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

O desenvolvimento de novas abordagens para melhorar a triagem, diagnóstico e tratamento do câncer é uma área de intensa investigação e tem gerado inúmeras inovações que ajudam a melhorar as taxas de sobrevivência, em pacientes com câncer (KENNEDY et al., 2010).

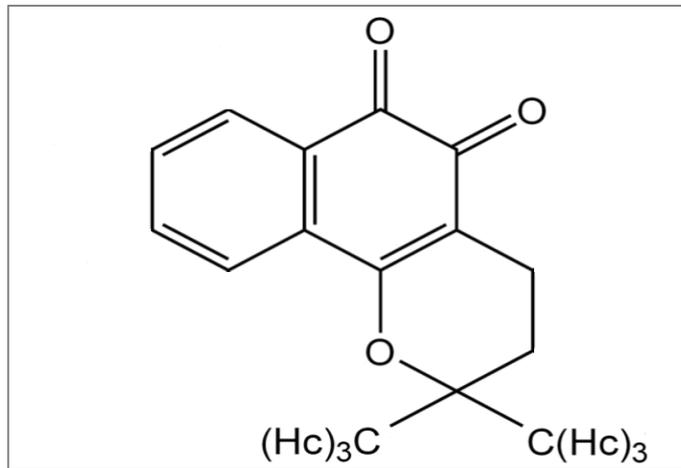
A fim de se obter uma terapia eficaz, é necessário aprimorar o conhecimento sobre a fisiopatologia do câncer, descobrir novos fármacos, e desenvolver novas tecnologias biomédicas. Atualmente, a terapia anticancerígena tornou-se uma abordagem multidisciplinar a qual requer uma estreita colaboração entre os clínicos, os pesquisadores e os engenheiros biomédicos (DANHIER et al., 2012).

## 2.2 $\beta$ -LAPACHONA

### 2.2.1 Propriedades químicas da $\beta$ -lapachona

A (3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol (1,2-b) pirano-5,6-diona), ou simplesmente  $\beta$ -lapachona é uma *orto*-naftoquinona (Figura 1) que vem sendo muito estudada tanto no campo da química quanto na área da farmacologia. Esta substância pode ser extraída de várias espécies de plantas da família *Bignoniaceae* como, por exemplo, o “ipê roxo” (*Tabebuia sp.*) (JÁCOME et al., 1999).

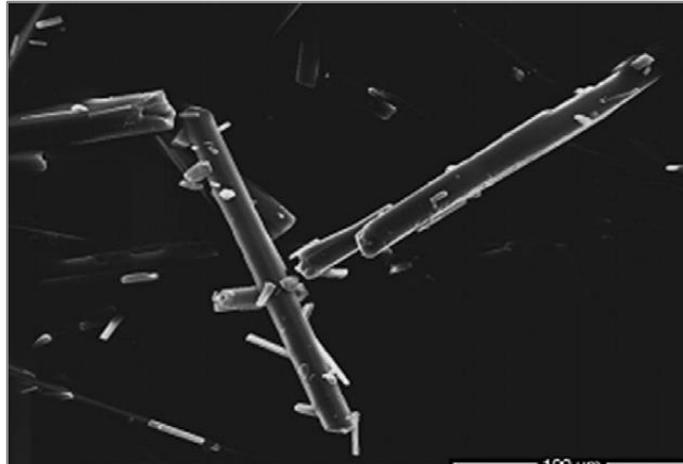
Figura 1 - Estrutura química da  $\beta$ -lapachona



Fonte: Lisieux et al., 1999.

Isolada pela primeira vez por Paternò em 1882 através de um tratamento com ácido, a  $\beta$ -lapachona se apresenta em forma de pó laranja avermelhado, com cristais cilíndricos (Figura 2), ponto de fusão entre 151-156 °C, peso molecular 242,27 Da, sua forma ácida possui um pKa de -3,45 (BARBOSA; DINIZ NETO, 2013) e sua degradação, em solução aquosa, aumenta drasticamente em presença de luz (CUNHA-FILHO; MARTÍNEZ-PACHECO; LANDÍN, 2008). Devido a uma baixa solubilidade em água, algo em torno de 0,038 mg/mL ou 0,16 mM, sua aplicação clínica é bem limitada (NASONGKLA et al., 2003).

Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura da  $\beta$ -lapachona



Fonte: Cavalcanti et al., 2011 (magnificência de 1000 $\times$ ).

## 2.2.2 Atividades biológicas da $\beta$ -lapachona

A  $\beta$ -lapachona apresenta inúmeras ações farmacológicas, tais como antibacteriana (OLIVEIRA et al., 2001; PEREIRA et al., 2006), antifúngica (GUIRAUD et al., 1994; MEDEIROS et al., 2010), tripanossomicida (GOULART et al., 1997; LOPES et al., 1978; MOURA et al., 2001; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003), antiviral (LI et al., 1993; SCAFFBER-SABBA et al., 1984; SCHUERCH; WEHRLI, 1978), antiinflamatória (MOON et al., 2007) e antineoplásica (WOO; CHOI, 2005).

### 2.2.2.1 Atividade antimicrobiana

Pereira et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana da  $\beta$ -lapachona frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) e cepas de *Staphylococcus coagulase-negativo*. Concentrações da  $\beta$ -lapachona, e outros derivados do lapachol, variaram de 2 a 512  $\mu\text{g/mL}$ , para os testes de concentração mínima inibitória (CIM). Todas as naftoquinonas apresentaram atividade considerável contra esses microorganismos (MICs entre 4 e 128  $\mu\text{g/mL}$ ), com destaque para a  $\beta$ -lapachona com uma concentração mínima inibitória de 8  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando assim sua potencial atividade como agente antimicrobiano em substituição a vancomicina, última terapia usada.

### **2.2.2.2 Atividade antiviral**

A transcrição do vírus de tipo 1 da imunodeficiência humana (HIV-1) é governada pela repetição terminal longa viral (RTL). Alguns fármacos conseguem bloquear a replicação do HIV-1, por inibição do RTL. Estudos *in vitro* de Li e colab. (1993), demonstraram que a  $\beta$ -lapachona, em concentrações de 2,5  $\mu$ M, inibiu fortemente a replicação do DNA viral através de uma ação direta no RTL, e com uma viabilidade celular de mais de 90%.

### **2.2.2.3 Atividade antiparasitária**

Salas et al. (2008) avaliaram a atividade tripanossomicida, da  $\beta$ -lapachona, em diferentes concentrações, em formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados evidenciaram uma inibição do crescimento dos parasitas com atividade mais elevada que os fármacos utilizados nos tratamentos atuais, o nifurtimox e o benzonidazol.

Por sua vez, Ferreira e colab. (2011) avaliaram a eficácia de 16 análogos da  $\beta$ -lapachona com o objetivo de achar novos protótipos para o tratamento da doença de chagas. Estes novos protótipos apresentaram um amplo espectro de ação frente a formas tripomastigotas do parasita e 5 desses protótipos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> / 24h entre 22 e 63  $\mu$ M, quando o valor da  $\beta$ -lapachona, frente a estas mesma formas, foi de 391,5  $\mu$ M.

### **2.2.2.4 Antiinflamatória**

As micróglias possuem papel fundamental tanto na defesa como na reparação tecidual no sistema nervoso central. Entretanto sua ativação desordenada pode ocorrer rapidamente após uma lesão cerebral ou por patologias isquêmicas e neurodegenerativas do sistema nervoso central (SNC). Óxido nítrico (NO), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e citocinas pró-inflamatórias tais como as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6, têm sido implicados como mediadores importantes nos processos de inflamação do SNC e reduções dos níveis destes mediadores podem atenuar a severidade dessas desordens (GAO; LIU, 2003).

Moon et al. (2007) avaliaram a atividade da  $\beta$ -lapachona em linhagens de micróglias (BV2) estimuladas por lipopolissacarídeos e descobriram que em doses, que variaram de 0,5 a 2  $\mu$ M, a  $\beta$ -lapachona inibiu a produção de NO, PGE<sub>2</sub> e citocinas pró-inflamatórias em níveis transcricionais por inativação das enzimas ciclooxigenase 2 (COX-2), NO sintase induzível

(iNOs) e pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Essas inativações foram evidenciadas pela redução da expressão do mRNA e consequente expressão de proteínas destas substâncias. Estes resultados colocam a  $\beta$ -lapachona como um potencial agente anti-inflamatório.

#### **2.2.2.5 Atividade antifúngica**

A atividade antifúngica *in vivo* da  $\beta$ -lapachona contra *Cryptococcus neoformans* foi avaliada por Medeiros e colab. (2011). Camundongos Swiss foram imunossuprimidos diariamente por via intraperitoneal com dexametasona (0,5 mg por rato) durante 3 dias, o procedimento foi repetido 4 dias mais tarde, e, em seguida, os animais foram infectados por via intravenosa com *Cryptococcus neoformans* ( $10^6$  CFU / mL). Posteriormente esses camundongos foram divididos em grupos (7 e 14 dias de tratamento) e tratados com  $\beta$ -lapachona (10 mg/kg, iv), Anfotericina B (0,5mg/kg, iv) e PBS. Os grupos tratados com a  $\beta$ -lapachona obtiveram uma diminuição da carga fúngica na ordem de  $10^4$  vezes, nos pulmões e fígado, quando comparados com os grupos controle (PBS). Estes resultados colocam a  $\beta$ -lapachona como potencial agente contra infecções de *Cryptococcus*.

#### **2.2.2.6 Antitumoral**

Li e colab. (1999) avaliaram a atividade antitumoral *in vivo* da  $\beta$ -lapachona isolada e em combinação com o taxol®. Camundongos nus fêmeas foram inoculados com células de câncer de ovário humana (36M2), por via intraperitoneal, as aplicações dos fármacos iniciaram após 10 dias e os animais foram sacrificados 2 semanas depois da descontinuação do tratamento. As dosagens da  $\beta$ -lapachona e do Taxol foram de 50 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente, e estas mesmas dosagens foram utilizadas para avaliar o efeito sinérgico destes fármacos na redução de nódulos tumorais. A  $\beta$ -lapachona livre diminuiu a quantidade de nódulos tumorais em 75%, contra 60% de redução do tratamento com o Taxol livre e não foram evidenciados nódulos no tratamento conjunto da  $\beta$ -lapachona com o Taxol. Análises dos órgãos dos animais tratados com a combinação de fármacos não mostraram nenhum dano evidente.

### 2.2.2.7 Atividade antiproliferativa

Linhagens de células de câncer de próstata (SUZUKI et al., 2006), câncer de mama (PINK et al., 2000), câncer de bexiga (LEE et al., 2006), câncer do pâncreas (LI; BEY, 2011), carcinoma hepático (KIM et al., 2007), mieloma múltiplo (GUPTA et al., 2002), câncer de pulmão (LI et al., 1999) foram submetidas a tratamentos com a  $\beta$ -lapachona e os resultados evidenciaram a forte ação antiproliferativa deste fármaco. Outros estudos focaram seus resultados na obtenção da concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). O quadro 1 apresenta a ação citotóxica da  $\beta$ -lapachona, em diferentes linhagens de células cancerígenas.

Quadro 1 - Atividade citotóxica da  $\beta$ -lapachona em diferentes linhagens de células tumorais

LINHAGEM CELULAR	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	REFERÊNCIAS
MCF-7 (câncer de mama)	1,7 3	Nasongkla et al., 2003 Bentle et al., 2007
WHCO1 (câncer de faringe)	1,6	Sunasse et al., 2013
MDAMB-231 (câncer de mama)	6,6	Reinicke et al., 2005
21MT (células de câncer de mama humana)	~ 4	Li et al., 1999
HBL-100 (câncer de mama)	0,69	Bonifazi et al., 2010
PC-3 (câncer de próstata)	3,5	Reinicke et al., 2005
DU-145 (câncer de próstata)	4,0	Li et al., 1999
HL-60 (leucemia promielocítica)	1,65	Moon et al., 2010
KB (tumor nasofaríngeo)	6,6	Krishnan; Kenneth et al., 2001
HCT-8 (câncer de colo-retal)	0,83	Silva-júnior et al., 2007
Skmel-28 (Melanoma)	~ 4	Li et al., 1999
A2780DDP (Câncer de ovário)	1,1	Bonifazi et al., 2010

Fonte: O autor, 2013.

### 2.2.3 Mecanismo de ação e toxicologia da $\beta$ -lapachona

Alguns estudos demonstraram que a  $\beta$ -lapachona induz a apoptose através da ativação de marcos nas fases G1 e S do ciclo celular, inibindo, deste modo, a sua progressão, causando

a apoptose em células transformadas, preferencialmente, sobre as células normais (PLANCHON et al., 2001; LI et al., 1993).

Outro mecanismo de ação de morte celular atribuído a  $\beta$ -lapachona se dá através da enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1). Estudos de Pink et al. (2000) demonstraram que esta enzima desencadeia um ciclo de oxirredução, onde a  $\beta$ -lapachona é reduzida a um intermediário instável e posteriormente tem sua estrutura reestabelecida utilizando-se de 2 moléculas de  $O_2$ . Como resultado disto, são geradas espécies reativas de oxigênio (ROS), que em contato com as células favorecem a formação de danos nas cadeias do DNA e uma hiperativação de poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), o que acaba gerando uma depleção dos níveis de ATP/NAD<sup>+</sup>, impedindo assim a recuperação do DNA.

Estudos tem revelado que a  $\beta$ -lapachona provoca morte celular por apoptose ou necrose dependendo do tipo celular, do tempo e da dose do fármaco (LI et al., 1993; WELLER et al., 1997). Além disso, a grande quantidade de alvos enzimáticos dificulta a elucidação dos mecanismos de ação nas mais diversas células tumorais (O'BRIEN et al., 1991).

No estudo de Almeida et al. (2009), a toxicidade da  $\beta$ -lapachona foi avaliada em ratos wistar, de ambos os sexos, divididos em grupos de 10 animais, submetidos a doses de 40, 80 e 160 mg/kg (i.p.) durante 21 dias. Como resultados da avaliação bioquímica, houve um aumento significativo nos níveis de gama glutamil transferase, fosfatase alcalina e glutamato piruvato transaminase, indicando assim, um dano hepático principalmente no ducto biliar. Entretanto, fígado e rim, não apresentaram quaisquer alterações, ao contrário do baço, onde ficou houve crescimento de folículos na poupa branca.

### 2.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a capacidade de trabalhar em níveis atômicos, moleculares e supramoleculares (em uma escala de 1 ~ 100 nm), a fim de compreender, criar e usar material de estruturas, dispositivos e sistemas com fundamentalmente novas propriedades e funções resultantes da sua estrutura reduzida (ROCO, 2000).

Esta ciência tem sido amplamente difundida nas mais diversas áreas, com destaque para indústria têxtil (PERELSHTEIN et al., 2008), agricultura (LAI et al., 2006) e na terapia médica (RIEUX et al., 2006). Desde os lipossomas que foram descritos pela primeira vez na década de 1960 e proposto como portadores de proteínas e medicamentos para o tratamento da doença, a nanotecnologia tem um impacto significativo no desenvolvimento de sistemas de

entrega de droga. Uma variedade de dispositivos de nanomateriais e orgânicos / inorgânicos têm sido utilizados como veículos de entrega para desenvolver modalidades terapêuticas eficazes (SHI et al., 2010).

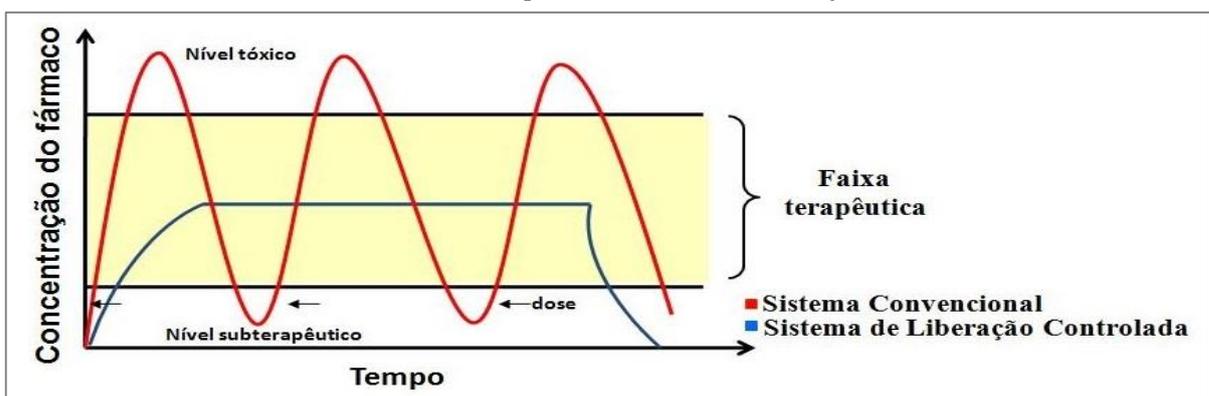
Investimentos na descoberta de novos materiais, processos e fenômenos em escala nanométrica, assim como o desenvolvimento de novas técnicas experimentais e teóricas para pesquisa, fornecem novas oportunidades para o desenvolvimento de nanossistemas e materiais nanoestruturados inovadores (TAMBE; BHUSHAN, 2004).

#### 2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

A terapia contemporânea do câncer, especialmente no que diz respeito à entrega de drogas, iniciou uma evolução na metodologia tradicional contra esta patologia. Parte desta mudança está ancorada na necessidade de aumentar o índice terapêutico de drogas quimioterápicas. Embora as células cancerosas sejam mais vulneráveis do que as células normais para o efeito de agentes quimioterápicos, os medicamentos não são seletivos e podem causar danos aos tecidos normais (HALEY; FRENKEL, 2008).

Por definição, os sistemas de liberação controlada, ou “drug delivery systems” são aqueles nos quais o agente ativo é liberado sob uma cinética bem estabelecida (PANYAN; LABHASETWAR, 2003). O principal objetivo de administrar uma forma farmacêutica de liberação controlada é manter o fármaco em concentrações plasmáticas constantes, em função do tempo após a administração de dose única (figura 3). O que faz com o fármaco se mantenha na faixa terapêutica, sem oscilações entre os níveis tóxicos e sub-terapêuticos, diferentemente das formas farmacêuticas convencionais, como comprimidos e cápsulas (BARRATT et al., 2000).

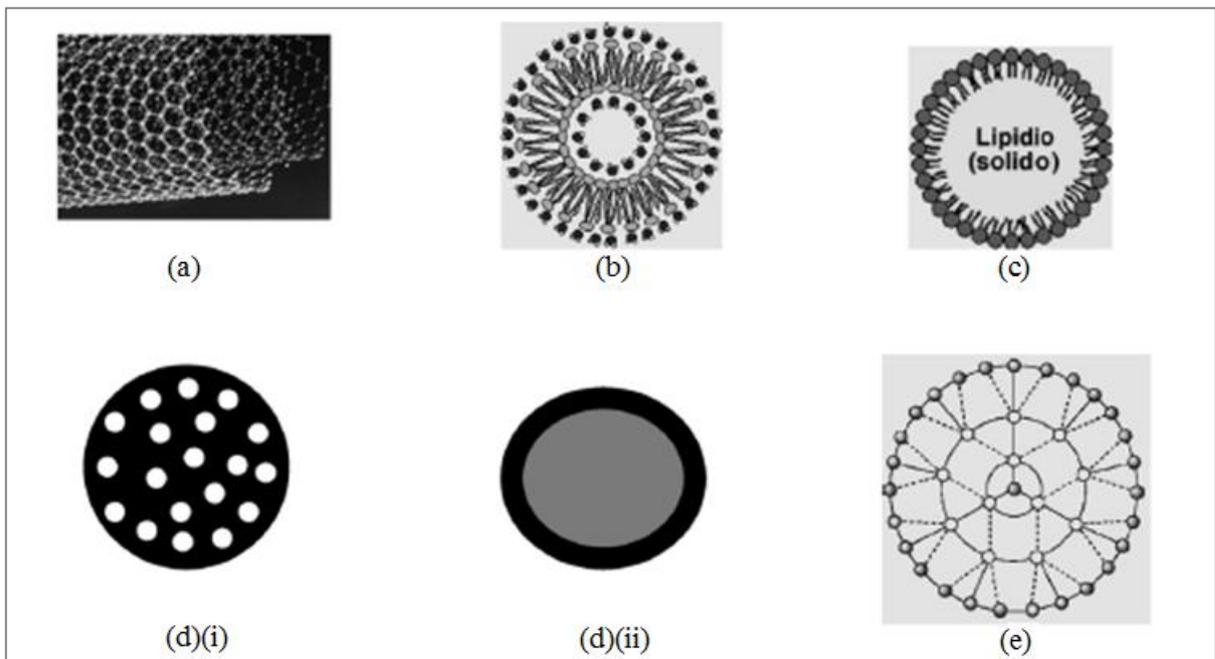
Gráfico 1 - Perfil farmacocinético de doses múltiplas ou em sistema de liberação controlada de fármacos



Fonte: Lira, 2009.

O controle da liberação de fármacos ocorre através da utilização de carreadores, capazes de permitir a otimização da velocidade de degradação e do regime de dosagem das substâncias. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (SCHAFFAZICK et al., 2003). Outros sistemas de liberação controlada de fármacos, tais como, dendrímeros, nanotubos de carbono, micropartículas, nanopartículas e lipossomas (Figura 3) oferecem diversas vantagens em relação às formas de dosagens convencionais, seja porque protegem os princípios ativos lábeis da degradação e/ou inativação pelo suco gástrico e melhoram sua biodisponibilidade, ou determinam o aumento da penetração celular de substâncias hidrofílicas (WANDERLEY, 2007).

Figura 3 - Diferentes tipos de nanocarreadores



**Nota:** (a) Nanotubos. (b) Lipossomas: bicamadas concentricas de vesículas nas quais um volume aquoso é totalmente recoberto por uma bicamada lipídica membranosa. (c) Nanopartículas lipídicas sólidas: carreadores coloidais submicrônicos feitos de lipídios sólidos (d) Nanopartículas Poliméricas. (i) Nanoesferas: nanopartículas nas quais a droga está dispersa pela matriz polimérica. (ii) Nanocápsulas: nanopartículas nas quais a droga está encapsulada entre a membrana polimérica. (e) Dendrímeros: compostos formados por uma série de ramos ao redor de um núcleo central.

Fonte: Figura adaptada de Rawat et al., 2006.

A utilização de sistemas coloidais nanoestruturados, tais como as nanopartículas poliméricas, constitui uma estratégia para alterar a biodistribuição de fármacos após administração (TORCHILIN, 2011). A tecnologia de liberação controlada de fármacos pode ser considerada uma das promessas para modificação do cenário mundial presente nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. O desenvolvimento desses produtos

nanotecnológicos traz um novo tipo de armamento terapêutico para o combate a doenças de uma forma mais eficiente e específica (FAROKHZAD; LANGER, 2009).

## 2.5 NANOPARTÍCULAS

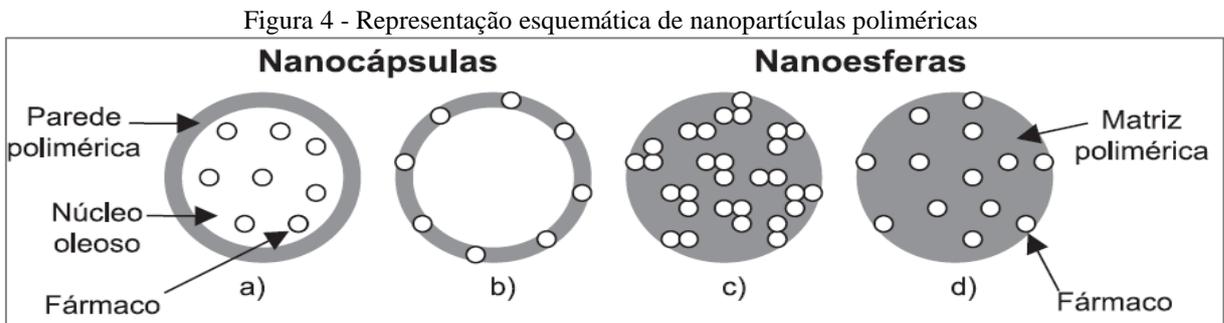
A melhor maneira de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade de um fármaco anticêntrico, é dirigir a droga para o seu alvo e manter a sua concentração no local durante um tempo suficiente para que a ação terapêutica deste fármaco produza efeitos. Neste contexto surgem as nanopartículas poliméricas (OCHEKPE; OLORUNFEMI, 2009).

Nanopartículas são dispositivos coloidais estáveis, sólidos e constituídos por polímeros biodegradáveis ou por materiais lipídicos e que podem variar de 10 a 1000 nm. Estes dispositivos são classificados em nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 4). Nanocápsulas possuem uma cavidade central ou núcleo para o qual um fármaco é limitado. Este núcleo é rodeado por um invólucro de membrana polimérica exterior, ligada à superfície à qual alguns materiais podem ser ligados. O núcleo geralmente possui material oleoso. Por outro lado, as nanoesferas são estruturas esféricas compostas por um sistema de matriz no qual o fármaco pode ficar retido ou adsorvido nessa matriz. Não possui óleo em sua composição (BRIGGER, DUBERNET; COUVREUR, 2002; VAUTHIER, 2003; SOPHIMATH et al., 2001).

Nanocápsulas, de maneira geral, possuem uma alta capacidade de carreamento de fármacos. A sua vantagem sobre outros sistemas está baseado no confinamento do fármaco no interior de sua cavidade central, que confere uma adequada proteção do princípio ativo frente à degradação no meio biológico, além de permitir que moléculas hidrofóbicas melhorem sua eficácia terapêutica, através de melhorias em sua biodistribuição (TORCHILIN, 2011). Mesmo assim, a liberação do fármaco depende da desorção do fármaco da superfície da partícula, da difusão através da parede polimérica das nanocápsulas, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

O polímero poli ( $\epsilon$ -caprolactona) ou PCL é um poliéster alifático hidrofóbico, bastante utilizado na preparação de sistemas de liberação controlada, devido sua capacidade de revestir ou dissolver fármacos com baixa solubilidade em água (WANG et al., 2013). Entretanto, esta característica hidrofóbica, aliada a sua estrutura semi-cristalina fornece uma baixa biocompatibilidade com componentes orgânicos (SINHA et al., 2004). PCL pode ser misturado com outros polímeros como propionato de celulose, polímero de ácido lático (PLA)

e copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) para manipular a velocidade de liberação da droga a partir de nanocápsulas, ou formar copolímeros anfífilicos com PEG para auxiliar nas potenciais aplicações, deste polímero, como veículos de fármacos (Figura 4) (HUA; DONG, 2007; WEI et al., 2009)



Nota: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.

Fonte: Schaffazick et al., 2003.

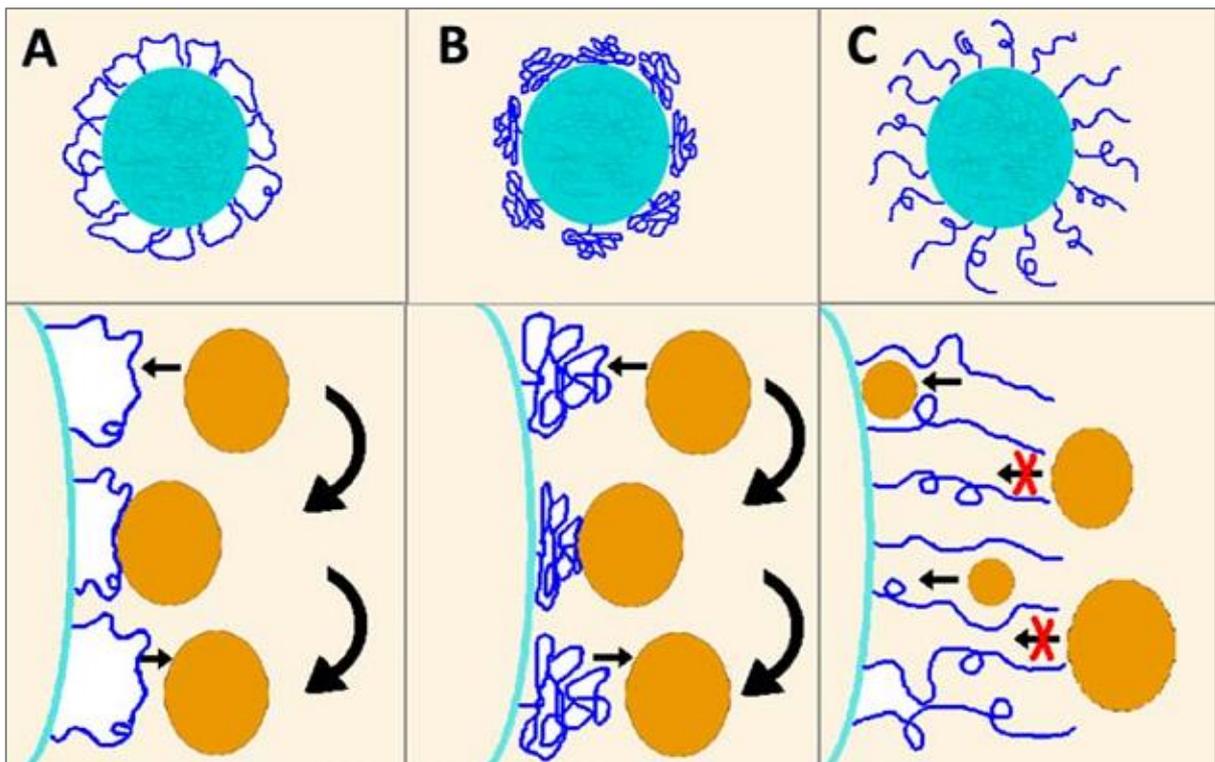
## 2.6 NANOPARTÍCULAS FURTIVAS

O tempo de meia vida de sistemas convencionais introduzidos intravenosamente é sempre tão curto, que não há tempo suficiente para alcançar os efeitos terapêuticos antes que estes sistemas sejam reconhecidos e eliminados por endocitose (WANG et al., 2012). Esse papel de remoção de corpos estranhos é desempenhado pelo Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). Os macrófagos do SFM são capazes de reconhecer e remover esses sistemas segundos após a sua administração (WANG et al., 2012). O mecanismo de reconhecimento do SFM se dá através da opsonização, que é o processo pelo qual um organismo estranho é recoberto por proteínas específicas denominadas opsoninas. Essas proteínas uma vez aderidas na superfície dessas moléculas acabam tornando-as mais visíveis para células fagocíticas, facilitando assim, o processo de depuração de componentes indesejáveis (OWENS et al., 2006).

Uma alternativa eficaz para prevenir este processo de opsonização se dá através da adição de cadeias de polietilenglicol (PEG) na superfície de partículas convencionais. Dá-se o nome de PEGuilação a decoração de uma superfície de uma partícula comum seja por ligações covalentes, aprisionamento ou adsorção das cadeias de PEG. Além disso, no caso das nanopartículas biodegradáveis, cadeias de PEG podem ser incorporadas como copolímeros em toda a partícula de modo que algumas cadeias de PEG de superfície estão sempre disponíveis, mesmo após a degradação das camadas superficiais. O objetivo destas cadeias de

PEG é a de criar uma camada de barreira para impedir a adesão das opsoninas presentes no soro do sangue, de modo que essas partículas, ditas furtivas ou de longa duração, possam permanecer camufladas ou invisíveis para células fagocíticas, o que propicia um longo tempo de permanência no plasma (BERGSTRON et al., 1994; JOKERST et al., 2011; WANG et al., 2012).

Figura 5 - Estruturas de nanopartículas de PCL-PEG, com diferentes configurações e representação esquemática da inibição do reconhecimento das opsoninas



Fonte: Adaptado de Wang et al., 2012.

Outra característica interessante apresentada por nanopartículas de longa duração é o maior direcionamento destes para áreas tumorais, visto que devido a sua maior permanência no corpo eles podem promover a entrega do fármaco em áreas tumorais com maior permeabilidade vascular ocasionada pelos processos de angiogênese na área do tumoral. Esta forma de direcionamento do fármaco chama-se “Direcionamento Passivo”, ou seja, ocorre extravasamento nos sítios da doença onde a microvasculatura encontra-se enfraquecida, por exemplo, a angiogênese presente na vasculatura tumoral e a presença de fatores vasoativos que aumentem a permeabilidade, num processo mais conhecido por aumento da permeabilidade e retenção (KOO et al., 2005).

Em particular, na nanotecnologia farmacêutica, os nanocarreadores furtivos ou de longa duração têm sido empregados, com sucesso, como sistemas de entrega e liberação

controlada de fármacos, com grandes vantagens sobre os sistemas conhecidos como convencionais, pois permitem maior especificidade, seletividade e eficácia, ao mesmo tempo em que geram menos efeitos adversos. Dentro desse contexto, o desenvolvimento destes dispositivos, surge como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar as atividades antit proliferativa e antitumoral de nanocápsulas convencionais e furtivas contendo a  $\beta$ -lapachona, visando uma futura aplicação terapêutica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanocápsulas convencionais e furtivas contendo  $\beta$ -lapachona;
- 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* da  $\beta$ -lapachona, a partir das nanocápsulas;
- Avaliar a atividade antit proliferativa *in vitro* da  $\beta$ -lapachona livre e encapsulada em nanocápsulas convencionais (NC-PCL /  $\beta$ -lap) e furtivas (NC-PCL-PEG/  $\beta$ -lap);
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da  $\beta$ -lapachona livre e encapsulada em nanocápsulas furtivas (NC-PCL-PEG/  $\beta$ -lap).

## 4 CONCLUSÕES

- Nanocápsulas convencionais e furtivas, contendo a  $\beta$ -lapachona, apresentaram-se monodispersas ( $PDI < 0,3$ ), com tamanhos de partículas em escala manométrica;
- Em relação à caracterização, foram obtidas elevadas eficiências de encapsulação, próximas a 100%, sendo isso possível devido às nanocápsulas apresentarem um núcleo oleoso o qual favorece a encapsulação da  $\beta$ -lapachona por ser uma molécula lipofílica;
- As nanocápsulas de PCL e PCL-PEG apresentaram uma liberação rápida inicial nas primeiras 2h da cinética, atingindo um máximo de fármaco liberado em torno de 60 % do seu conteúdo inicial em 12h, confirmando assim que as nanocápsulas apresentaram características de sistemas de liberação controlada;
- No estudo de citotoxicidade, a  $\beta$ -lapachona livre obteve um melhor potencial de inibição in vitro em linhagem de células de câncer de mama (MCF-7), quando comparada com o padrão positivo Doxirrubicina (DOX), isto pode ser explicado pela presença de um mecanismo de ação intrínseco desta linhagem para com a  $\beta$ -lapachona. Já com a  $\beta$ -lapachona encapsulada, apenas nas nanocápsulas furtivas, e especificamente linhagem de carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292) demonstrou um maior efeito citotóxico quando comparado ao fármaco livre, evidenciando que a liberação controlada, nesta linhagem, favoreceu o efeito citotóxico;
- Na avaliação antitumoral, confirmou-se a atividade anticancerígena da  $\beta$ -lapachona livre, onde foi observada uma redução de aproximadamente 34,04% da massa tumoral, a qual foi potencializada após a encapsulação do princípio ativo nas nanocápsulas convencionais e furtivas, elevando essa inibição para em torno de 49,09%;
- Não foram observadas alterações significantes nos índices hematimétricos dos animais tratados e não tratados, quando comparados com o controle negativo, exceto nos níveis de WBC onde um aumento foi observado. Contudo, os animais tratados com a  $\beta$ -lapachona nanoencapsulada, obtiveram um aumento menor quando comparado ao grupo tratado com a  $\beta$ -lapachona livre, sugerindo que houve

uma maior eficácia na ação do fármaco e, conseqüentemente, uma diminuição do processo inflamatório;

- A incorporação de  $\beta$ -lapachona, um potente agente antineoplásico, em nanocápsulas de PCL-PEG pode ser uma alternativa viável para melhorar sua solubilidade, bem como, otimizar a dose terapêutica, permitir uma melhor biodisponibilidade do fármaco e melhorar atividade antitumoral.

## REFERENCIAS

ALMEIDA, E. R. Toxicological Assessment of Beta-lapachone on Organs from Pregnant and Non-pregnant Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 9, set. 2009.

ALVES, G. M. C. et al. Purificação e caracterização da  $\beta$ -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, p. 413-416, 2008.

BARBOSA, T. P.; DINIZ NETO, H.. Preparation of lapachol derivatives in acid and base media: proposed experiments for Organic Chemistry laboratory classes. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 331-334, 2013.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.

BENTLE, M. S. et al. Nonhomologous end joining is essential for cellular resistance to the novel antitumor agent,  $\beta$ -lapachone. **Cancer Research**, v. 67, p. 6936-6945, 2007.

BONIFAZI, E. L. et al. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 2621-2630, 2010.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

CAVALCANTI, I. M. et al. The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 332-340, 2011.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral  $\beta$ -lapachone by solvent change precipitation of microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 871-877, 2008.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal Controlled Release**. v. 161, p. 505-522, 2012.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FERREIRA, Sabrina Baptista et al. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of  $\beta$ -lapachone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 3071-3077, 2011.

GOULART, M. O. F. et al. Electrochemical Properties of Biologically Active Heterocyclic Naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 2043, 1997.

GUIRAUD, P. et al. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. **Planta Medica**, v. 60, n. 373, 1994.

GUPTA, D. et al.  $\beta$ -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Experimental Hematology**, v.30, p. 711-720, 2002.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and original investigations**, v. 26, n. 1, 2008.

HUA C.; DONG, C. M. Synthesis, characterization, effect of architecture on crystallization of biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) copolymers with different arms and nanoparticles thereof. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 82A, p.689-700, 2007.

JÁCOME, R. L. et al. Analysis of naphthoquinones in Zeyheria montana crude extracts (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 175-177, 1999.

JOKERST, J. V. et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, v. 6, p. 715-728, 2011.

KAWASAKI, E. S.; PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine**, v. 1, p. 101-109, 2005.

KENNEDY, L. C. et al. A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. **Small**, v. 7, n. 2, p. 169-183, 2011.

KRISHNAN, Preethi; KENNETH, F. B. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives  $\alpha$ -lapachone and  $\beta$ -lapachone. **Cancer chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 187-198, 2001.

LAI, F. et al. Artemisia arborescens L essential oil loaded, solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 1, 2006.

LI, C. J. et al. Potent induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, v. 6, p. 1008-1015, 2000.

LI, C. J. et al. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by  $\beta$ -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13369-13374, 1999.

LI, C. J.; AVERBOUK, L.; PARDEE, A. B.  $\beta$ -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463-22468, 1993.

LOPES, J. N. et al. In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, 523. 1978.

MEDEIROS, C. S. et al. Antifungal activity of the naphthoquinone beta- lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, p. 345, 2010.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, p. 561-573, 2006.

MOON, D. O. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced activation in BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 506, 2007.

MOON, D. et al. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 506-514, 2007.

\_\_\_\_\_. Beta-lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, p. 481-488, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of medical and pharmaceutical case reports**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. **Pharmacological Research**, v. 18, p. 1411-1419, 2001.

MOURA, K. C. G. et al. A importância das revistas Química Nova e Journal of the Brazilian Chemical Society no crescimento da área de química no Brasil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 325, 2001.

NASONGKLA, N. et al. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1626-1633, 2003.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, p. 1-41, 1991.

OCHEKPE, N. A; OLORUNFEMI, P. O. Nanotechnology and drug delivery part 2: nanostructures for drug delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 275-287, 2009.

OLIVEIRA, C. G. T. et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-hydrazino-naphthoquinones as analogs of lapachol. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 12, p. 339-345, 2001.

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

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, 2003.

PARHI, P.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**. v. 17, p. 1044-1042, 2012.

PEREIRA, E. M. et al. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v, 5, p. 1-7, 2006.

PERELSHTEIN, I. et al. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity, **Nanotechnology** **19**, v. 18-19, n. 24, p. 18, 2008.

PINK, J. J. et al. NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) activity is the principal determinant of  $\beta$ -lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5416-5424, 2000.

PLANCHON, S. M. et al.  $\beta$ -Lapachone-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, v. 267, p. 95-106, 2001.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

REINICKE, K. E. et al. Development of  $\beta$ -Lapachone Prodrugs for Therapy Against Human Cancer Cells with Elevated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Levels. **Cancer Therapy: Preclinical**, v. 11, p. 3055-3064, 2005.

RIBEIRO-COSTA, R. M. et al. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 21, p. 371-384, 2004.

RIEUX, A. D. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **J. Control. Release**, v. 116, p. 1-24, 2006.

ROCO, M. C.; WILLIAMS, R. S.; ALIVISATOS, P. Nanotechnology Research Directions. **Kluwer Academic Publications**, Boston, 2000.

SALAS, C. et al. Trypanosoma Cruzi: Activities of lapachol and  $\alpha$ - and  $\beta$ -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 668-674, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFNER-SABBA, K. et al. Beta-Lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 990, 1984.

SCHUERCH, A. R.; WEHRLI, W.  $\beta$ -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase- $\alpha$ . Inhibitory effect, thiol dependence and specificity. **European Journal of Biochemistry**, v. 84, p. 197, 1978.

SEIR C. F. et al. The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. **Cancer Research**, v. 58, p. 18430-1849, 1998.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26 p. 407, 2003.

SILVA-JÚNIOR, E. N. et al. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- $\beta$ -lapachone and nor- $\alpha$ -lapachone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7035-7041, 2007.

SINHA, V. R. et al. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. **Int. J. Pharmaceut.**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

SOPPIMATH, K. S., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p. 1-20, 2001.

SUNASSE, S. N. et al. Cytotoxicity of lapachol,  $\beta$ -lapachone and related synthetic 1, 4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 98-110, 2013.

SUZUKI, M. et al. Synergistic effects of radiation and b-lapachone in du-145 human prostate cancer cells in vitro. **Radiation Research**, v. 165, p. 525-531, 2006.

TAMBE, N. S.; BHUSHAN, B. Scale dependence of micro/nano-friction and adhesion of MEMS/NEMS materials, coatings and lubricants. **Nanotechnology**, v. 15, n. 11, p. 1561, 2004.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 131-135, 2011.

VAUTHIER, C. et al. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 93, n. 2, p. 151-160, 2003.

WANDERLEY, M. S.O. **Avaliação da atividade antimicrobiana de sistema nanoparticulado contendo ácido úsnico**. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

WANG, Y. C. et al. Functionalized micelles from block copolymer of polyphosphoester and poly(epsilon-caprolactone) for receptor-mediated drug delivery. **Journal Controlled Release**, v. 128, p. 32-40, 2008.

WANG, Y. J. et al. Pharmacokinetics and Disposition of Nanomedicine Using Biodegradable PEG/PCL Polymers as Drug Carriers. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 338-353, 2012.

WOO, H. J.; CHOI, Y. H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activit. **International Journal of Oncology**, v. 26, p. 1017, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health statistics and information systems: WHO Mortality Database**. 2012. Disponível em: <[who.int/healthinfo/mortality\\_data/en/](http://who.int/healthinfo/mortality_data/en/)>. Acesso em: 06 nov. 2013.

ZHAO, P. et al. Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: In vitro and in vivo evaluation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics** : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V., v. 81, p. 248-56, 2012.

## APÊNDICE A - ARTIGO

### DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E FURTIVAS CONTENDO $\beta$ -LAPACHONA

<sup>1</sup>Laércio B. Arruda, <sup>1</sup>Islene A. Barbosa, <sup>1</sup>Milena S. Ferraz, <sup>1</sup>Fábio J. F. Almeida, <sup>2</sup>Jaciana S. Aguiar, <sup>3</sup>Noêmia P. da S. Santos, <sup>1</sup>Nereide S. Santos-Magalhães

<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco,  
Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultivo de células - Centro Acadêmico de  
Vitória/UFPE, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

**\* Autor para correspondência:**

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

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

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

E-mail: nssm@ufpe.br

## RESUMO

Este estudo descreve como nanocápsulas convencionais e furtivas foram desenvolvidas e caracterizadas, para viabilizar o carreamento da  $\beta$ -lapachona para sua utilização na terapêutica do câncer. Primeiramente, a  $\beta$ -lapachona foi encapsulada em nanocápsulas de Poli-( $\epsilon$ )-caprolactona (PCL) e em nanocápsulas do copolímero Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)- polietileno glicol (PCL-PEG), seguindo o método de deposição interfacial do polímero pré-formado. Estas nanocápsulas foram caracterizadas pelo tamanho de partícula, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação. O estudo do perfil de liberação *in vitro* da  $\beta$ -lapachona, a partir das nanocápsulas, foi realizado em tampão PBS (pH 7,4) a 37°C em condições *sink*. Por fim, a avaliação da citotoxicidade foi realizada seguindo o método MTT, através de viabilidade celular de linhagem de células de leucemia promielocítica aguda (HL-60), câncer de mama (MCF-7), carcinoma de laringe humana (HEp-2) e carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292), e os resultados foram expostos através da IC<sub>50</sub> das formulações perante estas células. Os resultados demonstraram que o método de preparação foi eficiente na formação de nanocápsulas monodispersas (PDI < 0,3), com tamanhos compreendidos entre 150 e 200 nm e com uma eficiência de encapsulação do fármaco de  $98 \pm 0,91\%$  e  $97 \pm 1,3\%$  para as nanocápsulas convencionais e furtivas, respectivamente. O perfil da cinética de liberação *in vitro* evidenciou uma liberação rápida (efeito de rajada) da  $\beta$ -lapachona, através das nanocápsulas, em torno de 30% nas primeiras 2 horas do processo, com uma posterior liberação máxima de  $62,18 \pm 3,93\%$  e  $66,29 \pm 1,74\%$  para PCL/ $\beta$ -lap e PCL-PEG/ $\beta$ -lap, respectivamente. No estudo de citotoxicidade, a  $\beta$ -lapachona apresentou um efeito antiproliferativo relevante apenas na linhagem de MCF-7 (IC<sub>50</sub> 0,39  $\mu\text{g/mL}$ ), onde ficou praticamente igual ao padrão DOX (IC<sub>50</sub> 0,32  $\mu\text{g/mL}$ ). De maneira geral a  $\beta$ -lapachona, quando encapsulada, apresentou valores de IC<sub>50</sub> maiores que a  $\beta$ -lapachona livre, com exceção na linhagem NCI-H292, o que provavelmente, deve-se ao fato de um mecanismo de captura celular diferenciado. Dessa forma o ensaio de MTT se mostrou bastante eficiente na avaliação de citotoxicidade da  $\beta$ -lapachona livre e encapsulada em relação ao padrão de análise (DOX). Nos estudos *in vivo* a atividade antitumoral da  $\beta$ -lapachona nanoencapsulada promoveu uma inibição da massa tumoral acima de 49,29%, quando comparado ao grupo controle, e de aproximadamente 15% quando comparado com o fármaco livre.

Palavras-chave: PCL. Nanocápsulas.  $\beta$ -lapachona. Cinética de liberação *in vitro*. Citotoxicidade. Atividade antitumoral.

## ABSTRACT

This study describes how conventional and stealth nanocapsules were developed and characterized to facilitate the conduction of  $\beta$ -lapachone for their use in cancer therapy. First, the  $\beta$ -lapachone has been encapsulated in nanocapsules Poly-( $\epsilon$ )-caprolactone (PCL) and nanocapsules in the copolymer Poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone) methyl ether (PCL-PEG), following the interfacial deposition of preformed polymer method. These nanocapsules have been characterized by the particle size, polydispersity index, encapsulation efficiency and *in vitro* release kinetic study. The cytotoxicity assayment was performed following the method MTT cell viability through the lineage of acute promyelocytic leukemia cells (HL-60), breast cancer (MCF-7), human laryngeal carcinoma (HEp-2) and human pulmonary mucoepidermoid carcinoma (NCI-H292), and the results were exhibited by the formulations of IC<sub>50</sub> against these cells. Finally, the *in vivo* antitumor activity of  $\beta$ -lapachone was evaluated in male Swiss mice inoculated with Sarcoma 180 cells (S-180), and these animals received daily doses of 20 mg/kg/day of  $\beta$ -lapachone encapsulated stealth nanocapsules (NC-PEG-PCL/ $\beta$ -lap) or  $\beta$ -lapachone ( $\beta$ -lap) in suspension for 7 days. The results showed that the preparation method was efficient in the formation of monodispersed nanocapsules (PDI <0.3), with sizes ranging between 150 and 200 nm and having a drug encapsulation efficiency of 98% and 97% for conventional and nanocapsules furtive, respectively. The *in vitro* release profile showed a rapid release (burst effect) of  $\beta$ -lapachone through the nanocapsules, around 30% in the first 2 hours of the procedure, with a subsequent release maximum  $62.18 \pm 3.93\%$  and  $66.29 \pm 1.74\%$  for PCL/ $\beta$ -lap and PCL-PEG/ $\beta$ -lap respectively. At cytotoxicity assayment  $\beta$ -lapachone presents a relevant antiproliferative effect only on MCF-7 cell line (IC<sub>50</sub> 0,39  $\mu\text{g/mL}$ ) where the result was barely equal when compared with standard analysis DOX (IC<sub>50</sub> 0,32  $\mu\text{g/mL}$ ). Thus, the MTT assay was very efficient in evaluating  $\beta$ -lapachone cytotoxicity of free and encapsulated compared to standard analysis (DOX). In studies *in vivo* antitumor activity of  $\beta$ -lapachone nanocoated promoted an inhibition of tumor mass up to 49.29% when compared to the control group, and approximately 15% when compared to the free drug.

Keywords: PCL. Cytotoxicity. Nanocapsules.  $\beta$ -lapachone. Release kinetics *in vitro*. Antitumor activity.

## 1 INTRODUÇÃO

A  $\beta$ -lapachona [3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol (1,2-b)pirano-5,6-diona] é uma *orto*-naftoquinona que pode ser obtida naturalmente da casca de plantas da espécie *Tabebuia avellanedae* (Ipê-roxo) (Alves et al., 2008), ou através de uma semi-síntese a partir do lapachol (LI; AVERBOUK; PARDEE, 1993).

Diversos estudos têm demonstrado suas ações farmacológicas, como: antibacteriana (PEREIRA et al., 2006), antifúngica (MEDEIROS et al., 2011), tripanossomicida (FERREIRA et al., 2011), antiviral (LI et al., 1993), anti-inflamatória (MOON et al., 2007), cicatrizante (KUNG et al., 2008), antitumoral (LI et al., 1999) e antiproliferativa (SUNAASSE et al., 2013). Contudo, a aplicação clínica da  $\beta$ -lapachona está limitada devido a sua baixa solubilidade em água (0,16  $\mu$ M ou 0,038 mg/mL), e sua toxicidade (ALMEIDA et al., 2009). Atualmente uma alternativa promissora para contrapor estas limitações, é a utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos. Estes sistemas mantem constante e dentro da faixa terapêutica a concentração sanguínea do fármaco, assegurando uma maior biodisponibilidade e reduzindo os efeitos colaterais (MORA-HUERTAS et al., 2010).

Nanocápsulas podem ser preparadas por uma variedade de polímeros sintéticos como poli-( $\epsilon$ )-caprolactone (PCL) e copolímero de ácido lático e ácido glicólico (PLGA). Estes polímeros são biodegradáveis, biocompatíveis e se caracterizam por facilitar o transporte de drogas insolúveis em fluidos biológicos (SOPPIMATH et al., 2001; BARRAT et al., 2000). Entretanto, estes sistemas poliméricos convencionais quando aplicados intravenosamente, são rapidamente reconhecidos pelas opsoninas, que aderem na superfície desses sistemas e promovem a remoção da corrente sanguínea (MOSQUEIRA et al., 2001). Portanto, modificações estruturais na superfície dessas nanocápsulas foram propostos, para diminuir a sua captura pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM). Uma dessas modificações é a adição de cadeias poliméricas de polietileno glicol (PEG), na superfície dessas nanopartículas, o que impede a adsorção das opsoninas, conseqüentemente aumentando o tempo de circulação e a eficácia terapêutica de fármacos encapsulados em nanopartículas poliméricas.

Diante do exposto, o alvo do presente estudo foi desenvolver e caracterizar nanocápsulas preparadas com PCL e PCL-PEG, contendo a  $\beta$ -lapachona. A caracterização das nanocápsulas incluiu o tamanho de partículas, eficiência de encapsulação e liberação do fármaco *in vitro*. Os efeitos citotóxicos contra células cancerosas foram investigados *in vitro* e a atividade antitumoral foi avaliada *in vivo*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 MATERIAIS

A  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap), obtida a partir do lapachol através de uma rota semi-sintética, foi fornecida pelo Dr. Alexandre Góes (UFPE, BRASIL). Poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, MW 14 kDa), o copolímero poli-( $\epsilon$ -caprolactona)-b-poli(etililenoglicol) metil éter (PCL-PEG, PCL MW 32kDa, PEG MW 5 kDa), o óleo de soja e o Poloxamer 407 foram obtidos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A fosfatidilcolina de soja (Epikuron<sup>®</sup> 200) foi adquirida da Lipoid (Dusseldorf, Alemanha). O fosfato monobásico potássio, o hidróxido de sódio e os solventes P.A. foram adquiridos na Merck (Nova Jersey, EUA).

### 2.2. PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONVENCIONAIS E FURTIVAS

A  $\beta$ -lapachona foi encapsulada tanto em nanocápsulas convencionais (NC-PCL/ $\beta$ -lap), quanto em nanocápsulas furtivas de PCL (NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap), as quais foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989). Na preparação das NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap e NC-PCL/ $\beta$ -lap, o polímero PCL-PEG (150 mg), fosfatidilcolina de soja (150 mg), óleo de soja (100 mg) e  $\beta$ -lapachona (10 mg) foram dissolvidos em acetona. Esta fase orgânica foi lentamente introduzida, com o auxílio de um gotejador, em uma fase aquosa contendo o tensoativo hidrofílico poloxamer (150 mg) e o tampão fosfato (pH 7,4, 45 mL), sob agitação magnética. Posteriormente, a suspensão coloidal foi concentrada por evaporação do solvente sob pressão reduzida para obter uma concentração final de  $\beta$ -lapachona de 1mg/mL.

### 2.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

#### 2.2.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão

O tamanho médio, a distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das nanocápsulas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS), utilizando analisador de partículas a laser DelsaTMNano-S (Beckman Coulter, UK).

### 2.2.2. Determinação da $\beta$ -lapachona por CLAE

O conteúdo de  $\beta$ -lapachona nas nanopartículas foi determinado por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE). A análise cromatográfica foi realizada em equipamento Alliance 2695 (Waters, Milford Massachusetts, EUA) acoplado a um detector de arranjos de diodos (PDA) 2998 (Waters, Milford Massachusetts, EUA), operado a 256 nm. Uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250mm × 4,6mm, 5 mm, XBridge™ Waters) foi utilizada com uma fase móvel de metanol/água (80:20) a um fluxo de 1 mL/min a 37°C e um volume de injeção de 50  $\mu$ L. A curva analítica de  $\beta$ -lapachona foi preparada a partir de diluições de uma solução estoque (0,4 mg/mL), variando as concentrações de 1 a 80  $\mu$ g/mL.

### 2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação da  $\beta$ -lapachona nas nanopartículas foi determinada através da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação utilizando unidades filtrantes Microcon® (Millipore, Massachusetts, EUA). Após a centrifugação das amostras de nanopartículas (Ultracentrifuga KT-20000, Kubota, Osaka, Japão) a 10.000 rpm por 1 h a 4°C, a concentração de  $\beta$ -lapachona no sobrenadante foi determinada por CLAE a 256 nm. Desta forma, a eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela diferença entre as concentrações do fármaco na suspensão e aquela não encapsulada no filtrado.

### 2.2.4. Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* da  $\beta$ -lapachona a partir das nanocápsulas foi avaliado pelo método de diálise (CAVALCANTI et al., 2011). Neste método uma alíquota de 1 mL da formulação de nanocápsulas foi inserida em saco de diálise (membrana de celulose, cut-off [MWCO] = 10kDa, Sigma, St. Louis, EUA) e imersa em meio contendo tampão fosfato pH=7,4 (250 mL). O sistema permaneceu sob agitação constante a 37°C. Em tempos pré-determinados alíquotas de 1 mL do meio de liberação foram retiradas e congeladas para posterior quantificação da  $\beta$ -lapachona por CLAE a 256 nm. A mesma quantidade retirada do meio de liberação (1 mL) foi repostada com tampão fosfato pH=7,4 ao meio para manter a concentração constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.3 ESTUDOS DE CULTURA DE CÉLULAS

### 2.3.1 Cultura de células

As linhagens de células de carcinoma de laringe humana (HEp-2) e carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292) foram mantidas em meio DMEM. As linhagens de células de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e câncer de mama (MCF-7) foram mantidas em meio RPMI. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina a 37 ° C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram obtidas a partir de Rio de Janeiro celular Bank (Rio de Janeiro, Brasil) e mantidas em fase de crescimento exponencial.

### 2.3.2 Ensaio de citotoxicidade

As células HEp-2, NCI-H292 e MCF-7 (105 células/mL) e HL-60 (0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h, para permitir a fixação das células. A  $\beta$ -lapachona livre, bem como a doxorubicina e as suspensões contendo as nanocápsulas, foram diluídas em DMSO (1%) ou tampão a uma concentração final de 25  $\mu$ g/mL.

Após 72 horas de incubação, 25  $\mu$ L de MTT foi adicionado a cada poço e novamente colocado para incubação por 3 horas. Após esse período, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan resultantes foram diluídos em 100  $\mu$ L DMSO e as leituras das placas realizadas em um leitor de microplacas (BioTek Instruments, Winooski, USA) a 560 nm. A viabilidade celular foi calculada seguindo a seguinte equação: Viabilidade celular (%) =  $(Abs_{amostra} / Abs_{controle}) \times 100$ , onde  $Abs_{amostra}$  é a absorbância das células com as amostras e  $Abs_{controle}$  é a absorbância das células somente no meio de cultura. Os resultados desses ensaios foram expressos pela concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (IC<sub>50</sub>), realizados em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 5.0.

#### 2.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO

Para desenvolvimento do estudo de atividade antitumoral foram utilizados 30 camundongos machos, albinos, da linhagem Swiss, com 45 a 60 dias de idade, e peso entre 35 a 40 gramas, procedentes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE (Recife, Brasil). Os animais foram mantidos em ambiente climatizado sob temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ração e água *ad libitum* e aclimatizados para um ciclo claro:escuro de 12 h:12 h. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 23076.057540/2010-67).

Primeiramente, foi inoculada uma suspensão celular ( $2,0 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) do tumor ascítico Sarcoma-180 (com sete dias de implantado), via subcutânea na região subaxilar dos camundongos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, consistindo de dez animais cada. O tratamento foi iniciado 24 h após inoculação do tumor, e mantido durante sete dias consecutivos com injeções diárias (via i.p.) e mantido durante sete dias consecutivos com injeções diárias (via i.p.) de uma suspensão de  $\beta$ -Lapachona em DMSO 10% diluída em 3% TWEEN 80 (v/v Tampão Fosfato pH 7,4) ou da  $\beta$ -Lapachona nanoencapsulada (nanocápsulas furtivas) utilizando uma dose de 20 mg / kg / dia durante sete dias. O grupo controle será tratado com solução salina. Após o tratamento os animais foram anestesiados com Urethane® e sacrificados por punção cardíaca. A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle não tratado de acordo com a seguinte fórmula:  $\% \text{ inibição do tumor} = (C - T)/C \times 100$ , onde C é o peso do tumor do grupo controle e T é o peso do tumor dos grupos tratados a  $\beta$ -Lapachona.

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

## 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste t de Student's ( $p \leq 005$ ). Os resultados experimentais foram expressos no formato de média  $\pm$  D.P.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO $\beta$ -LAPACHONA

As características físico-químicas das nanocápsulas estão resumidas na tabela 1. A distribuição de tamanho e o índice de polidispersão das nanopartículas são parâmetros importantes a serem avaliados durante o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, visto que indicam o grau de uniformidade de tamanho e da dispersão de uma amostra (Schaffazick et al., 2003).

As nanocápsulas convencionais (NC-PCL/ $\beta$ -lap) apresentaram um tamanho de  $159,4 \pm 2,05$  nm e um índice de polidispersão de  $0,262 \pm 0,37$ , enquanto que as nanocápsulas furtivas (NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap) apresentaram diâmetro de  $176,6 \pm 2,81$  nm e um índice de polidispersão de  $0,288 \pm 0,31$ . O aumento do tamanho de partícula das nanocápsulas furtivas foi, provavelmente, devido à presença do PEG na superfície das mesmas (MOSQUEIRA et al., 2001).

Tabela 1 - Características físico-químicas das nanocápsulas convencionais (NC-PCL/ $\beta$ -lap) e furtivas (NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap) contendo  $\beta$ -lapachona ( $n=3$ )

Amostra	Diâmetro médio (nm) $\pm$ D.P.	*P.D.I. $\pm$ D.P.	**EE% $\pm$ D.P.
NC-PCL/ $\beta$ -lap	$159,4 \pm 2,05$	$0,262 \pm 0,37$	$98,2 \pm 0,09$
NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap	$176,9 \pm 2,81$	$0,288 \pm 0,31$	$97,1 \pm 0,13$

\*PDI = Índice de polidispersão

\*\*EE= Eficiência de encapsulação.

Fonte: O autor, 2013.

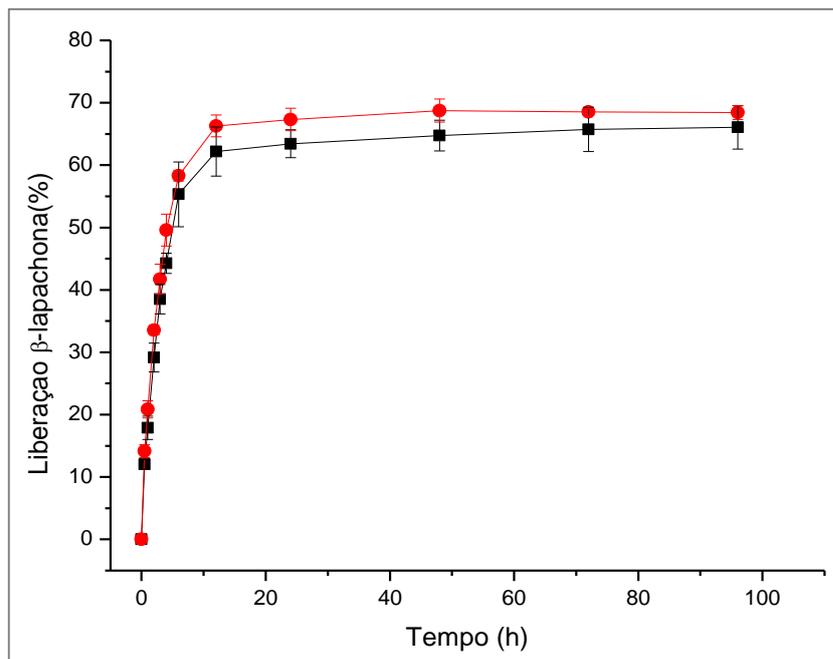
As nanocápsulas convencionais apresentaram um valor de eficiência de encapsulação em torno de 98%, enquanto que as nanocápsulas furtivas obtiveram valor em torno de 97%. Resultados de altas eficiências de encapsulação da  $\beta$ -lapachona, podem ser explicadas devido ao fato de que fármacos muito lipofílicos tem grande afinidade pela cavidade interna das nanocápsulas (MORA-HUERTAS et al., 2010).

### 3.2. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Estudos de liberação de fármacos determinam a fração do fármaco liberado das nanoestruturas em função do tempo. Esta liberação, a partir das nanopartículas, depende da dessorção do fármaco das superfícies das partículas, da difusão do fármaco a partir através da parede polimérica das nanocápsulas, da erosão da matriz polimérica, da combinação dos processos de difusão e erosão, da afinidade do fármaco a fase oleosa (SOPPIMATH et al., 2001).

O perfil de liberação *in vitro* da  $\beta$ -lapachona a partir das nanocápsulas está demonstrado na Gráfico 1. As nanocápsulas convencionais e furtivas apresentaram um efeito de liberação rápida inicial (Efeito *burst*) de  $17,89 \pm 1,89\%$  e  $20,84 \pm 1,4\%$  respectivamente, na primeira hora de liberação. O máximo de liberação do fármaco foi atingido em 12 h em torno de  $62,18 \pm 3,93\%$  e  $66,29 \pm 1,74\%$  do seu conteúdo inicial, para NC-PCL/  $\beta$ -Lap e NC-PCL-PEG/ $\beta$ -Lap, respectivamente. A liberação do fármaco primidona, por nanocápsulas de poli-( $\epsilon$ -caprolactona) foi de  $76 \pm 1,4\%$  em 8 horas. Estatisticamente, não houve diferenças quando comparados os sistemas convencionais e furtivos, sugerindo que a presença do PEG na superfície das nanocápsulas furtivas não afetou a velocidade de liberação do fármaco.

Gráfico 1 - Perfil de liberação da  $\beta$ -lapachona a partir das nanocápsulas convencionais (NC-PCL/ $\beta$ -Lap) (■) e furtivas (NC-PCL-PEG/ $\beta$ -Lap) (●). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3)



Fonte: O autor, 2013.

### 3.3 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade da  $\beta$ -lapachona foi avaliada, através do ensaio de MTT, frente à linhagem de carcinoma de laringe humana (HEp-2), carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292), leucemia promielocítica aguda (HL-60) e câncer de mama (MCF-7). Os valores das concentrações necessárias para inibir a proliferação celular em 50% (IC<sub>50</sub>) da  $\beta$ -lapachona livre e encapsulada estão dispostos na tabela 2. De maneira geral a  $\beta$ -lapachona apresentou efeito citotóxico menor em relação ao controle positivo (DOX) em todas as linhagens estudadas, com exceção na linhagem de câncer de mama (MCF-7), onde a  $\beta$ -lapachona apresentou valor de IC<sub>50</sub> (0,39  $\mu$ g/mL) estatisticamente igual ao padrão DOX (0,32  $\mu$ g/mL). Segundo Pink e colab. (2000) isto se deve ao fato de que este tipo de câncer possui uma expressão elevada da enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1), o qual acredita ser o principal motivo do aumento de citotoxicidade da terapia com a  $\beta$ -lapachona. Os valores das IC<sub>50</sub> da  $\beta$ -lapachona nanoencapsulada, em nanocápsulas convencionais e furtivas, não diferiram estatisticamente entre si. Estes resultados ainda foram menores em relação à  $\beta$ -lapachona livre, com exceção na linhagem carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292), onde a encapsulação em nanocápsulas furtivas melhorou significativamente a citotoxicidade (IC<sub>50</sub> = 0,26  $\mu$ g/mL da nanocápsulas furtivas em relação à  $\beta$ -lapachona livre IC<sub>50</sub> 0,60  $\mu$ g/mL), evidenciando assim, que, um possível mecanismo intrínseco a esta linhagem, especificamente, potencializou a sua ação antiproliferativa.

Tabela 2 - Valores da IC<sub>50</sub> da  $\beta$ -lapachona livre, em nanocápsulas convencionais (NC-PCL/ $\beta$ -lap) e em nanocápsulas furtivas (NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap) frente à linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (NCI-H292), carcinoma de laringe humana (HEp-2) e leucemia promielocítica aguda (HL-60), após 72 horas de incubação. Os dados foram expressos como média  $\pm$  intervalo de confiança (n=3)

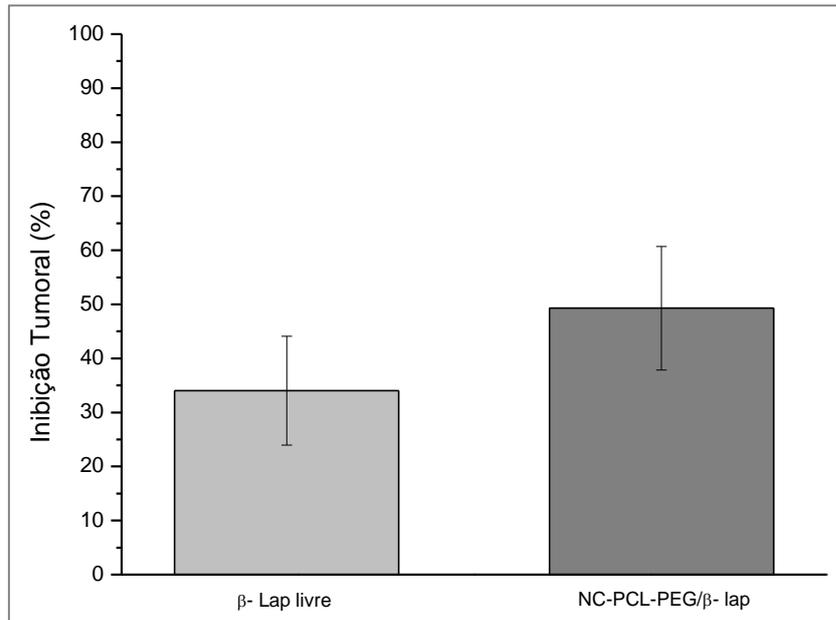
Linhagens	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)			
	Intervalo de confiança			
	MCF-7	NCI-H292	HEp-2	HL-60
$\beta$ -lapachona	0,39 0,53 – 0,76	0,60 0,52 – 0,69	0,86 0,81 -0,90	0,67 0,50 – 0,91
Nanocápsulas convencionais	0,67 0,57 - 0,80	0,43 0,33 - 0,57	1,13 0,97 - 1,31	0,90 0,63 – 1,28
Nanocápsulas furtivas	0,50 0,32 – 0,43	0,26 0,18 – 0,39	0,91 0,80- 1,03	0,82 0,62 – 1,01
<b>Doxorrubicina</b>	0,32 0,19 - 0,53	0,08 0,06 – 0,12	0,31 0,26 -0,36	0,06 0,05 - 0,07

Fonte: O autor, 2013.

### 3.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

O estudo da atividade antitumoral demonstrou que  $\beta$ -lapachona nanoencapsulada, em nanocápsulas furtivas, promoveu uma inibição da massa tumoral em torno de  $49,29 \pm 12,43\%$ , enquanto que a  $\beta$ -lapachona livre promoveu uma inibição de  $34,04 \pm 11,08\%$  (Gráfico 2). Essa potencialização de 15,25%, deixa exposto que a liberação controlada, promovida pelo sistema furtivo, potencializou o efeito antitumoral da  $\beta$ -lapachona. Apesar da atividade antitumoral da  $\beta$ -lapachona livre ter sido bastante significativa, alguns animais apresentaram lesões macroscópicas visíveis na dose utilizada (20mg/kg). Análise histopatológica posterior irá avaliar o grau destas lesões.

Gráfico 2 - Avaliação da atividade antitumoral da  $\beta$ -lapachona livre ( $\beta$ -lap livre) e em nanocápsulas furtivas frente a Sarcoma 180 em camundongos:  $\beta$ -lapachona livre ( $\beta$ -lapachona em suspensão) e NC-PCL-PEG/ $\beta$ -lap ( $\beta$ -lapachona encapsulada em nanocápsulas furtivas)



Fonte: O autor, 2013.

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

assim o aumento nos níveis de células brancas no sangue. Contudo, nos animais tratados com  $\beta$ -lapachona nanoencapsulada, este aumento foi menor ( $WBC = 8,7 \pm 1,18$  para nanocápsulas furtivas) quando comparado ao grupo tratado com a  $\beta$ -lapachona livre ( $WBC = 11,7 \pm 0,94$ ), sugerindo que houve uma maior eficácia na ação do fármaco e, conseqüentemente, uma diminuição do processo inflamatório associado ao tumor.

Tabela 3 - Análise hematológica de animais tratados com  $\beta$ -lapachona livre e nanoencapsulada.

Formulações	Parâmetros Hematológicos							
	WBC $10^3/\mu\text{l}$	RBC $10^6/\mu\text{l}$	Hb g/dL	Hct (%)	VCM	HCM	CHCM	RDW
<sup>a</sup> Controle (-)	3,2 $\pm$ 0,12	10,4 $\pm$ 0,03	18,5 $\pm$ 0,05	51,0 $\pm$ 0,44	52,8 $\pm$ 0,49	17,8 $\pm$ 0,05	33,4 $\pm$ 0,57	16,6 $\pm$ 0,45
<sup>b</sup> Controle (+)	13,4 $\pm$ 1,12	10,1 $\pm$ 0,82	15,3 $\pm$ 0,72	45,1 $\pm$ 2,25	48,5 $\pm$ 0,97	16,1 $\pm$ 0,52	33,1 $\pm$ 0,57	16,4 $\pm$ 1,06
$\beta$ -lap	11,7 $\pm$ 0,94	9,4 $\pm$ 0,50	14,9 $\pm$ 0,88	45,4 $\pm$ 1,40	48,8 $\pm$ 1,34	16,3 $\pm$ 0,39	33,1 $\pm$ 0,50	15,7 $\pm$ 0,40
NC PCL-PEG/ $\beta$ -lap	8,7 $\pm$ 1,18	8,6 $\pm$ 0,87	13,8 $\pm$ 1,06	50,1 $\pm$ 0,85	42,4 $\pm$ 1,42	16,1 $\pm$ 0,56	34,3 $\pm$ 0,20	15,4 $\pm$ 0,66

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

Fonte: O autor, 2016.

#### 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, nanocápsulas convencionais e furtivas foram obtidas através do método de deposição interfacial e apresentaram: baixos índices de polidispersão, tamanho em escala nanométrica adequados a terapêutica do câncer e alta eficiência de encapsulação (98%). Através do estudo de liberação *in vitro*, foi possível avaliar o perfil de liberação da  $\beta$ -lapachona a partir das nanocápsulas, com um máximo de liberação ocorrido em 12 horas. No estudo de citotoxicidade, a  $\beta$ -lapachona em suspensão apresentou um efeito antiproliferativo relevante especificamente na linhagem de câncer de mama MCF-7, o que sugere um mecanismo de ação específico para esta linhagem. Na avaliação da atividade antitumoral, a  $\beta$ -lapachona livre demonstrou uma atividade relevante, atividade esta que foi potencializada após a sua encapsulação em nanocápsulas furtivas. Os resultados obtidos neste estudo colocam a  $\beta$ -lapachona como um promissor agente antitumoral.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD).

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. R. et al. Toxicological Assessment of Beta-lapachone on Organs from Pregnant and Non-pregnant Rats. **Phytotherapy research**, fev. 2009.

ALVES, G. M. C. et al. Purificação e caracterização da  $\beta$ -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, p. 413-416, 2008.

CAVALCANTI, I. M. et al. The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 332-340, 2011.

DONG, Y. et al. Intratumoral delivery of  $\beta$ -lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 131-139, 2009.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1-4, 1989.

KUNG, H. N. et al. *In vitro* and *in vivo* wound healing-promoting activities of  $\beta$ -lapachone. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 295, p. C931-C943, 2008.

LI, C. J. et al. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by  $\beta$ -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 13369-13374, 1999.

LI, C. J.; AVERBOUK, L.; PARDEE, A. B.  $\beta$ -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463-22468, 1993.

LI, Y. et al. Potent induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, v. 6, p. 1008-1015, 2000.

MEDEIROS, C. S. et al. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-

immunosuppressed swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 345-349, 2011.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocápsulas. **Biomaterials**, v. 22, p. 2967-2979, 2001.

MOON, D. et al. Anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 506-514, 2007.

PEREIRA, E. M. et al. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v, 5, p. 1-7, 2006.

PINK, J. J. et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) activity is the principal determinant of  $\beta$ -lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5416-5424, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SOPPIMATH, K. S., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1-20, 2001.

SUNASSE, N.S. et al. Cytotoxicity of lapachol, b-lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p 98-110, 2013