UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS FURTIVAS CONTENDO β-LAPACHONA PARA A TERAPIA DO CÂNCER

ALUNA: ISLENE DE ARAUJO BARBOSA

ORIENTADORA: PROFª. DRª. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

RECIFE, 2011

ISLENE DE ARAUJO BARBOSA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS FURTIVAS CONTENDO β-LAPACHONA PARA A TERAPIA DO CÂNCER

Defesa de Mestrado apresentada para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 2011

Barbosa, Islene de Araújo
Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas furtivas contendo beta-lapachona para a terapia do câncer/ Islene de Araújo Barbosa. – Recife: O Autor, 2011.

73 folhas : il., fig., tab.
Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Fármacos 2. Nanotecnologia 3. Câncer I. Título.

615.1 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2011-173

BANCA EXAMINADORA:

Titulares

Profª. Drª. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora) – PRESIDENTA

Profª. Drª. Noemia Pereira da Silva Santos – 1° EXAMINADOR

Profª. Drª. Maria da Paz Carvalho – 2° EXAMINADOR

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelos grandes desafios e vitórias alcançadas durante essa importante fas minha vida.

A minha família, em especial aos meus queridos pais e ao meu irmão, pela força, pelo amor e confiança dispensados ao longo de toda a minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim!

A Geyner Alves, meu namorado, pelo companheirismo, paciência, dedicação e por todos os momentos felizes que estamos vivendo. Te amo!

Aos meus avôs Manoel Barbosa e Severina Silva que não estão mais entre nós, porém estarão sempre comigo em minhas lembranças! Muita saudade!

A Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa Sistemas de liberação controlada (SLC), pela orientação, conhecimento e confiança transmitida. Estou muito grata!

As minhas queridas amigas Milena Ferraz, Marcela Silvestre, Mariane Cajubá e Isabella Macário por nossa amizade e companheirismo durante toda minha vida acadêmica. Adoro muito vocês!

Aos amigos do Grupo de Sistema de Liberação Controlada de Medicamentos, Rafaela, Fábio, Jéssica, Taciana, Elisângela, Catarine, Cecília, Larissa, Flávia, André, Patrícia e Reginaldo pela amizade, convívio e bons momentos vividos neste período. E aqueles que não estão mais no grupo, mas que fizeram parte da minha formação científica, Débora, Paula, Cícero, Dáfila, Agenor e Cínthia.

A Pabyton Cadena pelos ensinamentos e ajuda com o HPLC. Muito obrigada por está colaborando com meu trabalho!

A Profª Maria da Paz por sempre receber os alunos com um sorriso e bom humor e pelo conhecimento e experiência transmitidos no estágio à docência. Foi muito gratificante!

A Profª. Noemia Santos, por sua atenção e por transmitir sua experiência em alguns momentos compartilhados.

Ao Profº José Luiz de Lima Filho, diretor do LIKA por ceder as instalações para a realização da pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica do LIKA: Ricardo, Mariana, Luiza, Drica e Nathália por toda colaboração e amizade.

A Seu Otaviano (que conserta tudo, sem ele meus experimentos não teriam sido concretizados) e Rafael Padilha pela grande colaboração neste momento final.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), em especial a Edson, Vera e Felipe, que sempre estavam dispostos a ajudar.

A toda equipe do Laboratório de Polímeros não convencionais do Departamento de Física da UFPE, em especial, ao Profº. César Andrade e Clécio Santos.

Ao Cetene pela colaboração com as análises de potencial zeta e infravermelho. Em especial a Edwin Millet por ser sempre prestativo e ter colaborado com este trabalho.

Ao Prof. Pedro Rolim e Larissa Rolim do Laboratório Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco pela colaboração na realização das análises de DSC.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -FACEPE, pelo apoio financeiro na realização dessa pesquisa.

A todos os outros colegas e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Islene.

"Onde o medo está presente, a sabedoria não consegue estar."
(Lucius C. Lactantius)

Dedico este trabalho a todos que eu amo e que participaram direta ou indiretamente deste título!

SUMÁRIO

1.0 - INTRODUÇÃO..... 14
2.0 - REVISÃO DA LITERATURA..... 17
2.1 - Câncer..... 17
2.2 - β-lapachona..... 18
2.2.1 - Propriedades gerais..... 18
2.2.2 - Atividades biológicas..... 20
2.3 - Nanotecnologia: conceitos básico..... 24
2.4 - Sistema de liberação controlada de fármacos..... 25
2.5 - Sistemas nanoparticulados - Nanocápsulas..... 27
2.5.1 - Caracterização físico-química das nanocápsulas..... 28
2.5.2 - Polímeros utilizados na preparação de nanocápsulas..... 30
2.6 - Poli(ε-caprolactona)..... 31
2.7 - Sistemas furtivos..... 33
2.8 - Aplicações das nanocápsulas na terapia do câncer..... 35
3.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS…… 37
3.0 - OBJETIVOS..... 51
3.1 - GERAL..... 51
3.2 - ESPECÍFICOS..... 51
4.0 – CAPÍTULO I..... 53
5.0 - CONCLUSÕES……...…… 73

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura **Páginas**

Figura 1: Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira..... 17

Figura 2: Estrutura química do Lapachol, β-lapachona e α-lapachona..... 19

Figura 3: Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) dos cristais de β-lapachona..... 19

Figura 4: Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: sistema convencional X de liberação controlada..... 26

Figura 5: Principais nanocarreadores utilizados como sitemas de liberação controlada..... 27

Figura 6: Mecanismo de liberação do fármaco a partir de nanocápsulas e nanoesferas..... 31

Figura 7: Estrutura química do PCL..... 32

Figura 8: Estrutura química do polietilenoglicol..... 34

Artigo científico

Figura 1: Chemical structure of β-lapachone……..... 55

Figura 2: Differential scanning calorimetry curves: A) β-lap; B) PCL; C) PCL-PEG; D) empty PCL nanocapsules; E) β-lap-loaded PCL nanocapsules; F) empty PCL-PEG nanocapsules; G) β-lap-loaded PCL-PEG Nanocapsules..... 63

Figura 3: Infrared spectra of: A) β-lap; B) empty PCL nanocapsules C) β-lap-loaded PCL nanocapsules (1 mg/mL); D) empty PCL-PEG nanocapsules; E) β-lap-loaded PCL-PEG nanocapsules (1 mg/mL)..... 64

Figura 4: *In vitro* release profile of β-lap from PCL-PEG nanocapsules (■) and PCL nanocapsules (●)..... 66

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura **Páginas**

Tabela 1: Atividade citotóxica da β-Lapachona contra diferentes linhagens de células tumorais..... 25

Tabela 2: Encapsulação de diferentes classes de fármacos em nanopartículas de PCL..... 33

Artigo Científico

Table 1: Physicochemical characteristics of the nanocapsules preparations..... 61

Table 2: β-lapachone loading in PCL and PCL-PEG nanocapsules....……..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
β-lap	β-lapachona
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FDA	Agência de Vigilância Sanitária Americana
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana
IC_{50}	Concentração de uma substância necessária para inibir 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
MCF-7	Linhagens de células de câncer de mama
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NC	Nanocápsulas
NQO1	Enzima NADP(H)/quinona oxirredutase
OMS	Organização mundial de saúde
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PCL-PEG	Poli(ε-caprolactona)-Polietilenoglicol
PEG	Polietilenoglicol
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
Tg	Temperatura de transição vítrea
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

A β-lapachona é uma *orto*-naftoquinona obtida a partir do lapachol, substância extraída do cerne da *Tabebuia avellanedae* (ipê-roxo). Este fármaco apresenta diversas propriedades farmacológicas, porém o maior interesse de se estudar esta molécula é o fato desta apresentar uma elevada atividade antineoplásica contra várias linhagens de células tumorais. No entanto, sua aplicação terapêutica é limitada por apresentar baixa solubilidade aquosa. Uma estratégia para aumentar sua solubilidade, e conseqüentemente, sua biodisponibilidade, seria incorporar a β-lapachona em nanocarreadores poliméricos, tais como as nanocápsulas. O objetivo do presente trabalho foi encapsular a β-lapachona em nanocápsulas de Poli(ε-caprolactona) (PCL) e Poli(ε-caprolactona)-polietilenoglicol (PCL-PEG), efetuar a caracterização físico-química destes sistemas e avaliar a cinética de liberação *in vitro*. Nanocápsulas contendo β-lapachona foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As formulações foram caracterizadas pelo tamanho médio de partículas, carga de superfície através do potencial zeta, taxa de encapsulação, infravermelho e e análise térmica através de calorimetria diferencial de varredura (DSC). O tamanho médio das partículas variou de 120 a 171 nm. As nanocápsulas apresentaram-se monodispersas (PDI < 0,3) e carga de superfície negativa em torno de -20 e -12 mV para as nanocápsulas de PCL e PCL-PEG, respectivamente. As nanocápsulas contendo β-lapachona apresentaram taxa de encapsulação acima de 95%. Os resultados de análise térmica mostram que o fármaco apresenta-se solubilizado no interior das nanocápsulas. O espectro de infravermelho das nanocápsulas contendo β-lapachona demonstrou banda de absorção em torno de 1727 cm^{-1} correspondente ao grupamento carbonila (C=O) presente no PCL. O perfil da liberação *in vitro* da β-lapachona a partir das nanocápsulas apresentou uma liberação rápida do fármaco (efeito *burst*) em torno de 45%, nas primeiras horas do processo cinético. Essa primeira etapa foi seguida de uma liberação lenta por 10 horas atingindo uma liberação máxima de 75% e 73% para as nanocápsulas de PCL-PEG e PCL, respectivamente. O presente trabalho demonstrou que a incorporação da β-lapachona nas nanopartículas de PCL e PCL-PEG pode fornecer uma estratégia para superar a baixa solubilidade da molécula.

Palavras-chave: β-lapachona; nanocápsulas; poli(ε-caprolactona); caracterização físico-química; cinética de liberação *in vitro*

ABSTRACT

The β-lapachone is an ortho-naphthoquinone obtained from lapachol, a substance extracted from the heartwood of *Tabebuia avellanedae* (ipê roxo). This drug has several pharmacological properties, but the greatest interest in studying this molecule is the fact that present a significant anticancer activity against variety tumor cell lines. However, its therapeutic application is limited by its low aqueous solubility. One strategy to increase its solubility, and consequently, its bioavailability, it would incorporate the β-lapachone in polymeric nanocarriers, such as nanocapsules. The aim of this study was to encapsulate the β-lapachone in nanocapsules of poly (ε-caprolactone) (PCL) and Poly (ε-caprolactone)-Polyethylene glycol (PCL-PEG), and to evaluate their physicolchemical characteristics and to evaluate *in vitro* kinetics. β-lapachone-loaded nanocapsules were obtained by interfacial deposition of preformed polymer method. The formulations were characterized by particle size, surface charge through zeta potential, encapsulation efficiency, infrared analysis and thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC). The particle size ranged from 120 to 171 nm. The nanocapsules presented monodisperse (PDI <0.3) and negatively charged surface around -20 and -12 mV for the nanocapsules of PCL and PCL-PEG, respectively. β-lapachone-loaded nanocapsules showed encapsulation efficiency above 95%. The results of thermal analysis showed that the drug encapsulated in nanocapsules is solubilized inside the nanocapsules. The infrared spectrum of β-lapachone-loaded nanocapsules showed absorption bands around 1727 cm^{-1} corresponding to the carbonyl group (C = O) present in PCL. The profile of in vitro release of β-lapachone from nanocapsules showed a quick release of the drug (*burst* effect) around 45% at the first hours of the kinetics. This initial step was followed by a drug controlled release achieving about 75% and 73% for the nanocapsules of PCL-PEG and PCL, respectively. This work demonstrated that the incorporation of β-lapachone in nanocapsules of PCL and PCL-PEG may provide a strategy to overcome the β-lapachone low solubility.

Keywords: β-lapachone; nanocapsules; poli(ε-caprolactone); physicochemical characterization; *in vitro* kinetics.

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

Diversas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas para o tratamento do câncer, sempre com o objetivo principal de erradicar as células tumorais. A eficiência da atual quimioterapia é limitada principalmente pela toxicidade associada com os fármacos antineoplásicos aos tecidos normais.

A β-lapachona é uma substância química do grupo das naftoquinonas, que pode ser obtida facilmente após o tratamento do lapachol, substância amarela extraída do cerne do Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae*). Diversas pesquisas têm demonstrado excelente potencial antineoplásico desta molécula, agindo contra diversos tipos de câncer, por um mecanismo particular de apoptose. Porém uma das desvantagens da utilização terapêutica da β-lapachona é sua baixa solubilidade em água, limitando desta forma sua administração sistêmica e aplicações clínicas *in vivo*. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para melhorar sua biodisponibilidade.

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos de liberação controlada em escala nanométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos. Dentre estes sistemas estão as nanocápsulas, as quais são constituídas por uma cavidade interna, geralmente de natureza oleosa, estabilizadas por um filme interfacial de agentes tensoativos e revestidas superficialmente por uma parede polimérica irregular pouco espessa. Esta parede pode ser responsável pela estabilidade da partícula no meio coloidal e controla a liberação do fármaco. As nanocápsulas podem agir como veículos carreadores de fármacos capazes de atingir tecidos ou células tumorais, enquanto protegem a inativação prematura do princípio ativo durante o seu transporte no organismo. A utilização de sistemas nanoparticulados biodegradáveis para liberação controlada de fármacos tem apresentado vantagens no aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos sistêmicos.

O principal obstáculo para a utilização das nanocápsulas convencionais se deve a rápida remoção destes nanocarredores do organismo pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM), compostos pelos macrófagos que são capazes de remover estas nanopartículas da circulação sanguínea segundos após sua administração intravenosa, o que as tornam menos eficazes como dispositivos carreadores de fármacos. Para evitar o reconhecimento das nanocápsulas pelo SFM, foram desenvolvidas as nanocápsulas furtivas ou de longa duração. Este desenvolvimento foi possível através da modificação da superfície das nanocápsulas pela ligação das cadeias do polímero polietilenoglicol (PEG) ao polímero constituinte da membrana polimérica da nanocápsula.

Com isso, uma "nuvem" de cadeias hidrofílicas na superfície da nanocápsula é formada o que evita a opsonização e reconhecimento por macrófagos e propicia um longo tempo de permanência no plasma.

A utilização de nanocarreadores contendo fármacos antitumorais visa sobrepor os mecanismos de resistência celular, aumentar a seletividade dos fármacos em células tumorais, enquanto reduz a toxidade em tecidos normais. Portanto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas modernos capazes de viabilizar a administração da β-lapachona, um potente agente antineoplásico, em uma formulação que melhore sua solubilidade, bem como, otimize a dose terapêutica e permita uma melhor biodisponibilidade do fármaco nos tumores para a aplicação destes nanosistemas na terapia do câncer.

Revisão da literatura

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer representa uma das principais causas de mortalidade do mundo. De acordo com a Organização mundial de Saúde (OMS) mais de dez milhões de pessoas são diagnosticadas com a doença anualmente. No Brasil, as neoplasias malignas representam a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, precedido apenas pelas doenças cardiovasculares. As estimativas para o ano de 2011 apontam o surgimento de 489.270 novos casos de câncer (INCA, 2010). Na figura abaixo os principais tipos de câncer que afeta a população brasileira.

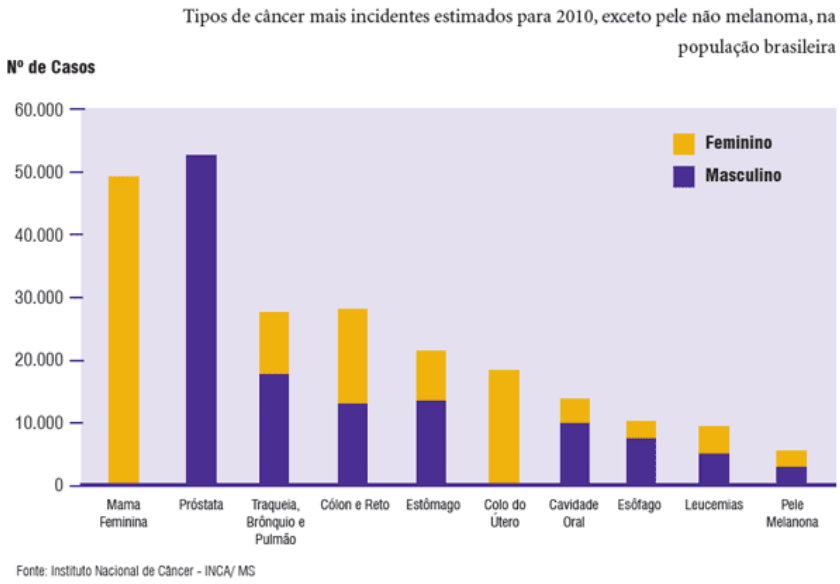

Figura 1. Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira (INCA, 2010).

Câncer é um termo genérico dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos (INCA, 2010). As causas que podem levar ao câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, ou ambas relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Os tumores podem ser de dois tipos dependendo do tipo de célula em que se inicia. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (Cotran et al., 2000; Robbins et al., 2000; INCA, 2010).

Inicialmente, o câncer começa como uma doença localizada, mas são propensas a se espalhar para locais distantes no corpo, o que torna o câncer incurável. O tumor desenvolve um conjunto de rede de vasos sanguíneo para se manter. Através da corrente sanguínea ou linfática, as células malignas chegam a outros órgãos, desenvolvendo a doença nestas regiões. Esse processo de irradiação da doença é conhecido como metástase (Cotran et al., 2000).

Atualmente, os tratamentos de câncer têm sido realizados com base no estado clínico e patológico, que é determinado usando ferramentas morfológicas de diagnóstico, como exames radiológicos convencionais e histopatológicos. As categorias básicas para o tratamento mais comuns compreendem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, utilizadas de forma isolada, ou em associação (Chabner; Calabresi, 1991).

Apesar de alguns avanços nas formas de tratamentos convencionais, a terapia contra o câncer ainda está longe de ser ideal, devido a algumas limitações . Entre os desafios mais freqüentes enfrentados pelas terapias atuais está a distribuição sistêmica não específica dos agentes antitumorais, concentrações inadequadas do fármaco ao local de ação, elevada citotoxicidade, a capacidade limitada para monitorar a resposta terapêutica e desenvolvimento de mecanismos de resistência a múltiplas drogas (Nishiyama et al., 2009; Mitra et al., 2001). Assim, há uma necessidade urgente para desenvolver tecnologias novas e inovadoras que poderão ajudar na terapêutica.

2.2 β-lapachona

2.2.1 Propriedades gerais

As naftoquinonas são substâncias orgânicas que possuem uma larga distribuição na natureza e podem ser extraídas de certas famílias vegetais, tais como: Ebanacea, Bignoniaceae, Juglandaceae, Boraginaceae e Drosceraceae (Lisieux et al., 1999). As naftoquinonas possuem como principal característica a presença de dois grupos carbonílicos na sua estrututa química. Entre as principais naftoquinonas destacam-se o lapachol, uma substância amarela extraída do cerne do Ipê-Roxo (*Tabebuia avellanedae*) (Silva et al., 2003) e a β-lapachona, substância semisintética obtida a partir do lapachol (Cunha-filho et al., 2008) .

A β-lapachona (Figura 2) (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] pirano-5,6-diona) é obtida facilmente após o tratamento do lapachol por aquecimento ou hidrólise a frio com ácido sulfúrico (Li et al., 1993). Esta molécula possui um isômero, α-lapachona (3,4-dihidro-2,2-

dimetil-2H-naftol [2,3-b] pirano-5,6-diona), que são semelhantes quimicamente, porém a α-lapachona não apresenta atividade farmacológica significativa.

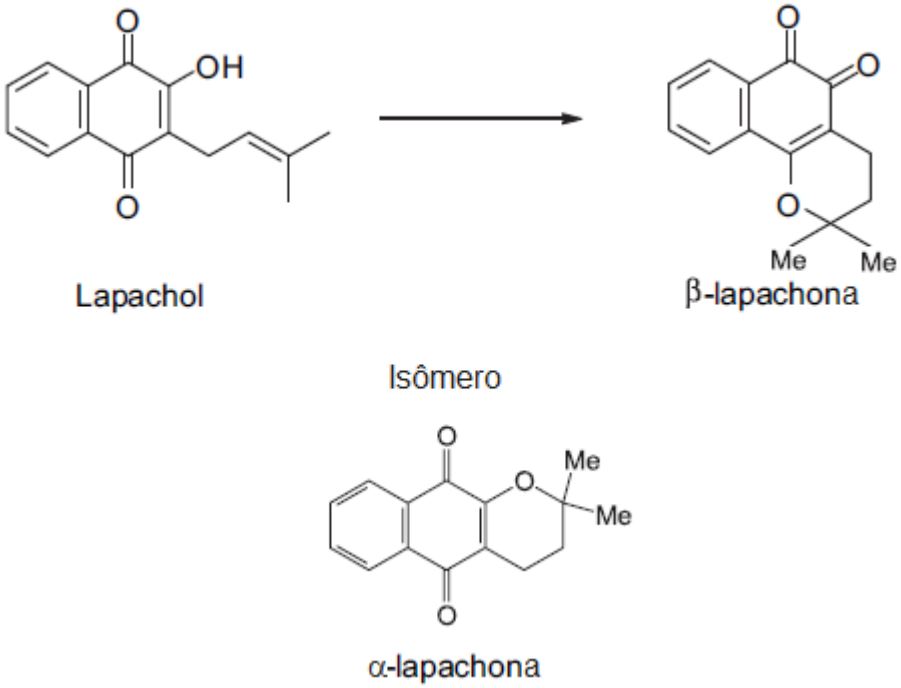

Figura 2. Estrutura química do lapachol, β-lapachona e α-lapachona Fonte: (Silva et al., 2003; Coelho et. al., 2010).

Dentre as suas propriedades químicas gerais, a β-lapachona caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação laranja-avermelhada (Figura 3a), de forma de cristais cinlíndricos (Figura 3b), com peso molecular de 242,3 Da e ponto de fusão entre 154,5 – 155,5 ºC. É estruturalmente estável em pH de 3 a 9 (Silva et al., 2003). É uma molécula hidrofóbica, com solubilidade em água igual a 0,038 mg/mL ou 0,16 mM, o que limita bastante sua aplicação clínica (Nasongkla et al., 2003)

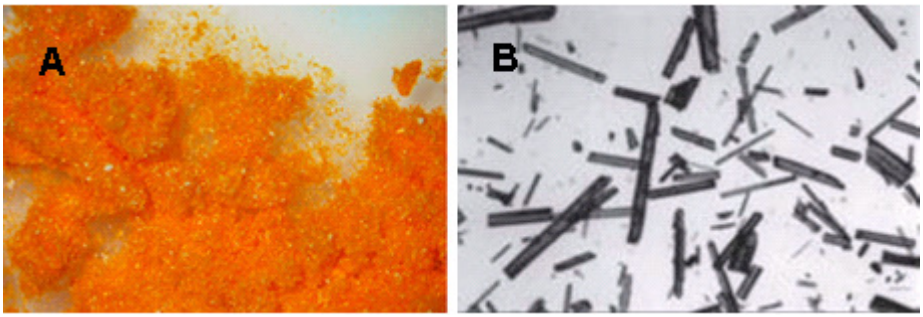

Figura 3. Aspecto macroscópico (A) e microscópico (B) dos cristais de β-lapachona. Fonte: Alves et al., 2008; Cunha-Filho et al., 2008.

2.2.2 Atividades biológicas

A β-lapachona apresenta inúmeras ações farmacológicas, tais como antimicrobiana, antifúngica (Guiraud et al., 1994), tripanossomicida (Salas et al., 2008), antiviral (Li et al., 1993), inibidoras do crescimento de células tumorais (Pink at al., 2000), redução da replicação do HIV-1 (Carvalho et al., 2002), além de estudos reportarem esta molécula como um novo inibidor de topoisomerase (Krishnan et al., 2001)

;.

- **Atividade Antimicrobiana**

Estudos preliminares sobre a atividade antimicrobiana da β-lapachona demonstraram ação relevante contra algumas bactérias Gram-positivas, tais como *Bacillus subtilis* e S*thaphilococus. aureus* e contra espécies Gram-negativas do gênero *Brucella* (Lima et al., 1962).

Coelho e colaboradores (2010) estudaram o efeito da β-lapachona e outros compostos sintetizados a partir desta molécula contra o *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e uma cepa de *M. Tuberculosis* resistente a rifampicina. A β-lapachona foi ativa na mesma concentração contra as duas cepas testadas (MIC = 6,43 μM), enquanto que os compostos derivados não apresentaram atividade.

- **Atividade Antiparasitária**

Boveris e colaboradores (1978) estudaram o efeito *in vitro* da β-lapachona em formas epimastigotas de *Tripanosoma cruzi.* Foi observado que as células tratadas com β-lapachona induziram a liberação de O_2 e H_2O_2, desta forma foi evidenciado que esta molécula apresenta um mecanismo ligado ao ciclo redox. A concentração de 4 μMol utilizada inibiu completamente o crescimento de *T. cruzi.* Outros estudos realizados demonstraram que a β-lapachona possui a capacidade de desarranjar as cromátides do *T. cruzi*, provocando degradações de DNA, RNA e proteínas, podendo ser irreversíveis ou não, dependendo da concentração utilizada (Goijman et al.,1985).

A atividade tripanossomicida *in vitro* da β-lapachona também foi evidenciada por Salas e colaboradores (2008), na qual diferentes concentrações foram testadas em formas epimastigostas. Os resultados demonstraram inibição do crescimento dos parasitas e apresentaram atividade similar ou mais elevada em comparação aos fármacos convencionais

utilizados no tratamento da doença de Chagas, tais como o nifurtimox e o benzonidazol. A β-lapachona também induziu a produção de radicais livres, confirmando o mecanismo de ação relacionado ao ciclo redox celular.

- **Atividade Antiviral**

A atividade antiviral *in vitro* da β-lapachona foi reportada primeiramente por Schuerch e Wehrli em 1978, que demonstraram a inibição da transcriptase reversa do vírus da leucemia de Rauscher. Posteriormente, estudos *in vivo*, demonstraram a inibição pela β-lapachona da replicação de RNA do retrovírus desta mesma leucemia. Os resultados indicaram um aumento no tempo de sobrevida dos animais infectados com o vírus (Scaffner-Sabba et al., 1984).

Estudos *in vitro* demonstraram que a β-lapachona bloqueia a transcrição do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) através de um mecanismo de bloqueio seletivo da expressão gênica (Li et al., 1993).

- **Atividade Antifúngica**

Um estudo comparativo entre a atividade antifúngica e antibacteriana da β-lapachona revelou uma sensibilidade maior dos fungos ao fármaco em relação às bactérias, no qual foi observada uma boa atividade fúngica em diferentes linhagens estudadas (*Candida albicans, C. parapsilosi, C. tropicallis, Cryptococcus neoformans, Epidermophyton floccosum, Mcrosporum gypseum, Tricophyton interdigitatum, T. mentagrophytes, T. rubrum*), ou seja, a β-lapacona apresentou MCF (mínima concentração fungicida) menor (< 128 μg/mL) quando comparada ao cetocobazol, utilizado como referência. (Guiraud et al., 1994).

A atividade antifúngica in vivo da β-lapachona contra infecção disseminada por *Cryptococcus neoformans* foi investigada por Medeiros e colaboradores (2010). Neste estudo, os camundongos foram divididos em três grupos: um grupo foi tratado com β-lapachona (10 mg/kg), outro grupo foi tratado com anfotericina B (0,5 mg/kg) para realizar a comparação com o fármaco de escolha para o tratamento da doença e um grupo controle que recebeu tampão PBS. O tratamento com β-lapachona reduziu a população de *C. neoformans* 10.000 vezes nos pulmões e no cérebro após a infecção, quando comparado ao grupo PBS ($P<0,05$).

- **Atividade Antiinflamatória**

Moon e colaboradores (2007) investigaram o mecanismo molecular de ação da β-lapachona na expressão do óxido nítrico, da cicloxigenase (COX-2), das prostaglandinas E_2 e das citocinas proinflamatórias (IL-1β, IL-6 e TNF-α) em células de microglia BV2. O tratamento com β-Lapachona inibiu significativamente o óxido nítrico e a liberação de prostaglandinas E_2 na microglia em relação ao controle. Estes resultados sugerem que a β-lapachona pode ser útil como um agente antiinflamatório potencial para atenuar doenças inflamatórias.

- **Atividade Antineoplásica**

Atividade antiproliferativa

Um estudo comparativo da atividade *in vitro* entre a β-lapachona e a camptotecina em células de câncer de mama (MCF-7) demonstrou que no tratamento com a β-lapachona apresentou uma melhor eficácia, visto que a IC_{50} foi 2,5 μM e 5,5 μM para a β-lapachona e camptotecina, respectivamente. No tratamento com camptotecina houve aumento nos níveis de p53/p21. Os autores observaram que não houve a indução das enzimas nucleares p53/p21 no mecanismo apoptótico apresentado pela β-lapachona (Wuerzberger et al., 1998).

Em 2001, Krishnan e colaboradores propuseram um novo mecanismo de ação da β-lapachona, que seria a inibição catalítica irreversível da topoisomerase II, por induzir a dissociação da enzima com o DNA na presença de ATP em células de tumor de nasofaringe.

Gupta e colaboradores (2002) estudaram a atividade β-lapachona *in vitro* em mieloma múltiplo (linhagens U266, RPMI8226 e MM.1S). Foi observado que esta molécula apresentou IC_{50} de 4 a 8 μM. Além disso, foi visto que a β-lapachona induz a apoptose neste tipo de célula. Este estudo é sugestivo da ação terapêutica da β-lapachona para o tratamento do mieloma múltiplo.

Desde a descoberta de sua excelente atividade antineoplásica a β-lapachona tem se destacado na linha de pesquisa de obtenção de novos quimioterápicos. A tabela 1 demonstra a citotoxicidade de β-lapachona em diferentes linhagens de células tumorais.

Tabela 1. Atividade citotóxica da β-lapachona em diferentes linhagens de células tumorais

Linhagem celular	**IC_{50} (μM)**	**Referências**
MCF-7 (câncer de mama)	1,7 3 ~ 4 2,5	Nasongkla et al., 2003; Bentle et al., 2007; Li et al., 1999; Wuerzberger et al., 1998
MDAMB-231 (câncer de mama)	6,6 4	Reinicke et al., 2005 Planchon et al., 1995
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)	7,4 4	Eyong et al., 2008; Li et al., 1999
HL-60 (leucemia promielocítica)	1,65	Moon et al., 2010
KB (tumor nasofaríngeo)	6,6	Krishnan 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)	~ 2 1,1	Li et al., 1999 Bonifazi et al., 2010

Atividade antitumoral

Testes *in vivo* demonstraram que a administração da β-lapachona por via intraperitoneal nas doses de 25 a 50 mg/Kg, reduziu a formação de tumores em camundongos inoculados com células de câncer de ovário. No entanto, quando associada ao taxol, houve uma potencialização no efeito farmacológico, observando uma redução de quase 100% nos nódulos tumorais (Li et al., 1999).

Mecanismo de ação

O mecanismo exato da ação antitumoral da β-lapachona ainda não está bem elucidado, apesar de intensa investigação. No entanto, estudos reportam que sua atuação seria pela inibição da topoisomerase I - atuam na replicação e enovelamento do DNA, impedido a replicação de células tumorais nas fases G0/G1 do ciclo celular. A β-lapachona induz a apoptose (morte

celular programada), por um mecanismo particular, independente da expressão da proteína p53, como visto por Planchon e colaboradores (1995), que investigaram a possibilidade da β-lapachona mediar a apoptose em linhagens de câncer de mama, próstata e leucemia promielocítica. Foram observados resultados significativos nas células de próstata e leucemia promielocíticas, resultando num bloqueio do ciclo celular nas fases G0 /G1, confirmando a não dependência da expressão de p53, diferentemente de outros fármacos utilizados, que também causam apoptose, mas o bloqueio ocorre na fase S do ciclo celular. As células mamárias não apresentaram resultados relevantes na apoptose.

Pesquisas desenvolvidas por Pink e colaboradores (2000), revelaram que a β-lapachona apresentou diferentes mecanismos apoptóticos dependendo da concentração utilizada em células de câncer de mama (linhagens MCF-7 e T47D). Os resultados demonstraram que em baixas concentrações (2 μM) a β-lapachona ativa um mecanismo mediado por caspase, porém com altas concentrações (10 μM) os autores sugerem outro mecanismo apoptótico cálcio-dependente, visto que foi observada a ativação de uma proteína não-caspase e uma protease dependete de cálcio, a calpaína, durante a apoptese mediada pela β-lapachona. Estes resultados podem justificar o fato da β-lapachona apresentar diferentes respostas frente a diversos tipos de tumor.

2.3 Nanotecnologia: conceitos básicos

Em 1959, o físico Richard Feynman em uma palestra no Instituto de Tecnologia da Califórnia intitulada "*There´s plenty of room at the bottom"* sugeriu a manipulação dos átomos como forma de construir novos materiais. Esta palestra foi considerada o marco inicial da nanotecnologia. No entanto, o termo "Nanotecnologia" foi utilizado pela primeira vez pelo professor Norio Taniguchi em 1974 para descrever as tecnologias que permitam a construção de materiais a uma escala de nanômetro (Dúran et al., 2006; Emerich; Thanos, 2006).

A nanobiotecnologia refere-se à fusão de duas abordagens de tecnologias recentes, a biotecnologia e a nanotecnologia, apresentando enormes inovações e potencialidades. A nanobiotecnologia pode ser, portanto, definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico. Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física-médica (diagnóstico), o desenvolvimento de nanofármacos (fármacos encapsulados), além da nanocosmecêutica (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis) (Dúran et al., 2006).

Nanomedicina é a denominação dada à junção da medicina e da nanotecnologia. Em suma, a nanomedicina consiste em usar elementos em escala nanométrica para curar, diagnosticar ou prevenir doenças. As possibilidades de aplicação da nanotecnologia na medicina são imensas. A nanomedicina é um dos ramos mais promissores da medicina contemporânea, retendo boa parte dos esforços científicos na busca de novos tratamentos para doenças como o câncer e doenças infecciosas (Pison et al., 2006; Kagan et al., 2005).

O principal objetivo da nanotecnologia na área farmacêutica é desenvolver sistemas carreadores contendo compostos bioativos, com adequada estabilidade, absorção, liberação controlada e transferência quantitativa e específica do fármaco ao órgão-alvo, como os sistemas de liberação de fármacos (Santos-Magalhães et al., 2000).

2.4 Sistemas de liberação controlada de fármacos

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tem sido alvo de pesquisas desde a década de 70. Em geral, estes sistemas podem ser usados para contornar propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, tais como solubilidade, melhorando assim a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica), além de aumentar a estabilidade de agentes terapêuticos contra a degradação enzimática (Panyam; 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 do fármaco em uma única dose (Figura 4). O que faz com que o medicamento se mantenha na faixa terapêutica, sem oscilações entre os níveis tóxicos e sub-terapêuticos, diferente das formas farmacêuticas convencionais, tais como comprimidos, soluções, suspensões, emulsões, cápsulas, etc. Estas formas caracterizam-se por uma absorção rápida, as quais em muitas situações podem resultar em condições não previsíveis e às vezes, concentrações plasmáticas sub-terapêuticas ou tóxicas, podendo levar a efeitos adversos (Barrat, 2000).

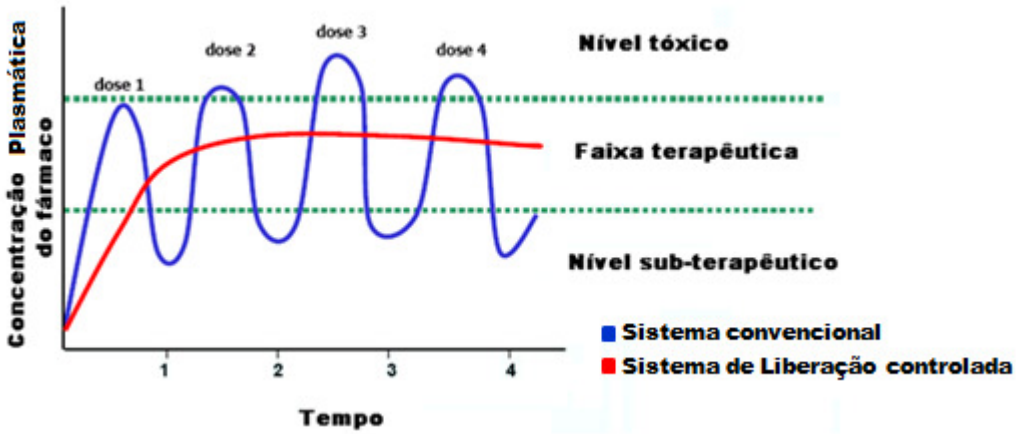

Figura 4. Perfil plasmático de concentração de fármaco em função do tempo a partir de sistema convencional X sistema de liberação controlada (adaptado de Lira et al., 2007).

Existe uma variedade de nanocarreadores descrito na literatura que apresentam diferentes tipos de aplicações. Dentre os principais vetores utilizados como sistemas de liberação controlada, destacam-se os sistemas poliméricos como nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas), micelas poliméricas constituídas de polímeros anfifílicos associados em solução aquosa, além de outros sistemas, como os lipossomas, que são vesículas com núcleo aquoso envolvido por uma bicamada lipídica, nanopartículas lipídicas que são formados a partir de lipídeos sólidos e dendrímeros que representam séries repetidas de compostos macromoleculares que formam uma cavidade em seu interior (Figura 5) (Rawat, 2006).

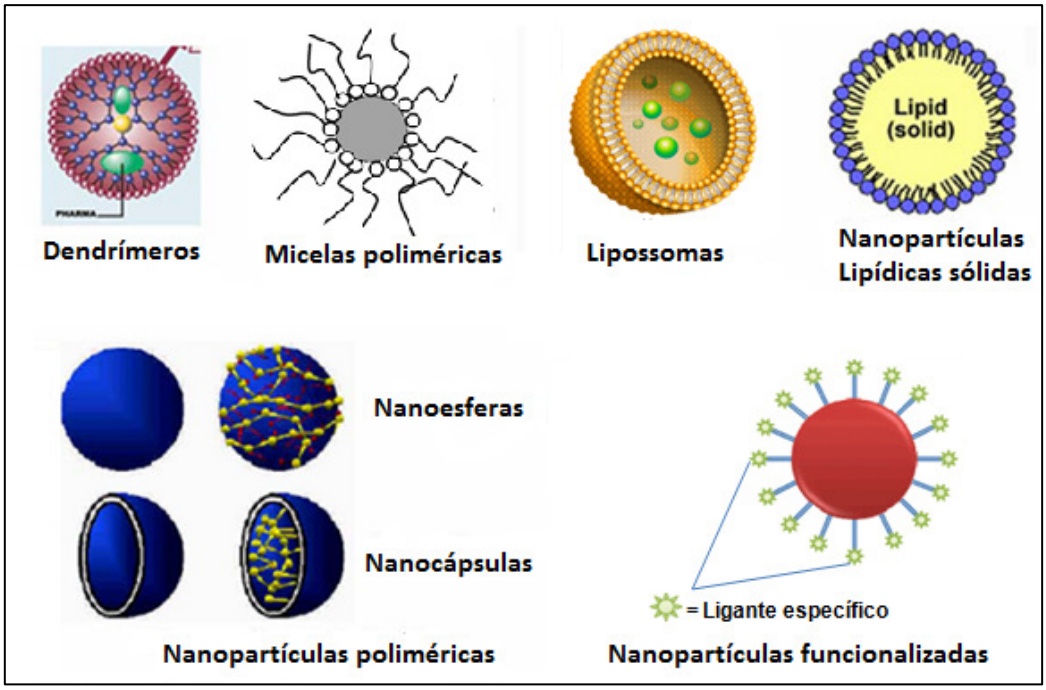

Figura 5. Principais nanocarreadores utilizados como sistemas de liberação controlada (Adaptado de RAWAT, 2006).

2.5 Sistemas nanoparticulados – Nanocápsulas

Vários sistemas de liberação e direcionamento de medicamentos são constantemente desenvolvidos. Entre os principais carreadores destacam-se as nanopartículas, as quais podem ser definidas como sistemas poliméricos com tamanho de 1-1000 nm (1μm) (Roney et al., 2005; Soppimath et al., 2002; Gaur et al., 2000).

Nanopartícula é um termo genérico aplicado à sistemas liberação controlada de fármacos e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas, cada uma com suas características próprias, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 7).

Define-se nanoesferas como sistemas poliméricos em que o fármaco encontra-se disperso ou solubilizado na matriz polimérica, obtendo-se um sistema monolítico, não sendo possível identificar um núcleo diferenciado (Limayem et al., 2004). Enquanto que as nanocápsulass são constituídas por um envoltório polimérico pouco espesso disposto ao redor de um núcleo oco ou de natureza oleosa e estabilizada por um filme interfacial de agentes tensoativos (Soppimath et al., 2001).

Nanocápsulas são potenciais carreadores de fármacos que oferecem vantagem sobre outros sistemas coloidais no que se refere ao confinamento do fármaco no interior da cavidade central,

que confere uma adequada proteção ao princípio ativo frente à degradação no meio biológico, além de permitir a veiculação de moléculas hidrofóbicas (Couvreur et al, 1996).

Comparado com outros carreadores coloidais, as nanocápsulas apresentam maior estabilidade quando em contato com os fluidos biológicos. Além disso, sua natureza polimérica permite a obtenção de propriedades desejadas como a liberação controlada e/ou prolongada de fármacos, além do direcionamento sítio-específico do agente terapêutico através da modificação do design da superfície destes sistemas.

2.5.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas

A caracterização de sistemas coloidais como as nanocápsulas é de extrema importância para a compreensão do comportamento físico-químico e da performance e direcionamento desses sistemas em tecidos, órgão-alvo ou tumores. Portanto, é necessária a aplicação de diferentes métodos que caracterizem bem esses sistemas.

Os parâmetros utilizados para caracterização das nanopartículas são: distribuição do tamanho de partícula, determinação do potencial zeta (carga de superfície), taxa de encapsulação (diferença entre a quantidade de fármaco livre e encapsulado), avaliação morfológica das nanoestruturas, infravermelho, análise térmica através de DSC e cinética de liberação *in vitro* (Magenheim; Benita, 1991; SANTOS-Magalhães et al., 2000).

- Avaliação morfológica: as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET) têm sido empregadas para a avaliação morfológica das nanopartículas (Santos et al., 2005; Schaffazick et al., 2006). A aplicação destas técnicas de microscopia tem o objetivo de avaliar a forma e o tamanho desses sistemas coloidais nanométricos.

- Distribuição do tamanho de partícula: os métodos mais utilizados para determinação do tamanho de partícula consistem em espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento de luz e microscopia eletrônica (MEV e/ou MET). É possível verificar diferença de tamanho dependendo do método empregado, visto que a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto que a espectroscopia de correlação de fótons possibilita a correlação do raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (Hoffmann et al., 1997; Legrand et al., 1999).

- Potencial zeta: representa a carga de superfície das nanopartículas. A carga da superfície das partículas é importante para evitar a agregação em função das colisões e pode ser avaliada

com base nas medidas de potencial zeta. Este parâmetro pode ser influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso. Sua determinação é realizada através de técnicas de eletroforese. (Magenheim; Benita, 1991; Calvo et al., 1996).

- Taxa de encapsulação: é calculada pela diferença entre a quantidade de fármaco total utilizado na preparação das suspensões e a quantidade do fármaco livre que não foi encapsulado nas nanopartículas. Devido ao tamanho e a natureza coloidal desses nanocarreadores a determinação da quantidade de fármaco encapsulado pode ser difícil. Contudo, a taxa de encapsulação é determinada pela separação das nanocápuslas do meio aquoso por ultrafiltração-centrifugação. Nesta técnica é utilizada uma membrana para separar a fase aquosa da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a quantidade de fármaco associado às nanocápsulas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre (Santos et al., 2005; Nguyen et al., 2008; Legrand et al., 1999).

- Cinética de liberação *in vitro*: diferentes métodos são empregados para a avaliação da liberação do princípio ativo *in vitro*, um dos mais utilizados é o método de diálise (Losa et al., 1993; Calvo et al., 1996), que simula o perfil de liberação do fármaco, no qual as condições fisiológicas de temperatura, meio de dissolução, pH e agitação são simuladas a fim de determinar a capacidade das suspensões de liberar o fármaco em função do tempo (Ain et al., 2002).

– Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC): esta técnica pode ser usada para caracterizar o comportamento térmico de diferentes materiais, que está correlacionado com a sua estrutura, propriedades hidrofílicas e estado de associação. Através desta técnica é possível obter o perfil completo da variação de temperatura da energia de Gibbs associada à perda de água em polímeros, com o processo de despolimerização em altas temperaturas. Deslocamentos de picos exotérmicos e endotérmicos estão normalmente associados com interações entre o fármaco e o polímero (Borges et. al., 2005).

– Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR): é um tipo de espectroscopia de absorção, a qual utiliza a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Este método também é proposto para analisar as interações entre polímeros e fármacos, desta forma representa uma importante técnica de caracterização desses materiais. A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem freqüências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso, de *níveis vibracionais*) (Veiga et al., 2006).

2.5.2 Polímeros utilizados na preparação de nanocápsulas

Diferentes abordagens para a fabricação de nanocápsulas consistindo de polímeros biodegradáveis têm sido descrito na literatura. Estes nanossistemas poliméricos podem ser preparadas por uma variedade de polímeros sintéticos ou naturais (Sahoo et al., 2010). Os polímeros naturais constituem a albumina sérica bovina (BSA), a albumina sérica humana (HSA), o colágeno, a gelatina e a quitosana. Estes polímeros têm uso limitado, devido os altos custos e pela variação de pureza, consequentemente, os polímeros sintéticos biodegradáveis vêm recebendo uma significante atenção nesta área (Jain, 2000; Hans; Lowman, 2002).

Entre os principais polímeros sintéticos utilizados na preparação de nanocápsulas estão o poli(ε-caprolactona (PCL), poli (ácido láctico) (PLA), o copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e os poliacrilatos, ambos aprovados pela Agência de Vigilância Sanitária Americana, a *Food and Drug Adminitration* (FDA), para uso em liberação de fármacos, visto que estes polímeros são biodegradáveis, biocompatíveis e facilitam o transporte dos fármacos nos fluídos biológicos, além disso, modificam a farmacocinética e aumentam a biodisponibilidade de muitas substâncias bioativas (Soppimath et al., 2001).

Desde a década de 70, a utilização de polímeros sintéticos biodegradáveis em nanosistemas particulados vem recebendo bastante destaque na nanotecnologia farmacêutica. Vários dispositivos poliméricos como nanopartículas, micropartículas, pellets e implantes têm sido formulados usando estes polímeros para a liberação de uma variedade de classes de fármacos (Jain, 2000).

Pesquisas demonstraram que a liberação do fármaco nesses sistemas poliméricos pode ocorrer através de dois mecanismos: difusão ou erosão (Figura 6), ou mesmo pela associação desses dois processos (Soppimath et al., 2001).

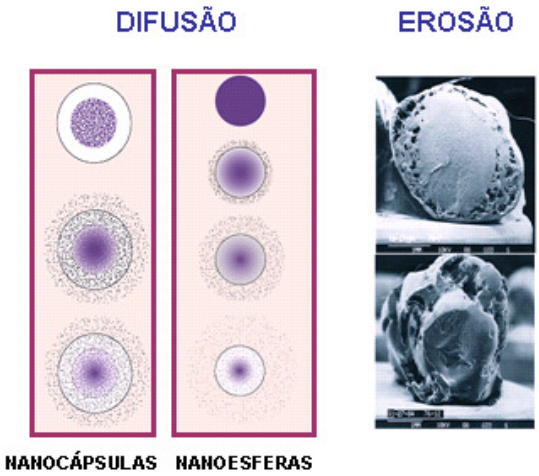

Figura 6. Mecanismo de liberação do fármaco a partir de nanocápsulas e nanoesferas. Fonte: (http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html).

Na difusão, o fármaco encapsulado pela membrana polimérica ou adsorvido na matriz polimérica dissolve e difunde para fora do polímero. A difusão do fármaco através da matriz polimérica, esta condicionada a outras propriedades específicas da molécula, como solubilidade, tamanho da molécula, distribuição do fármaco na matriz polimérica e interações específicas com o polímero (Faisant et al., 2002).

Na erosão, o polímero é degradado naturalmente pela hidrólise das ligações ésteres, liberando o fármaco ou pode sofrer degradação enzimática ou por ambos os processos (Farokhzad; Langer, 2006). Desta forma, há uma liberação continua do fármaco, o qual conduz a um perfil farmacocinético de liberação controlada.

No caso das nanocápsulas, que são sistemas do tipo reservatório, o núcleo contendo o fármaco é recoberto com polímero e a liberação ocorre por difusão do fármaco a partir do núcleo para a membrana polimérica. Teoricamente a liberação do fármaco deveria seguir uma liberação de ordem zero (Soppimath et al., 2001).

2.6 Poli(ε-caprolactona)

Poli(ε-caprolactona) (PCL) é um poliester alifático hidrofóbico (Figura 7) bastante utilizado na preparação de sistemas de liberação controlada, tais como nanopartículas, micropartículas e implantes, pois incorpora uma variedade de bioativos. Possui baixa degradação, sendo ideal pra sistemas de liberação a longo prazo, por períodos maiores que um ano (Sinhá et al., 2004). O PCL começou a ser estudado em 1930 por Van Natta e colaboradores. Sua elevada

permeabilidade e ausência de toxidade permitem que este polímero sintético seja adequado à nanotecnologia farmacêutica (Lince et al., 2008).

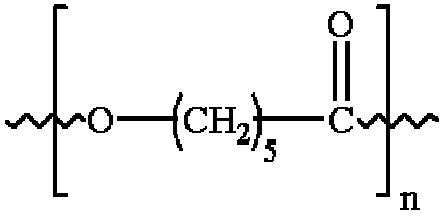

Figura 7. Estrutura química do PCL (Woodruff; Hutmacher, 2010).

Este polímero semicristalino possui temperatura de transição vítrea (Tg) igual a −60 ◦C e sua temperatura de fusão varia entre 59 e 64 ºC. O peso molecular pode variar de 10.000 a 80.000. O PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, benzeno, tolueno, entre outros solventes em temperatura ambiente. Tem baixa solubilidade em acetona à temperatura ambiente, acetato de etila, dimetilformamido e acetonitrila; é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter dietílico (Sinhá et al., 2004).

O PCL pode ser utilizado em combinação com outros polímeros formando "blends", com o objetivo de melhorar a resistência, biodegradação e adesão. Chang e colaboradoes (1986) utilizaram o PCL associado com o PLA para controlar a taxa de liberação de clorpromazina a partir de microesferas.

Nanopartículas de polímeros biodegradáveis são de grande interesse como sistemas de liberação de fármaco. O produto da biodegradação do PCL, o ácido ε-hidroxicapróico, pode ser removido do organismo através do metabolismo pelo ciclo de Krebs (Wu et al., 2000).

Vários fármacos têm sido encapsulados com sucesso em nanopartículas de PCL para sistema de liberação controlada, como pode ser observado na tabela 2:

Tabela 2. Encapsulação de diferentes classes de fármacos em nanopartículas de PCL.

Sistemas	Fármacos	Referências
Nanoesferas e nanocápsulas	Indomentacina	Calvo et al., 1996
Nanoesferas e nanocápsulas	Cartelol	Marchal-Heussler et al., 1993
Nanoesferas	Flurbiprofeno	Gamisans et al., 2000
Nanocápsulas	Primidona	Ferranti et al., 1999
Nanoesferas e nanocápsulas	Aceclofenaco	Alonso et al., 2000
Nanoesferas e nanocápsulas	Diclofenaco	Guterres et al., 2001
Nanoesferas	Anfotericina B	Espuelas et al., 1997
Nanoesferas e nanocápsulas	Ciclosporina	Saez et al., 2000
Nanoesferas	Digitoxina	Guzman et al., 2000
Nanocápsulas	Atovaquone	Cauchetier et al., 2003
Nanoesferas	Tamoxifeno	Chawla ; Amiji, 2002; Shenoy ; Amiji, 2005
Nanocápsulas	Metilpranolol	Losa et al.,1993
Nanoesferas	Isradipina	Leroueil-Le et al., 1998

2.7 Sistemas furtivos

O principal obstáculo ao uso de nanossistemas convencionais na terapêutica é a atuação do sistema fagocitário mononuclear (SFM ou PHS) que promove uma rápida remoção das nanopartículas do organismo. Os macrófagos do SFM, representados principalmente por macrófagos, no baço e células kuppfer, no fígado, são capazes de remover nanopartículas desprotegidas da circulação sanguínea segundos após a administração intravenosa (Gref et al., 1994).

Estes nanocarreadores poliméricos são rapidamente recobertas por proteínas plasmáticas, fenômeno conhecido como opsonização. (Frank; Fries, 1991), desta forma ocorre a fagocitose, que é a captura e eventual destruição ou remoção do material estranho da circulação sanguínea. (Peracchia et al., 1999).

A opsonização de partículas hidrofóbicas em comparação às partículas hidrofílicas ocorre mais rapidamente devido à maior adsorção de proteínas plasmáticas nestas superfícies (Carstensen et al., 1992; Muller et al., 1992). Para evitar o reconhecimento das nanocápsulas

pelo SFM, foram desenvolvidas nanocápsulas furtivas ou de longa circulação (Stealth®) que se tornam menos visíveis aos macrófagos, desta forma ocorre um maior tempo de retenção do fármaco na circulação sanguínea (Barrat et al., 2000).

Estes sistemas furtivos foram desenvolvidos através da adição de moléculas a superfície das nanocápsulas. Atualmente, diversas moléculas são descritas na literatura com o objetivo de impedir interações das nanopartículas com proteínas plasmáticas. A principal molécula utilizada é o polietilenoglicol (PEG), que pode ser incorporada durante a preparação das nanopartículas através do processo de adsorção, ou através da ligação covalente entre o PEG e o polímero constituinte da membrana das nanocápsulas. Desta forma, uma "nuvem" de cadeias hidrofílicas na superfície da nanocápsula é formada o que evita a opsonização e reconhecimento por macrófagos e propicia um longo tempo de permanência no plasma (Mosqueira et al., 2001).

O PEG (Figura 8) é um polímero hidrofílico, biodegradável e biocompatível que é usado na área farmacêutica para aumentar a biocompatibilidade dos materiais que entram em contato com o sangue (Dorati et al., 2007). A natureza hidrofílica e flexível das cadeias de PEG na superfície das nanopartículas permite a essas cadeias adquirir uma conformação mais estendida quando estão livres numa solução. Conseqüentemente, quando as opsoninas e outras proteínas são atraídas para a superfície da partícula por forças de Van der Waals e outras forças, elas encontram as cadeias de PEG na superfície estendidas e começam a comprimi-las. Essa compressão modifica as cadeias de PEG para uma conformação mais condensada e de alta energia. Essa mudança na conformação cria uma força oponente repulsiva que, quando é grande o suficiente, pode completamente equilibrar e/ou sobrepor à força atrativa entre a opsonina e a superfície da partícula (Peppas; Owens, 2006; Gref et al., 2000).

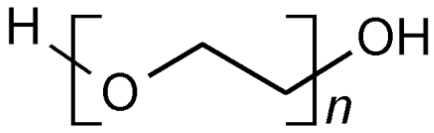

Figura 8. Estrutura química do polietilenoglicol
Fonte: (http://www.pharmacopeia.cn/usp.asp).

Vários trabalhos são descritos na literatura a respeito da utilização do PEG na superfície das nanopartículas. Gref e colaboradores (2000) desenvolveram nanoesferas de diferentes tipos de polímeros (PLGA, PLA e PCL) com o PEG adicionado à superfície destes sistemas, neste

estudo foi observado que o revestimento pelo PEG protegeu as nanoesferas não só contra a adsorção de proteínas do plasma, mas também contra o reconhecimento por parte das células fagocitária.

Mosqueira e colaboradores (2001a) ao estudar a relação entre a ativação do sistema complemento, a captura celular e aspectos físico-químicos da superfície de nanopartículas (nanocápsulas e nanoesferas) modificada com PEG mostraram que nanocápsulas de PLA-PEG ativam o sistema complemento de forma mais eficaz quando comparadas as nanoesferas de PLA-PEG, além de reduzir sua interação com macrófagos de linhagem celular J774A1, porém o porquê desta diferença não foi descoberto. Posteriormente, os autores estudaram a influência do PEG na farmacocinética das nanocápsulas de PLA, no qual foi observado que estes sistemas furtivos reduzem a depuração das nanocápsulas pelos componentes do sangue após administração intravenosa e altera a sua biodistribuição (Mosqueira et al., 2001b).

2.8 Aplicação das nanocápsulas na terapia do câncer

No processo de desenvolvimento do câncer há o aumento da permeabilidade vascular do tecido tumoral, decorrente da má formação da neovasculatura capilar, o que possibilita o extravasamento de nanocarreadores de fármacos com diâmetro médio entre 10 a 700 nanômetros. Desta forma, a aplicação de sistemas carreadores de fármacos vetorizados para o tratamento do câncer pode diminuir a incidência de efeitos tóxicos em relação às células sadias, reduzir a dose do agente quimioterápico e com isso, melhorar a eficácia terapêutica (Soppimath, 2001).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em pesquisas na aplicação de nanopartículas para o tratamento contra diversos tipos de câncer, visto que estes carreadores podem agir como veículos capazes de atingir tecidos ou células tumorais, enquanto protegem o fármaco de inativação durante o seu transporte promovendo uma melhora na eficácia do efeito terapêutico, através do direcionamento das moléculas ativas em seus sítios de ação desejáveis e por ocasionar uma elevada concentração local (Brigger et al., 2002).

A utilização de sistemas nanoparticulados biodegradáveis para liberação controlada de fármacos antitumorais tem apresentado vantagens no aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos sistêmicos, visto que a eficiência da atual quimioterapia do câncer é limitada principalmente pela toxicidade associada com os fármacos antineoplásicos aos tecidos normais (Brigger et al., 2002).

Ao estudar o mecanismo antitumoral do tamoxifeno encapsulado em nanopartículas de PCL por células MCF-7 (câncer de mama), foi observado através de microscopia confocal com fluorescência que uma grande fração da dose administrada de nanopartículas foi captada pelas células MCF-7. Após 1h, o estudo de fluorescência mostrou uma elevada concentração das nanopartículas localizadas no citoplasma e na região perinuclear. Este estudo leva a conclusão que as nanopartículas contendo tamoxifeno, que é um fármaco modulador seletivo do receptor do estrógeno, podem fornecer um benefício terapêutico aumentando a biodisponibilidade da molécula (Chawla; Amiji, 2002).

Estudos realizados por Blanco e colaboradores (2007) reportaram a incorporação da β-lapachona em micelas de PLA-PEG como um agente terapêutico contra células tumorais de três linhagens diferentes H596 (câncer de pulmão), DU-145 (câncer de prostate), MDA-MB-231 câncer de mama) com a expressão da enzima NADP(H)/quinona oxirredutase (NQO1) e células tumorais sem a expressão desta enzima. A NQO1 é uma enzima expressa em uma variedade de tumores e possui participação no processo de ativação da β-lapachona na apoptose, aumentando a citotoxidade (Pink et al., 2000). Os resultados demonstraram que após 2h de incubação, as células tratadas com as micelas de PLGA-PEG contendo β-lapachona aumentaram a citotoxidade em células tumorais que expressam a NQO1 (IC_{50}= 6 μM) quando comparada à atividade em células tumorais que não expressam esta enzima (IC_{50}=15 μM). Este estudo sugere que a citotoxidade da β-lapachona seja NQO1-dependente nas três linhagens testadas e que o desenvolvimento de micelas de PLGA-PEG pode ser uma alternativa para o tratamento de tumores que expressam a enzima NQO1.

Fundamentado no acima exposto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos capazes de viabilizar a administração da β-lapachona em uma formulação que melhore sua solubilidade, bem como, otimize a dose terapêutica e permita uma melhor ação do fármaco em células tumorais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIN, Q.; SHARMA, S.; GARG, S.K.; KHULLER, G.K. Role of poly [DL-lactide-co-glycolide] in development of a sustained oral delivery system for antitubercular drug(s). **International Journal of Pharmaceutics**, v.239, p.37–4, 2002.

ALONSO, M.J.; GARCIA, M.L.; EPSINA, M.; VALLS, O.; EGEA, M.A. Aclofenac-loaded poly-ε-caprolactone nanocapsules. Effects of coadjuvants on morphological properties and drug entrapment. **Bollettino Cheimico Farmaceutico**, v.139, p.114–119, 2000.

ALVES, G.M.C.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P.J.; LEITE, A.C.L.; BRONDANI, D.J.; MEDEIROS, F.P.M.; BIEBER, L, W.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J.B. Purificação e caracterização da β-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v.31, p.413-416, 2008.

BARRAT, G.M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, v.3, p.163-171, 2000.

.

BENTLE, M.S.; REINICK, K.E.; DONG, Y.; BEY, E.A.; BOOTHMAN, D.A. Nonhomologous end joining is essential for cellular resistance to the novel antitumor agent, β-lapachone. **Cancer Research**, v. 67, p.6936–6945, 2007.

BLANCO, E.; BEY, E. A.; DONG, Y.; WEINBERG, B. D.; SUTTON, D. M.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. β-Lapachone-containing PEG–PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. **Journal of Control Release***,* v.122, p.365-374, 2007.

BONIFAZI, E. L.; RÍOS-LUCI, C.; LEÓN, L. G; BURTON, G., PADRÓN, J. M. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 2621-2630, 2010.

BORGES, O.; BORCHARD, G.; VERHOEF, J. C.; SOUSA, A.; JUNGINGER; H. E. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.299, p.155–166, 2005.

BOVERIS, A.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J.F.; STOPPANI, A.O.M. Effect of β-Lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal,** v.175, p.431-439, 1978.

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

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carries. **Journal of Pharmaceutics Science**, v.85, p.530-536, 1996.

CARVALHO, C.E.M.; FERREIRA, V.F.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; HARRISON, WILLIAN. Heterocyclic derivatives from natural occurring naphthoquinones: synthesis, characterization and X-ray structure of beta-lapachone hydrazo compounds. **Dyes and Pigments,** v.52, p. 209–214, 2002.

CAUCHETIER, E.; DENIAU, M.; FESSI, H.; ASTIER, A.; PAUL, M. Atovaquone-loaded nanocapsules: influence of the nature of the polymer on their in vitro characteristics. **International Journal of Pharmaceutics,** v.250, p.273–281, 2003.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p.903-949.

CHAU, Y. P.; SHIAH, S. G.; DON, M. J.; KUO, M. L. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. Free Radical **Biology and Medicine**, v. 24, p. 660-670, 1998.

CHAWLA J.S.; AMIJI, M.M. Biodegradable poly(ε-caprolactone) nanoparticles for tumortargeted delivery of tamoxifen. **International Journal of Pharmaceutics**, v.249, 127-138, 2002.

CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. Study of the drug release mechanism from tyrphostin AG-1295 loaded nanospheres by in situ and external sink methods. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p.401-414, 2002.

COELHO, T. S.; SILVA, R. S.F.; PINTO, A. V.; PINTO, M.C.F.R., SCAINI, C. J.; MOURA, K.C.G., SILVA, P. A. Activity of β-lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and –resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v.1, p 1-5, 2010.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V. AND ROBBINS, S.L. Neoplasia. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V. AND ROBBINS, S.L. (eds.) **Pathologic basis of disease.** 6, 2000.

COUVREUR, P.Vecteurs nanoparticulaires de medicament. In: BURI, P.et al.. Formes pharmaceutiques nouvelles. Aspects technologiques, biopharmaceutiques et medicals. 2 ed. Paris :Lavoisier, cap.14, p.577-611, 1985.

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

D'ALBUQUERQUE, I.L.; MACIEL, M.C.M.; SCHULER, A.R.P.; ARAÚJO, M.C.M.; MACIEL, G.M; CAVALCANTI, M.A.B.; MARTINS, D.G.; LACERDA, A.L. Preparações e primeiras observações sobre as atividades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogas inferiores da série da 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife-UFPE, n.12, p.31-40, 1972.

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

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (Org.). Nanotecnologia: Introdução preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber, 2006, 208p.

EMERICH, D.F.; THANOS, C.G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. **Biomolecular Engineering**, v.23, p. 171–184, 2006.

ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRANCHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.P.; YGARTUA, P. Poly(ε-caprolactone) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.158, p.19–27, 1997.

EYONG, K. O.; KUMAR, PO. S.; KUETE, V.; FOLEFOC, G. N.; NKENGFACK, E. A.; BASKARAN, S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5387-5390, 2008.

FAISANT, N.; SIEPMANN, J.; BENOIT, J. P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n.15, p.355-366, 2002.

FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, p.1456-1459, 2006.

FERRANTI, Y., MAOCHAIS, H., CHABENAT, C., ORECCHIONI, A.M., LAFONT, O. Primidone-loaded poly (ε-caprolactone) nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profile. **International Journal of Pharmaceutics,** v.193, p.107–111, 1999.

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

GAMISANS, F., EGEA, M.A., GARCIA, M.L. Flurbiprofen loaded poly-ε-caprolactone nanospheres: an in vitro release study performed under several conditions. **Journal of Controlled Release**, v.64, p.315–319, 2000.

GAUR, U.; SAHOO, S.K.; DE, T.K.; GHOSH, P.C.; MAITRA, A.; GHOSH, P.K. biodistribuiton of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.202, p.1-10, 2000.

GOIJMAN, S.G.; STOPPANI, A.O.M.; Effects of β-lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Archives Biochemistry and Biophysics**, n.16, p.75-86, 1985.

GREF, R.; COUVREUR, P.; BARRAT, G.; MYSIAKINE, E. Surface-engineered nanopartíles for ligand coupling. **Biomaterials**, v.24, p.4529-4537, 2003.

GREF, R.; LUCK, M.; QUELLEC P.; MARCHAND M.; DELLACHERIE, E.; HARNISCH, S. *'*Stealth*'* corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol *(*PEG*):* influences of the corona *(*PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids Surface B Biointerfaces**, v.18, p.301–13,2000.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; TAKAKI, G.M.C.; MURANDI, F.S.; BUOCHBERG, M.S.Comparison of antibacterial and antifungal activies of lapachol and β-lapachone. **Planta Medica**, n.60, p.373-374, 1994.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SEIGLE-MURANDI, F.; SIMEON DE BUOCHBERG, M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β-lapachone. **Planta Médica**, v. 60, p. 373-374, 1994.

GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; LEBLANC, R.; CATLEY, L.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHAUHAN, D.; MUNSHI, N.C.; ANDERSON, K.C. β-lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Experimental Hematology**, v.30, p.711–720, 2002.

GUTERRES, S.S.; MULLER, C.R.; MICHALOWSKI, C.B.; POHLMANN, A.R.; DALLA COSTA, T. Gastrointestinal tolerance following oral administration of spray dried diclofenac loaded nanocapsules and nanospheres. **STP pharma sciences,** v.11, p.229–233, 2001.

GUZMAN, M.; ABERTURAS, M.R.; RODRIGUEZ-PUYOL, M.; MOLPECERES, J. Effect of nanoparticles on digitoxin uptake and pharmacologic activity in rat glomerular mesangial cell cultures**. Drug Delivery**, v.7, p.215–222, 2000.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.1 p.212-218, 2002.

HOFFMANN, F.; CINATL JR, J.; KABICKOVÁ, H.; CINATL, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v.157, p.189–198, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DO CÃNCER (INCA), em: http://www.inca.gov.br. Acesso em 05/11/2010.

JAIN, R. A. The manufacturing of various drug loaded biodegradble poly(lactide-co-glicolid) (PLGA) devices. **Biomaterials,** n.21, p.2475-2490, 2000.

KAGAN, V. E.; BAYIR, H.; SHVEDOVA, A. A. Nanomedicine and nanotoxicology*:* two sides of the same coin. **Nanomedicine**, v.1, p. 313-316, 2005.

KIM, S.O.; KWON, J.I.; JEONG, Y.K.; KIM, G.Y.; KIM, N.D.; CHOI, Y.H. Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of beta-lapachone in human hepatocarcinoma cells, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,** v.71, p. 2169–2176, 2007.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K.F. Novel mecanisms of DNA topoisomerase iinhibition by pyranonaphtoquinone derivatives eleutherin, α-lapachone and β-lapachone. **Biochemical pharmacology**, v. 60, p. 1367-1379, 2001.

LEE J. H.; CHEONG J.; PARK Y. M.; CHOI Y. H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β-lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research,** v.51, p.553–560, 2005.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **STP pharma sciences**, v.9, p.411-418, 1999.

LEROUEIL-LE, M.V.; FLUCKIGER, L.; KIM, Y.I.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. **Europan Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.46, p.137–143. 1998.

LI, C.J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.R. β-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **The journal of biological chemistry**, v.268, n.30, p.22463-22468, 1993.

LI, C.J.; LI, Y.; PINTO, A.V.; PARDEE, A.B. Potent inhibition of tumor survival in vivo by β-lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **PNAS**, n.96, p.13369-13374, 1999.

LI, C.J.; ZHANG, L.J.; DEZUBE, B.J.; CRUMPACKER, C.S.; PARDEE, A.B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Medical Sciences**, v.90, p.1839-1842, 1993.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; PEREIRA, M.A.; MAIA, M.H.D. Atividade antimicrobiana de alguns derivados do lapachol em comparação com a xiloidona, nova ortho-naftoquinona natural isoladas de extratos do cerne do Pau d'Arco roxo, Tabebuia avellanedae. **Revista do Instituto de Antibióticos, Recife-UFPE**, n.4, p.3-17, 1962.

LIMAYEN, I.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Purification of nanoparticle suspensions by concentration/diafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v.38, p.1-9, 2004.

LINCE, F.; MARCHISIO, D.L.; BARRESI, A.A. Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications **Journal of Colloid and Interface Science**, v.322, p.505–515, 2008.

LISIEUX, R.; JÁCOME, R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MÜLLER, A.; WAGNER, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, v.22, n.2, p.175-177, 1999.

LOSA, C.; ALONSO, M.J.; VILA, J.L.; ORALLO, F.; MARTINEZ, J.; SAAVEDRA, J.A.; PASTOR, J.C. Reduction of cardiovascular side effects associated with ocular administration of metipranolol by inclusion in polymeric nanocapsules. **Journal of Ocular Pharmacology**, v.8, p.191–198, 1993.

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

MARCHAL-HEUSSLER, L.; SIRBAT, D.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Poly(epsilon-capralactone) nanocapsule in cartelol ophthalmic delivery. **Pharmaceutical Research**, v.10, p.386–390. 1993.

MEDEIROS, C.S.; PONTES-FILHO, N.T.; CAMARA, C.A.; LIMA-FILHO, J.V.; OLIVEIRA, P.C.; LEMOS, S.A.; LEAL, A.F.G.; BRANDÃO, J.O.C.; NEVES, R.P. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with Cryptococcus neoformans var. neoformans in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazillian Journal Medical Biological Research**, v. 43, p.345-349, 2010.

MITRA, S., GAUR, U., GHOSH, P.C. & MAITRA, A.N. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal Controled Release**.v. 74: 317-323, 2001.

MOON, D.; CHOI, Y.H.; KIM, N.; PARK, Y.; KIM, G. Anti-inflammatory effects of β-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v.7, p.506-514, 2007.

MOON, D, O.; KANG, C.H.; KIM, M.O.; JEON, Y.J.; LEE, J.D.; CHOI, Y.H.; KIM, G.Y. Beta-lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **Journal of Medicinal Food**, 13, p. 481-8, 2010.

MOSQUEIRA, V. C. F; LEGRAND, P; MORGAT J.-L; VERT, M; MYSIAKINE, E; GREF, R; DEVISSAGUET, J. P; BARRATT, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules **Pharmacological Research.** v. 18, p. 1411-1419, 2001a.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J. L.; VERT, M.; MYSIAKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J. P.; BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. **Pharmaceutical Research.** v. 18, p. 1411-1419, 2001b.

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

NASONGKLA, N., WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY D.; BOMMANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research,** v.20, p.1626-1633, 2003.

NGUYEN, A.; MARSAUD, V.; BOUCLIER, C.; TOP, S.; VESSIERES, A.; PIGEON, P.; GREF, R.; LEGRAND, P.; JAOUEN, G.; RENOIR, J-M. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.347, p.128-135, 2008.

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

OLIVEIRA, AB; RASLAN, D.S.; MIRAGLIA, M.C.M.; MESQUITA, A.A.L; ZANI, C.L.; FERREIRA, D.T.; MAIA, J.G.S.; Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**, v.13, n.4, p. 302-307, 1990.

LIRA, M.C.B. Complexo de inclusão ácido úsnico:β-ciclodextrina: preparação, caracterização e nanoencapsulação em lipossomas. 2007. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco.

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

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

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

PINK, J.J.; PLANCHON, S.M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M.E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D.A. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β-Lapachone cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 275, No. 8, Issue of February 25, pp. 5416–5424, 2000.

PISON, U. U.; WELTE, T. T.; GIERSIG, M, M.; GRONEBERG, D. A. D.A. Nanomedicine for respiratory diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 341–350, 2006.

PLANCHON, S.M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D.T.; HUTSON, P.; CHURCH, D.R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D.A. β-Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53-independent response. **Cancer Research**, v.55, p.3706-3711, 1995.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** v. 29, p. 1790-1798, 2006.

REINICKE, K. E.; BEY,E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS,S. T.; HOPPEL,C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON,G,; BORNMANN,W. G.; SUTTON. D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. Development of β-Lapachone Prodrugs for Therapy Against Human Cancer Cells with Elevated NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1Levels. **Cancer Therapy: Preclinical,** v. 11, p. 3055-3064, 2005.

ROBBINS, S.L.; COTRAN R.S.; KUMAR, V. **Neoplasias**. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 213-68.

RONEY, C.; KULKARNI, P.; ARORA, V.; ANTICH, P.; BONTE, F.; WU, A.; MALLIKARJUANA, N. N.; MANOHAR, S.; LIANG, H.; KULKARNI, A.R.; SUNG, H.W.;

SAIRAM, M.; AMINABHAVI, T.M. *Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain* barrier for Alzheimer's disease. **Journal of Controled Release**, v. 108, p. 193-214, 2005.

SAEZ, A.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M.R. Freeze drying of polycaprolactone and poly(d,l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.379–387, 2000.

SALAS, C.; TAPIA, R.A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYAB, J.D.; MORELLO, A. Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and a- and b-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p.668–674, 2008.

SANTANA, C.F.; LIMA, O.G.; D'ALBURQUERQUE I.L.; LACERDA, A.L.; MARINS, D.G. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'Arco (*Tabebuia avellanedae*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife-UFPE, n.8, p.3-17, 1968.

SANTOS, N. P.; NASCIMENTO, S. C.; WANDERLEY, M. S. O.; PONTES-FILHO, N. T.; SILVA, J. F.; CASTRO, C. M. M. B.; PEREIRA, E. C.; SILVA, N. H.; HONDA, N. K.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepetotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 2, p. 154-160, 2006.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.15, n.5, p.355-361, 2005.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S., PONTES, A., PEREIRA, V. M. W., CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International. Journal of Pharmaceutics**, v.208, p.71-80, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.3, p.562-569, 2006.

SCHAFFNER-SABBA, KARL.; SCHMIDT-RUPPIN, K.H.; WEHRLI, W.; SCHUERCH, A.R.; WASLEYL, J.W.F. β-Lapachone: synthesis of serivatives and sctivities in tumor models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.27, n.8, p.990-994, 1984.

SCHUERCH, A.R.; WEHRLI, W. β-Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase-α. **Journal of Biochemistry,** v.84, p.197-205, 1978.

SHENOY, D.B.; AMIJI, M.M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ε-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v.293, p.261–270, 2005.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-Lapachona e derivados. **Química Nova**, v.26, n.3, p.407-416, 2003.

SILVA-JÚNIOR, E. N.; SOUZA, M. C. B. V.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; GOULART, M. O. F.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; FERREIRA, V. F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor-β-lapachone and nor-α-lapachone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 15, p. 7035-7041, 2007.

SINHÁ, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; Trehan, A. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres:an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278 p.1–23, 2004.

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

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), em: http://www.pharmacopeia.cn/usp.asp. Acesso em 29/12/2010.

TORCHILIN, V.P. Drug targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.11, p.81-91, 2000.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. Formação de detecção dos complexos de inclusão. In: **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica.** 1. ed. Coimbra: MinervaCoimbra, v. 1, p. 52-86, 2006.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v.35, p. 1217:1256, 2010.

WU, C.; JIM, T.F.; GAN, Z.; ZHAO, Y.; WANG, S. A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly(ε-caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. **Polymer**, v.41, p.3593-3597, 2000.

WUERZBERGER, S.M.; PINK, J.J.; PLANCHON, S.M., BYERS, K.L., BORNMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by β-Lapachone. **Cancer Research**, v.58, p.1876-1885, 1998.

Objetivos

3.0 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo deste trabalho consiste em obter e caracterizar nanocápsulas convencionais e nanocápsulas furtivas contendo β-lapachona.

3.2 ESPECÍFICOS

- Encapsular a β-lapachona em nanocápsulas de PCL e PCL-PEG;
- Realizar caracterização físico-química da nanocápsulas;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da β-lapachona encapsulada em nanocápsulas de PCL e PCL-PEG;

Capítulo I

Preparation and characterization of β-lapachone-loaded PCL and PCL-PEG nanocapsules

Barbosa, I. A.[1]; Silva, A. M. M. [1]; Mendonça, E. A. M. [2]; Ferraz, M. S. [1], Santos-Magalhães, N. S. [1]

[1]Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil,
[2]Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Rua Neusa de Sousa Sales s/n, 58058-420, João Pessoa, PB, Brazil

* Corresponding author

Dra. 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.

Phone: + 55–81- 21012501; fax: +55–81- 21012508

E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

The aim of this study was to develop and characterize PCL and PCL-PEG nanocapsules containing β-lapachone. The nanocapsules were prepared using the interfacial deposition of preformed polymer method. The physicochemical parameters determined for the characterization were particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, infrared espectroscopy, differential scanning calorimetry and *in vitro* release kinetics. Nanocapsules showed particle size between 120 and 174 nm with polydispersity <0.3. Surface charge values of -20 and -12 mV for β-lapachone loaded PCL and PCL-PEG nanocapsules, respectively. Furthermore, nanocapsules showed encapsulation efficiency of β-lapachone above 95%. The results of thermal analysis suggested that the drug is dissolved in the internal oily phase of the nanocapsules. The infrared spectrum of nanocapsules showed absorption band around 1727 cm^{-1} corresponding to the carbonyl group present in the PCL molecule. The *in vitro* release of β-lapachone were around 75 and 73% from the PCL-PEG and PCL nanocapsules, respectively, achieved in 24 hours. The results of the present work suggest that the encapsulation of β-lapachone in PCL nanocapsules could provide a strategy to overcome its low water solubility.

Palavras-chave: β-lapachone; nanocapsules; polycaprolactone; polyethylene glycol; physicochemical characterization; *in vitro* release kinetic

1. Introduction

β-lapachone (β-lap) is an *o*-naftoquinone produced from the lapachol isolated from *Tabebuia avellanedae* of the Bignoneaceae family, known as ipê roxo or pau d'arco (Alves et al., 2008) (Fig. 1). β-lap has shown to hold a variety of pharmacological effects (Guiraud et al., 1994; Silva et al., 2003; Li et al., 2000), but the major concern about this molecule is the fact that it presents significant antitumor activity, particularly in a variety of human cancers such as prostate and breast cancers (Woo and Choi, 2006; Pink et al., 2000; Lee et al., 2005).

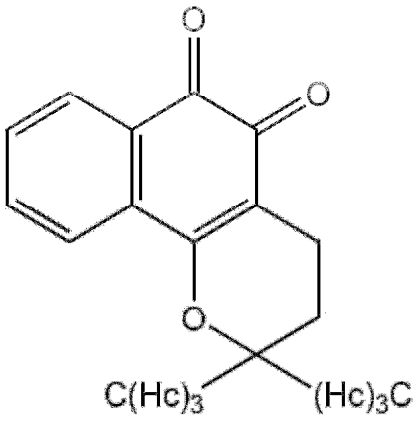

Figure 1. Chemical structure of β-lapachone.

However, the practical use of β-lap remains rather limited due to its low solubility in water (0.16 mM or 0.038 mg/mL), thus limiting its systemic administration and clinical applications (Nasongkla et al., 2003). One strategy to increase its solubility, and consequently its bioavailability, it would incorporate the β-lap in polymeric nanocarriers, such as nanocapsules (Santos et al., 2006). Nanocapsules may be defined as reservoir systems consisting of oil core surrounded by a thin wall of a polymer, which enables the delivery of water-insoluble drugs (Teixeira et al., 2005).

Nanocapsules can be prepared by a variety of synthetic polymers, such as poly (ε-caprolactone) (PCL) and copolymer of lactic acid and glycolic acid (PLGA), both approved by the Food and Drug Adminitration (FDA) for use in drug delivery. These polymers are biodegradable, biocompatible

and facilitate the transport of drugs in biological fluids, in addition, modify the pharmacokinetics and increases the bioavailability of many bioactive substances (Soppimath et al., 2001, Barrat et al. 2000). The encapsulation of antitumor drugs into colloidal nanoparticles can be to overcome non-cellular and cellular mechanisms of resistance and to increase selectivity of drugs towards cancer cells while reducing their toxicity (Brigger et al., 2002).

On the other hand, after intravenous administration, these polymeric nanocarriers are rapidly cleared from the bloodstream. Proteins adsorbed or attached on the surface, promoting the recognition, capture and removal of carriers from the bloodstream by phagocytic cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) (Kupler cells of the liver and spleen macrophages) (Mosqueiraet al .2001b). Structural changes in the surface of these nanoparticulate systems have been proposed in order to decrease the capture by the monophagocyte system. One of these modifications is the addition of the polymer chains of polyethylene glycol (PEG) on the surface of the nanoparticles. The PEG is a hydrophilic polymer, biodegradable and biocompatible, which is used in pharmaceuticals to reduce the interaction of nanocarriers with blood proteins, reducing opsonization and increasing the circulation time and, consequently, therapeutic efficacy (Mosqueira et al., 2001a; Gref, 2000).

In this way, the aim of the present work was the preparation, characterization and the investigation of the release profiles of nanocapsules prepared with PCL and the copolymer PCL-PEG, containing β-lapachone, which could that improves its solubility, as well as optimize the therapeutic dose and allow a better bioavailability of the drug in tumor cells.

2. Materials and methods

2.1 Material

A β-lapachone was provided by the Chemical Pharmaceutical Technology Laboratory of the Department of Pharmacy from UFPE. Poly(ε-caprolactone) (PCL), MW 14 kDa, the diblock

copolymer Poly(ε-caprolactone)-polyethylene glycol (PCL-PEG), soya phosphatidylcholine (Epikuron® 200) and soybean oil were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Poloxamer 188 (Synperonic® F68) was obtained from ICI (France). Monobasic potassium phosphate, sodium hydroxide and HPLC analytical grade solvents were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 Preparation of nanocapsules

Nanocapsules (NC) containing β-lapachone were prepared by the method of interfacial deposition of a preformed polymer by Fessi, et al., 1989. Briefly, about 150 mg of polymer (PCL or PCL-PEG), 150 mg of Epikuron® 200, 100 mg of soybean oil and different amounts of β-lapachone (5 to 15 mg) were dissolved in 25 mL of acetone. This organic phase was slowly introduced into an aqueous solution containing the hydrophilic surfactant poloxamer 188 (0.3% w/v), under magnetic stirring for 20 min. Then, the acetone was removed by evaporation under reduced pressure and the suspension of NC was concentrated to a final volume of 10 ml. NC without drug were prepared according to the same procedure, without the presence of β-lapachone in the organic phase.

2.3 Physicochemical characterization of nanocapsules

2.3.1 Particle size and polydispersity Index

Particle size was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Delsa Nano™ (Beckman-Coulter, Hirakata, Japan). The polydispersity index (PDI), that is an indication of variance in the sample, was calculated using the equation: $PI = \frac{\mu_2}{\overline{\Gamma}^2}$

Where Γ and μ_2 represent the mean decay rate and its variance, respectively. The samples were analyzed in triplicate.

2.3.2 Zeta Potencial

Zeta potential measurements were carried out using a Zetatrac instrument (Microtrac, USA). Samples of nanocapsules were first diluted with ultrapure water. The analysis were performed in triplicate.

2.3.3 HPLC determination of β-lapachone

The determination of β-lapachone content was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) according to a modified isocratic method (Cunha-Filho et. al., 2005). The chromatographic run was performed using a FPLC ÄKTApurifier^{TM} (GE Healthcare, Germany) equipped with UNICORN 4.1 software (Amersham Biosciences) and UV detector (UV-900) operating at 256 nm. A reverse phase C_{18} column (125 Å, 3.9 x 300 mm i.d. particle 5 µm, Waters, USA) was used with a mobile phase of methanol/water (80:20) at a flow rate of 1.5 ml/min. The standard curve of β-lapachone was prepared from a stock β-lapachone solution (0,4 mg/mL), ranging in concentration from 1 to 80 µg/ml. Drug content (mg/mL) was determined after dissolution of nanocapsules in acetonitrile (200 µL of suspension to 5 mL of dichloromethane:methanol (2:3) under ultrasound agitation for 5 min and assayed by HPLC. A sample solution was prepared to a theoretical concentration of 40 µg/ml. This solution was filtered and injected (50 µl) into the HPLC system.

2.3.4 Encapsulation efficiency of nanocapsules

The encapsulation efficiency of β-lapachone into NC was determined after submitting samples (400 µL) to ultrafiltration associated with centrifugation at 9.500 g for 1h using ultrafree® units (Millipore, Billerica, USA). The concentration of β-lapachone in the supernatant was determined by HPLC and the encapsulation efficiency was calculated in relation to the total content of β-lapachone in NC suspension.

2.3.5 Differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal analysis of nanocapsules was performed by differential scanning calorimetry (DSC-50®, linked to software TA-60 ®, Shimadzu, Japan) in a temperature range of 30 ^{o}C to 250 ^{o}C at a heating rate of 10 ° C min^{-1} under a nitrogen atmosphere of 50 mL min^{-1}.

2.3.6 Fourier transformed-infrared spectroscopy (FTIR)

The chemical interaction between the drug and the polymer was analyzed by infrared spectroscopy (VERTEX 70, Bruker, Germany) in the region from 400 to 3000 cm^{-1} with resolution of 4 cm^{-1}. Freeze-dried samples of NC were mixed with KBr (about 5% w/w) and then pressed to a plate before FTIR analysis.

2.4 In vitro release kinetics

The in vitro release profile of β-lapachone from NC was evaluated using dialysis method according to Santos-Magalhães et al (2000) under sink conditions. An aliquot of the suspension of NC was placed to a dialysis bag (cellulose membrane, MW 12.400, Sigma-Aldrich, USA) which was subsequently sealed and inserted into a release medium (phosphate buffer pH 7.4). The system was maintained at a temperature of 37ºC ± 1ºC under agitation. Aliquots of the release medium were collected at intervals of predetermined time. Each aliquot taken from the release medium was replenished with the same volume of buffer solution. The concentration of β-lap released was quantified by UV spectrophotometry at 256 nm. The kinetic assays were performed in duplicate.

4.0 Results e discussion

4.1 Nanocapsules characterization

Nanocapsules containing β-lap were prepared by the interfacial deposition of the preformed polymer, that represents a simple and rapid method of obtaining nanocapsules. The particle size, polydispersity index and zeta potential of conventional and surface-modified nanocapsules containing β-lap are presented in Table 1. PCL and PEG-PCL Nanocapsules showed nanosized particles with a diameter appropriate (<174 nm), characteristic of nanometric colloidal suspensions. The mean diameters of unloaded NC were smaller than β-lap-loaded NC. It seems that the encapsulated of β-lap in the NC suspensions increases the particle size. Similar results were previously reported for PCL nanocapsules containing other drugs that observed diameters between 100 and 300 nm (Michalowski et al., 2004, Lopes et al., 2000). Peppas and Owens (2006) have demonstrated that the mean diameter of nanoparticles has an influence on the biodistribution studies because large particles are rapidly taken up by MPS, thereby reducing their half-lives in the circulatory system. The polydispersity index is indicative of the size distribution. In this study NC showed monodisperse (PI <0.3) (Leite et al., 2007).

Zeta potential results showed that PCL nanocapsules exhibited a negative charge, with values ranging between -20 and -18 mV. The presence of β-Lap did not significantly affect the zeta potential, indicating that the molecules were encapsulated in the internal oil phase of nanocapsules. According to several authors (Calvo et al., 1996, Legrand at al. 1999; Losa et al., 1993), the main components of nanocapsules that can affect the zeta potential are the presence of molecules lecithin or poloxamer in their surface. The lecithins and oils contain in their chemical composition or phospholipids negatively charged, which may confer a negative charge on the surface of nanocapsules. Polymers, especially polyesters such as PCL, provide negative charge due to the presence of terminal carboxylic groups. Poloxamer, a non-ionic surfactant, can to reduce the

absolute value of zeta potential. Previous studies showed that formulations with PEG chains have a reduced zeta potential when compared with conventional nanocapsules (Mosqueira et. al., 2001b; Gref et al., 2000). The reduction of negative charges on the surface of PCL-PEG nanocapsules (-9 to -13 mV) could be due the presence at the surface of the PEG layer that masking the terminal carboxylic groups of PCL and the real zeta potential value (Gref et al., 1995, Hu et al., 2007).

Table 1. Physicochemical characteristics of the nanocapsules preparations

Nanocapsules	**β-lap (mg)**	**Mean Size (nm) ± S.D.**	**PDI***	**Zeta Potencial (mV)**
PCL	-	120.2 ± 2.76	0.258 ± 0.02	-20.42 ± 7.93
PCL	5	153.8 ± 7.88	0.293 ± 0.01	-18.,60 ± 1.88
PCL	10	157.2 ± 0.42	0.249 ± 0.01	-20.52 ± 0.32
PCL	15	154.4 ± 2.92	0.238 ± 0.02	-19.57 ± 1.11
PCL-PEG	-	125.2 ± 3.04	0.212 ± 0.02	-9.59 ± 1.26
PCL-PEG	5	171.2 ± 10.20	0.227 ± 0.06	-12.18 ± 4.61
PCL-PEG	10	169.6 ± 6.61	0.275 ± 0.04	-13.7 ± 0.10
PCL-PEG	15	173.8 ± 2.88	0.208 ± 0.03	-11.93 ± 1.21

Mean±S.D.*: *represents the variation between the different batches.

* PDI: polydispersity index.

According to the results presented in Table 2, the encapsulation efficiency was above 95%. These results demonstrated that the integrity of drug was preserved during the manufacture of the dosage form. Formulations with amounts above 10 mg of β-lap showed the presence of crystals of the drug after 48 hours of preparation, indicating that the maximum drug content was achieved for concentration of 1 mg/ml. The efficiency of lipophilic drug encapsulation into polymeric nanocapsules seems, therefore, to be strongly dependent on drug solubility in the oily phase and/or in the polymer. The high encapsulation efficiency of β-lap in nanocapsules is probably due to its solubility in soybean oil.

Table 2. β-lapachone loading in PCL and PCL-PEG nanocapsules

Nanocapsules	**Ratio β-lap:oil**	**Drug content (%)**	**Encapsulation efficiency (%)**
PCL	1:20	96.04 ± 8.58	95.08 ± 0.06
PCL	1:10	97.07 ± 1.81	97.57 ± 0.02
PCL	1:7	96.83 ± 7.43	97.10 ± 0.25
PCL-PEG	1:20	95.12 ± 0.61	95,49 ± 0.01
PCL-PEG	1:10	97.08 ± 2.04	97.09 ± 0.07
PCL-PEG	1:7	96.81 ± 6.40	96.78 ± 0.06

Mean±S.D.*: *represents the variation between the different batches (n = 3). Polymer amount=150mg

The DSC analysis of β-lapachone (Fig. 2A) shows a sharp endothermic peak that corresponds to the melting point at 155.3 °C, indicating the crystalline nature of the drug. Polymers PCL and PCL-PEG showed endothermic peaks at 63.4 and 58.5 ° C, respectively (Fig. 2B and 2C). Nanocapsules containing β-lap and empty NC showed discrete endothermic peaks near the temperature corresponding to melting points of polymers PCL and PCL-PEG, but these peaks were smaller than those of pure polymers. The endothermic peak of β-lap was not detected in samples of β-lap-loaded nanocapsules, suggesting that the β-lap incorporated in nanocapsules is dissolved in the internal oily phase. The encapsulation of β-lap seems therefore not affect the thermal profile of the PCL nanocapsules.

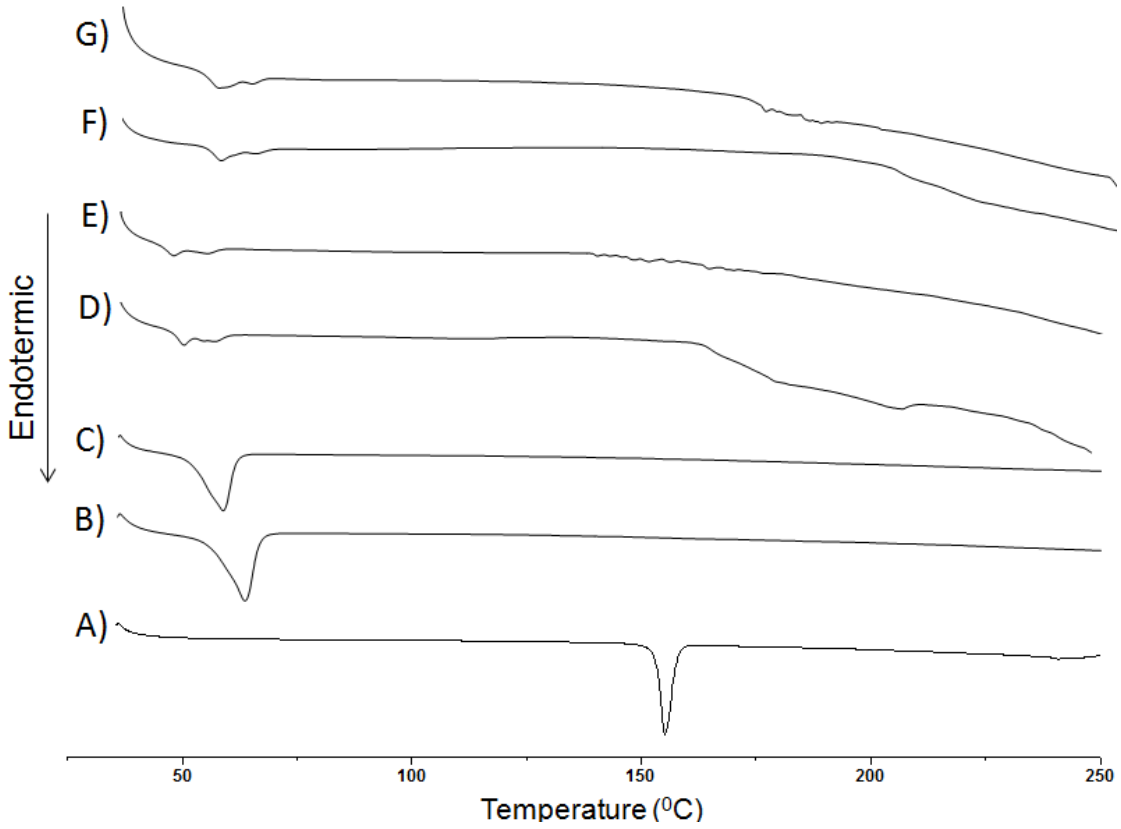

Figure 2. Differential scanning calorimetry curves: A) β-lap; B) PCL; C) PCL-PEG; D) empty PCL nanocapsules; E) β-lap-loaded PCL nanocapsules; F) empty PCL-PEG nanocapsules; G) β-lap-loaded PCL-PEG Nanocapsules.

Fourier transform infrared spectroscopy was used to analyze the interaction of β-lapachone with the polymer nanocapsules of the PCL and PCL-PEG. Figure 3 compares the spectra of β-lap (A), empty PCL nanocapsules and PCL-PEG nanocapsules (B and D) and β-lap-loaded NC (C and E). The absorption band around 1727 cm^{-1} corresponds to the normal vibrations of the carbonyl stretching (C = O) present in the PCL (Elzein et al, 2004). The infrared spectrum of β-lapachone showed characteristic absorption bands of axial deformation of aromatic and aliphatic CH in the regions of 2977 and 2916 cm^{-1}, respectively, and band at 1598.9 cm^{-1} of the axial deformation of the ring C = C aromatic. It was also observed a signal in the region of 1695.3 cm^{-1} assigned to the axial deformation of C = O. According to Alves et al (2008) this absorption band located at a lower

frequency can be explained by the strong influence of the bond angle of the ring containing the carbonyl. The specific absorption bands of β-lap are not observed in the spectra of NC. This fact can be explained because the amount of polymer used to prepare the nanocapsules is 15 times greater than the amount of β-lap.

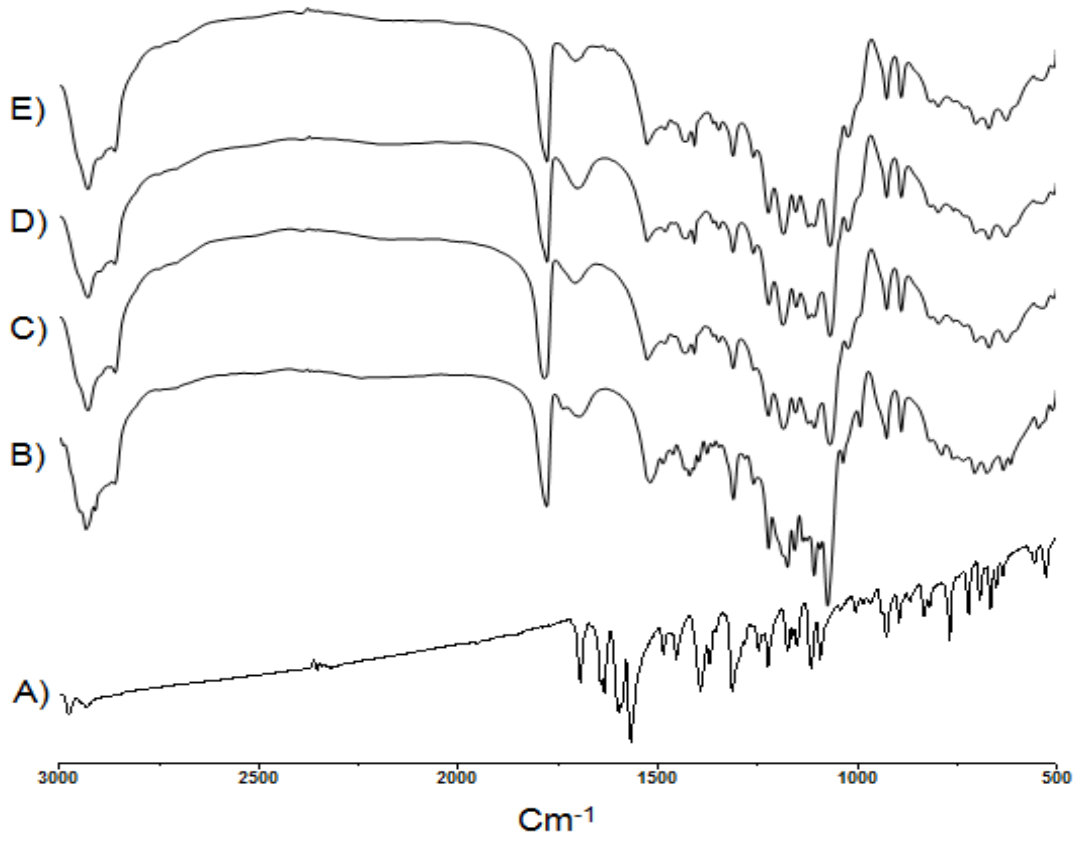

Figure 3. Infrared spectra of: A) β-lap; B) empty PCL nanocapsules C) β-lap-loaded PCL nanocapsules (1 mg/mL); D) empty PCL-PEG nanocapsules; E) β-lap-loaded PCL-PEG nanocapsules (1 mg/mL).

4.2 In vitro release

In vitro kinetics release profile of β-lapachone from PCL and PCL-PEG nanocapsules is shown in Figure 4. The release kinetics was performed under sink conditions, the solubility of β-lap in

phosphate buffer pH 7.4 was 69.27 ±0.80 μg/mL. The maximum amount of β-lap released in the medium did not exceed 80% of the total amount of drug present in the formulations (Figure 4). PCL-PEG and PCL NC promoted a rapid release of β-lap (burst effect) of 40.75 ± 3.23% and 45.52 ± 0.39%, respectively, in the first three hours of the kinetic process.This first stage was followed by a slower release which reached a maximum release of 75.75 ± 1.17% and 73.32 ± 3.43% for stealth and conventional NC, respectively. The rapid drug delivery from PCL nanocapsules was also observed by Ferranti et al. (1999) that studied the kinetic profile of primidone-loaded PCL nanocapsules. The release of primidone was 76.0 ± 1.4% within 8 h.

According to Santos et al., (2005) many factors have an effect on the release of drugs in nanocarrier systems, such as particle size, solubility or affinity of the drug for the oily phase and the polymer, and drug loading are common parameters that govern the kinetic profile of drugs. The PCL and PCL-PEG nanocapsules showed similar release profiles, with a broad variation depending on the nature of the polymers used.

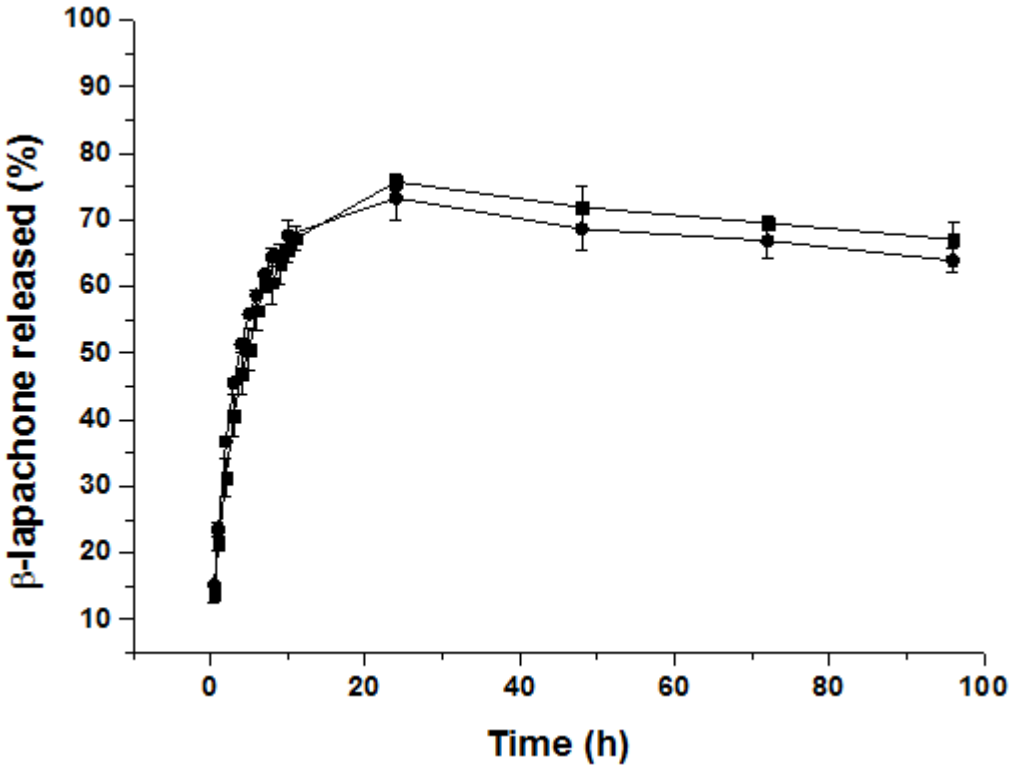

Figure 4. *In vitro* release profile of β-lap from PCL-PEG nanocapsules (■) and PCL nanocapsules (●).

5. Conclusions

In this study, nanocapsules were obtained from PCL and PCL-PEG by the method of interfacial deposition of preformed polymer with suitable particle size, polydispersity and zeta potential. Furthermore, nanocapsules showed high encapsulation efficiency of β-lapachone (≥ 95%).

The study of thermal analysis by DSC suggests that the β-lap is dissolved in the oily core of nanocapsules. Infrared analysis showed the specific absorption bands of β-lap was not observed in the spectra of nanocapsules containing the drug probably due to low percentage compared to the polymeric material.

Through the study of *in vitro* release was obtained the profile of release of β-lap with approximately 77% and 75% of drug release for PCL-PEG and PCL nanocapsules, respectively

after 24 hours. The incorporation of β-lapachone in nanocapsules of PCL and PCL-PEG may be a viable strategy to improve its solubility.

Acknowledgments

Authors thank the Brazilian National Council for scientific and technological development (CNPq) and Pernambuco State Foundation for the Advancement of Science (FACEPE) for financial support.

References

Alves, G. M. C.; Rolim, L. A.; Rolim-Neto, P. J.; Leite, A. C. L.; Brondani, D. J.; Medeiros, F. P. M.; Bieber, L, W.; Mendonça-Junior, F. J. B. 2008. Purificação e caracterização da β-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Química Nova* 31: 413-416.

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

Assis, D. N.; Mosqueira, V. C. F.; Vilela, J. M. C.; Andrade, M. S.; Cardoso, V. N. 2008. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99mTechnetium-fluconazole Nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 349: 152–160.

Barrat, G.M. 2000. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *PSTT* 3: 163-171.

Blanco, E.; Bey, E. A.; Dong, Y.; Weinberg, B. D.; Sutton, D. M.; Boothman, D. A.; Gao, J. 2007. β-Lapachone-containing PEG–PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. *Journal of Control Release* 122: 365-374.

Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews* 54: 631-651.

Calvo, P.; VIla-Jato, J.L.; ALonso, M.J. 1996. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carries. *Journal of Pharmaceutics Science* 85:530-536.

Cunha-Filho, M.S.S., Martínez-Pacheco, R., Landín, M. 2008. Compatibility of the antitumoral β-lapachone with different solid dosage forms excipients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45: 590-598.

Elzein, T.; Nasser-Eddine, M. C.; Delaite, Bistatc, S.; Dumas, P. 2004. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 273: 381–387.

Ferranti, V.; Marchais, H.; Chabenat, C.; Orecchioni, A.M.; Lafont, O. 1999. Primidone-loaded poly-o-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *International Journal of Pharmaceutics* 193: 107–111.

Fessi, H. ; Puisieux, F. ; Devissaguet, J. P. ; Ammoury, N. E.; Benita, S. 1989. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55:1-4.

Gref, R.; Dombb, A.; Quelled, P.; Blunk, T.; Miillerd, R. H. ; Verbavatz, J. M.; Langerf, R. 1995. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16: 215-233.

Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. 2000. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 18: 301–313.

Guiraud, P.; Steiman, R.; Campos-Takaki, G.M.; Murandi, F.S.; Buochberg, M.S.. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activies of lapachol and β-lapachone. *Planta Medica* 60:373-374.

Hu, Y.; Xie, J.; Tong, Y. W.; Wang, C. H. 2007. Effect of peg conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the hepg2 cells. *Journal of Controlled Release n.* 118, p. 7-17.

Lee J. H.; Cheong J.; Park Y. M.; Choi Y. H. 2005. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β-lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacological Research* 51: 553–560.

Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J-P. 1999. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *STP pharma sciences* 9: 411-418.

Leite, E. A.; Grabe-Guimarães, A.; Guimarães, H. N.; Machado-Coelho, G. L.; Barratt G.; Mosqueira, V. C. F. 2007. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sciences* 80: 1327-1334.

Li, Y.; Li, C. J.; Yu, D.; Pardee, A. B. 2000. Potent induction of apoptosis by ß-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. *Molecular Medicine* 6: 1008–1015.

Lopes, E.; Pohlmann, A. R.; Bassani, V.; Guterres, S. S. 2000. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. *Pharmazie* 55: 527-530.

Losa, C.; Alonso, M.J.; Vila, J.L.; Orallo, F.; Martinez, J.; Saavedra, J.A.; Pastor, J.C. 1993. Reduction of cardiovascular side effects associated with ocular administration of metipranolol by inclusion in polymeric nanocapsules. *Journal of ocular pharmacology* 8:191–198.

Michalowski, C. B.; Guterres, S. S.; Dalla Costa, T. 2004. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles**.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35: 1093-1100.

Misra, R.; Sahoo, S.K. 2010. Intracellular trafficking of nuclear localization signal conjugated nanoparticles for cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 39:152-63.

Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Gulik A, Bourdon O, Gref R, Labarre D; Barratt, G. 2001b. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* 22:2967–79.

Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Morgat, J. L.; Vert, M.; Mysiakine, E.; Gref, R.; Devissaguet, J. P.; Barratt, G. 2001a. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharmaceutical Research* 18: 10, p. 1411-1419.

Nasongkla, N., Wiedmann, A. F.; Bruening, A.; Beman, M.; Ray D.; Bommann, W. G.; Boothman, D. A.; Gao, J. 2003. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. *Pharmaceutical Research* 20: 1626-1633.

Ourique, A.F.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Beck, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of Pharmaceutics* 352: 1–4.

Peppas, N. A.; Owens, D. E. 2006. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307: 93–102.

Pink, J. J.; Planchon, S. M.; Tagliarino, C.; Varnes, M. E.; Siegel, D.; Boothman, D. A. 2000. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β-Lapachone cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 8, p. 5416–5424.

Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Silva, J. F.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S. 2005. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 15: 5, p.355-361.

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

Santos-Magalhães, N. S., Pontes, A., Pereira, V. M. W., Caetano, M.N.P. 2000. Colloidal carriers for benzantine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of pharmaceutics* 208:71-80.

Silva, M.N.; Ferreira, V.F.; Souza, M.C.B.V. 2003. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β-lapachone and derivatives. *Quimica Nova* 26:*407-416.*

Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 70: 1-20.

Teixeira, M.; Alonso, M.J.; Pinto, M.M.M.; Barbosa, C.M. 2005. Development and Characterization of PLGA Nanospheres and Nanocapsules Containing Xanthone and 3-Methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 59, 491-500.

Woo, H. J.; Park, K. Y.; Rhu, C. H.; Lee, W. H.; Choi, B. T.; Kim, G. Y.; Park, Y. M., Choi, Y. H. 2006. Beta-lapachone, a quinone isolated from Tabebuia avellanedae, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. *Journal of Medicinal Food* 9: 161–168.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- Nanocápsulas de PCL e PCL-PEG foram obtidas pelo método de deposição interfacial com adequado tamanho de partícula e formulações monodispersas (PDI < 0,3);

- As nanocápsulas de PCL e PCL-PEG apresentaram carga de superfície negativa. Houve uma redução das cargas negativas na superfície das nanocápsulas de PCL-PEG, que está associada ao mascaramento dos grupamentos carboxílicos terminais do PCL pelas moléculas de PEG;

- O estudo de análise térmica através de DSC sugere que a β-lapachona está solubilizada no núcleo oleoso das nanocápsulas.

- A banda de absorção específica da β-lapachona não foi visualizada no espectro de absorção na região do infravermelho das nanocápsulas contendo o fármaco, provavelmente devido ao baixo percentual do fármaco em relação ao material polimérico.

- O perfil cinético de liberação da β-lapachona a partir das nanocápsulas de PCL e PCL-PEG demonstrou uma liberação rápida do fármaco até as primeiras 8 horas do processo cinético, seguida lenta. O perfil de liberação apresentou-se semelhante para as nanocápsulas de PCL-PEG e PCL sugerindo que liberação do fármaco não foi afetada pela natureza do polímero;

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