

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

Morgana Maria Souza Gadêlha

**ENCAPSULAÇÃO DO POLISSACARÍDEO
PROVENIENTE DE *Anacardium occidentale* EM
LIPOSSOMAS E APLICAÇÃO BIOLÓGICA.**

RECIFE, 2001

MORGANA MARIA SOUZA GADÊLHA

**ENCAPSULAÇÃO DO POLISSACARÍDEO
PROVENIENTE DE *Anacardium occidentale* EM
LIPOSSOMAS E APLICAÇÃO BIOLÓGICA.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadoras:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães
Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

RECIFE, 2001

Gadêlha, Morgana Maria Souza

Encapsulação do polissacarídeo proveniente de *Anacardium occidentale* em lipossomas e aplicação biológica./ Morgana Maria Souza Gadêlha– Recife: O Autor, 2001.

67 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Lipídios 2. *Anacardium occidentale* 3. *Schistosoma mansoni* I. Magalhães, Stela Santos II. Carneiro Leão, Ana Maria dos Anjos III. Título**

572.57

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-066

ATA DO DIA DA DEFESA

Ata de defesa de dissertação da Mestranda Morgana Maria Souza Gadelha, realizada em 31/08/2001, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 31 de agosto do ano de 2001 foi aberto, no Auditório Prof. Manoelito Dias - Depto de Bioquímica/EEB/UFPE, o ato de defesa de dissertação de Morgana Maria Souza Gadelha, aluna do curso de Mestrado em Bioquímica/EEB/UFPE. Iniciando os trabalhos, a Profa Maria do Paz Corvelho da Silva (coordenadora do curso supra citado) fez a apresentação da candidata, de sua orientadora Profa. Dra. Nereide Stela Souza Magalhães, como orientadora interna e de Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Corneio Leão, como orientadora externa e da Comissão Examinadora composta pelos professores doutores Nereide Stela Souza Magalhães, na qualidade de Presidente, Maria dos Anjos Corneio da Cunha, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, ambos do Depto. de Bioquímica/EEB/UFPE e Euzeldio Soares Tabares do Couto, do Depto. de Formação/UFERN. Deixou a Profa. Maria do Paz passar a palavra para a Sra. Presidente que convidou a candidata para a apresentação de sua dissertação intitulada "Escarificação do Polimerizado Proveniente de Ammonium occidentale (P-IV) em lipossomas de Aplicação Biológica", e informou que de acordo com o Regulamento Interno do Curso, a candidata dispõe de 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de perguntas para cada examinador juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas da Comissão Examinadora, será de 30 (trinta) minutos. Terminada a explanação,

e comemorou o referido tempo, que a mesa
procedeu em 43 (quarenta e três) minutos, a Sra.
Presidente passou a palavra para o Prof. Dr.
Eduardo Sócrates Taboro Couto que agradeceu ao
comité em requête realizou sua oratória. Ao final
de sua oratória, o referido proferiu seu parecer
e deu algumas sugestões. Daí a Sra. Presidente deu
a palavra para o Prof. Dr. Maria do Graça Carne-
lo Cunha que agradeceu ao comité em requête
realizou sua oratória. Ao final de sua oratória, a
referida proferiu seu parecer, deu algumas
sugestões e parabenizou a candidata e sua orientadora
na pelo trabalho. Daí a Sra. Presidente passou a pala-
vra para o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Cordeiro Simão
que agradeceu ao comité em requête realizou sua oratória.
Ao final da oratória, o referido proferiu seu parecer
e deu algumas sugestões e parabenizou
a candidata e sua orientadora. Com a palavra,
a Sra. Presidente, na qualidade de orientadora, fez alguns
recomendações, em requête suspendeu o prazo para o
julgamento pela Comissão Examinadora, a qual se
reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários,
a Comissão Examinadora decidiu, por unanimidade,
conceder a menção "Aprovado com Distinção" de acordo com
o Regulamento do Curso, de acordo a Resolução nº 03/98 do
Conselho Coordenador de Ensino, Pesquisa e Extensão do UFPB
Notas suas havendo o tratar, haverá a presente ata, que
vai assinada por seu Secretário e duas
pessoas de Comissão Examinadora. Recife, 31/08/2008

E.T.: Onde se lê: Prof. Dr. Eduardo Sócrates Taboro de Couto,
leia-se Prof. Dr. Eduardo Sócrates Taboro de Ego.

Onde se lê: sua orientadora, leia-se: suas orientadoras
Onde se lê: ... sua condicium venentale (P-JV), leia-se:

o peçonha *Synaldisia* ocidental. Recife, 31 de Agosto de 2001



Jose Milton de Oliveira
Secretário do Curso de
Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE

José Milton de Oliveira
Graciele Rêgo
S. S. T. Ass. P. O. U. S. A.
H. M. M.

MENSAGEM:

“Todo conhecimento está dentro de você.
Informações você recebe de fora,
porém compreensão delas?
É do íntimo.
O que coloca vida e luz dentro delas,
é a sua própria luz interna”.
(Gupta)

DEDICATÓRIA:

Aos meus pais:

Raul e Terezinha Gadêlha.

Ela, no momento ao meu lado fisicamente, e ele durante este trabalho em um plano superior... mas ambos a cuidar, cada um com as possibilidades atuais, para que eu seja plenamente feliz.

Este momento é merecidamente dividido com eles.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

DEUS: fonte do conhecimento verdadeiro!

Agradeço pela sua companhia constante...

AGRADECIMENTOS:

A Chiara Lubich, porque sem sua luz esta conquista teria representado bem menos.

A todos aqueles que me auxiliaram, meu sincero agradecimento... Sozinha, eu poderia ter realizado algo parecido, mas nunca teria sido a mesma experiência.

À Prof^a Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães, pela orientação dada durante este trabalho; levarei para sempre algumas lições de vida que, com ela, obtive neste período.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, pela confiança, orientação e principalmente pela amizade desenvolvida. Para sempre a terei como uma referência profissional.

À Prof^a. Dr^a. Elizabeth Malagueño, minha eterna professora, pela orientação constante que extravasa a esfera profissional... pelo carinho, apoio e conselhos valiosos, que já fazem parte da minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Limongi Lopes, por sua valiosa ajuda nas análises histopatológicas.

À Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento, por sua valiosa contribuição científica e também por ceder as instalações do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos para realização de diversos experimentos; À Maria, Suzete e Carla, meu agradecimento especial.

A todos que fazem o Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA), principalmente aos amigos da Imunologia e aos meus queridos colegas do Grupo de Sistema de Liberação Controlada.

As minhas parceiras profissionais: Lilian Calado e Noêmia Santos, porque sem elas não teria sido possível realizar este trabalho.

À minha irmã Mércia, pela sua ajuda com a formatação deste trabalho.

A Andréia Teixeira, por sua contribuição no decorrer deste trabalho e, principalmente, pela amizade que construímos.

À minha família, pelo incentivo incessante, além da vibração a cada conquista.

Às minhas eternas amigas da Biomedicina: Patrícia Arruda e Ana Cecília Cavalcanti, que atravessaram comigo mais esta etapa e que seguirão comigo (tenho certeza!) em tantas outras fases da minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF - Ácido Fosfatídico.
BH - Cepa de *Schistosoma mansoni* proveniente de Belo Horizonte.
CH - Colesterol.
DB - Grau de ramificação.
d. p. - Desvio padrão
EP - Fosfatidilcolina de soja.
Fn - Formulação (n = n^o da formulação).
IFN - Interferon.
IL - Interleucina.
i.p. - Via intraperitoneal.
LUV - Vesículas grandes unilamelares.
M - Média
M. O. - Microscopia óptica.
MLV - Vesículas grandes multilamelares.
MRB - Modificadores da Resposta Biológica.
NK - Linfócito *Natural Killer*.
PBS - Solução Salina Tamponada.
PC - Fosfatidilcolina.
P JU - Polissacarídeo de *Anacardium occidentale*
Ppt - Precipitado.
SRE - Sistema Retículo Endotelial.
S-180 - Sarcoma 180
s.c. - Via subcutânea.
SA - Estearilamina.
SUV - Vesículas pequenas unilamelares.
TE - Taxa de encapsulação.
Tc~ - Temperatura de transição de fase.
TNF. - Fator de Necrose Tumoral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> .	18
Figura 2 Representação esquemática dos procedimentos envolvendo o Sarcoma	28
180	
Figura 3 Representação esquemática dos procedimentos <i>in vivo</i> envolvendo o <i>S.</i>	34
<i>mansoni</i> .	
Figura 4 Avaliação do pH das formulações contendo p JU.	39
Figura 5 Teor de P JU encapsulado em lipossomas.	40
Figura 6A, 6B, 6C Número médio de lesões histopatológicas observadas em	48
fígado, intestino e baço de camundongos infectados pelo <i>S. mansoni</i> . A,	
Figado; B, Intestino; e, C Baço.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Formulações dos lipossomas.	27
Tabela 2 Avaliação da estabilidade das formulações contendo PJU	36
Tabela 3 Estabilidade macroscópica das formulações de lipossomas contendo PJU.	38
Tabela 4 Atividade anti-tumoral <i>in vivo</i> do p JU livre e encapsulado em lipossomas.	41
Tabela 5 Eliminação média de ovos de <i>S. mansoni</i> após o tratamento com PJU livre e encapsulado em lipossomas.	44
Tabela 6 Efeito do tratamento com PJU livre e encapsulado em lipossomas sobre os vermes adultos de <i>S.mansoni</i> .	45

RESUMO

Vários polissacarídeos têm sido classificados como modificadores da resposta biológica. Seus efeitos biológicos especialmente suas atividades anti-tumoral e anti-microbiana, são consideradas como uma consequência deste fato. O heteropolissacarídeo extraído da goma de *Anacardium occidentale* (P JU) é composto por Gal, Ara, Glc, Rha, Xyl e Glc A, em uma proporção molar de 82:4:6:2:1:5 e sua atividade anti-tumoral *in vivo*, e *in vitro* foi previamente demonstrada. A encapsulação em lipossomas tem sido utilizada para potencializar a atividade biológica de fármacos. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma formulação de lipossomas contendo P JU e avaliar seu efeito frente ao sarcoma I80 e à infecção experimental pelo *S. mansoni*. Quinze formulações foram desenvolvidas de acordo com o método de evaporação de fase reversa modificado proposto por Amselem *et al.*, 1990. Estas foram submetidas a testes de estabilidade acelerada e em longo prazo. A taxa de encapsulação do P JU foi calculada através do método de fenol sulfúrico. Obteve-se uma formulação estável positivamente carregada, constituída por fosfatidilcolina, colesterol e estearilamina (7:2:1). A fase aquosa utilizada foi P JU 2,5 mg.mL⁻¹, em solução tampão fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,4. Esta formulação demonstrou estabilidade até 90 dias. A toxicidade *in vivo* foi avaliada tratando-se camundongos (n=10/grupo), via i.p., com P JU livre e encapsulado usando NaCl 150 mM e lipossomas vazios como controles. A análise histopatológica do fígado e do baço foi realizada e nenhuma alteração foi observada. A atividade anti-tumoral *in vivo* foi testada em camundongos usando o Sarcoma 180 como modelo. Em dose única, via i.p., o P JU livre e encapsulado em lipossomas (100 mg.Kg⁻¹) não inibiu o crescimento do tumor. Estas preparações foram também testadas frente a camundongos infectados pelo *S. mansoni* por via caudal utilizando-se 150 cercárias/animal e tratados com dose única, i.p., das formulações (NaCl 150mM, lipossomas vazios, P JU livre e encapsulado em lipossomas), 24 horas e no 42º dia após a infecção. A evolução temporal da infecção foi avaliada pela presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes de acordo com o método de Kato-Katz, após o 38º dia. Os animais foram sacrificados no 56º dia e a perfusão pelo sistema porta-hepático foi realizada. O P JU livre reduziu a eliminação de ovos em 19,6 e 58%, para o tratamento realizado 24 h e no 42º dia após a infecção, respectivamente. O P JU encapsulado em lipossomas causou uma redução de 82,1 e 88,1%, para as mesmas condições experimentais respectivamente. Estes resultados sugerem que P JU encapsulado em lipossomas pode ser uma nova possibilidade terapêutica para o tratamento da infecção pelo *S. mansoni*, considerando sua estabilidade e ausência de toxicidade *in vivo*.

Palavras-chave: *S. mansoni*, *Anacardium occidentale*, lipossomas.

ABSTRACT

Many polysaccharides have been classified as biological response modifiers. Their biological effects, namely antitumoral and antimicrobial activities, are said to be consequence of this factory. The heteropolysaccharide extracted from the *Anacardium occidentale* gum (PJU) is composed by Gal, Ara, Gle, Rha, Xyl and Glc in molar ratio 82:4:6:2:1:5. It has previously shown in vivo and improve biological activity of drugs. The aim of the present work encapsulation has been used to liposomes-loaded and their effects against S-180 tumors and experimental *S. mansoni* infection. Fifteen formulations were developed according to the reverse phase method modification by Amselem et al., (1990) and submitted to accelerated and long-term stability tests. The PJU content was estimated by phenol sulphuric method. The results lead on one stable positive charged liposome formulation, using phosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine, in a molar ratio 7:2:1 showed to be stable until 90 days. In vivo toxicity was evaluated by treating mice (n=10/group) with free and encapsulated PJU, using 150 mM NaCl and empty liposomes as controls. Histopathological analysis on liver and spleen was performed. No histopathological alteration was observed in the cells. In single i.p. dose, free and liposome-loaded PJU (100 mg.kg⁻¹) promoted on growth inhibition of the tumor. These preparations were also tested against experimental infection by *S. mansoni*. Mice were infected by *S. mansoni* (caudal infection, 150 cercariae/mice) and treated with a single i.p. dose of the formulations (150mM NaCl, empty liposomes, free and liposome-loaded PJU, at 100 mg.kg⁻¹) 24 h and 42 th days after infection. PJU biological activity was evaluated by the presence of *S. mansoni* eggs into faeces according to Kato-Katz method since 38 th day after infection. Animals were killed at 56 th day, and porta-hepatic system perfusion was then undertaken. Free PJU reduced egg elimination in 19.6 and 58%, for treatments undertaken at 24 hours and 42 days after infection (when worm eggs were detected in faeces), respectively. Liposome-encapsulated PJU improved these performances (reduction of 82.1 and 88.1 %, for the same experimental conditions, respectively). One can observe the efficacy in the proposed therapy. These results suggest that liposomes containing PJU may be a new therapeutic possibility for treatment of *S. mansoni*, considering their stability and absence of in vivo toxicity.

Keywords: *S. mansoni*, *Anacardium occidentale*, liposomes.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 LIPOSSOMAS

Quando um medicamento é administrado, independente da via pela qual isso ocorre, para que o objetivo terapêutico seja obtido, é necessário que ocorram alguns processos orgânicos: absorção, metabolismo, biotransformação e eliminação (PUSIEUX & ROBLOT-TREUPEL, 1989). Nos regimes terapêuticos convencionais, muitas vezes, uma grande quantidade do fármaco que é administrado não exerce ação, sendo excretado. Devido a isto, novas formas farmacêuticas vêm sendo continuamente propostas, a exemplo dos sistemas de liberação controlada, os quais conseguem tornar os agentes químicos ativos disponíveis para um alvo, com taxas de liberação e duração adequadas para produzir o efeito desejado.

Entre os sistemas para liberação controlada de fármacos, encontram-se os lipossomas que foram utilizados pela primeira vez como modelo de membrana para avaliação de transporte iônico (BANGHAM, 1965). Posteriormente, foram propostos para carrear enzimas que seriam usadas no tratamento de distúrbios da capacidade armazenamento dos lisossomos (GREGORIADIS, 1973). A partir de então, os lipossomas têm sido propostos e investigados como forma de transporte efetivo de fármacos e outros princípios ativos, com novas perspectivas para o aumento da eficácia e redução dos efeitos colaterais.

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas formadas por bicamadas concêntricas, geralmente constituídas por fosfolipídios, que possuem um compartimento aquoso interno, permitindo a incorporação de fármacos hidrofílicos em seu interior ou, por outro lado, a adsorção de fármacos lipofílicos entre suas bicamadas de fosfolipídios (LASIC & MARTIN, 1989; BLUME & CEVC, 1993).

Os lipossomas podem ser classificados em três grupos, de acordo com seu tamanho e o número de camadas lipídicas constituintes (PUSIEUX, 1983):

- a) Vesículas grandes multilamelares (MLV): formadas por camadas lipídicas intercaladas por compartimentos aquosos. Diâmetro entre 400 e 3500 nm.
- b) Vesículas grandes unilamelares (LUV): constituídas por uma única bicamada que encerra uma grande cavidade aquosa. Diâmetro entre 200 e 100 nm.
- c) Vesículas pequenas unilamelares (SUV): são os menores lipossomas, formados por uma única bicamada e possuem um pequeno compartimento aquoso. Diâmetro entre 2 e 50 nm.

Usualmente, os lipossomas são compostos por fosfolipídios, fosfoglicerídeos esfingolipídeos, bem como por seus produtos de hidrólise, sendo mais comum a utilização de colesterol, fosfatidilcolina e fosfolipídios carregados negativa ou positivamente.

Quando outros sistemas de administração de drogas são comparados aos lipossomas, observam-se vantagens como biodegradabilidade, solubilização do fármaco liberação controlada, captura pelo Sistema Retículo Endotelial (SRE) e vetorização a sítios específicos através da incorporação de sinais moleculares como anticorpos monoclonais hormônios ou glicolipídeos (VEMURI & RHODES, 1995; RAVILY *et al.*, 1997; JAMSHAIID *et al.*, 1988).

Considerável atenção tem sido dispensada ao uso de lipossomas para terapia dos processos neoplásicos (OUSSOLEM *et al.*, 1998). A encapsulação de drogas quimioterápicas tem na maioria dos casos, o objetivo de minimizar seus efeitos colaterais, demonstrando experimentalmente uma marcante redução dos efeitos tóxicos e aumento da eficácia terapêutica. Este efeito parece ser ocasionado pela acumulação intensa das drogas encapsuladas em lipossomas de longa circulação nos tecidos tumorais e também pelo direcionamento dos mesmos ao tumor.

Algumas das tentativas de utilização dos lipossomas frente a neoplasias não obtiveram resultados satisfatórios, principalmente, porque os lipossomas são rapidamente reconhecidos pelo SER e removidos da circulação através dos macrófagos (TORCHILLIN *et al.*, 1994). A observação desta característica particular fez com que surgissem algumas pesquisas no sentido de tentar a encapsulação de agentes modificadores da resposta biológica (MRB). Resultados satisfatórios demonstraram que a interação entre os lipossomas e o sistema imune pode em alguns casos, gerar um aumento da resposta celular e melhorar a eficácia terapêutica (KILLION & FIDLER, 1998; TURANEK *et al.*, 2001).

Este aspecto interativo dos lipossomas com macrófagos sugere sua utilização como veículo ideal para o tratamento de diversas patologias, onde os MRB podem ser utilizados terapêuticamente.

Assim, continuam em evidência linhas de pesquisa para novas drogas antineoplásicas e sua avaliação em vários sistemas tumorais e culturas de tecidos, com o objetivo de selecionar compostos mais efetivos (SIKIK, 1999; HUSSAR, 2000 a e b; ASLANI *et al.*, 2000).

1.2 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A esquistossomose é uma endemia parasitária presente em várias partes das Américas e África causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, o qual apresenta várias espécies adaptadas ao parasitismo, como o *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* e o *S. mansoni*, responsável por esta parasitose no Brasil (PESSÔA & MARTINS, 1988)

Apresenta-se como uma doença importante do ponto de vista da saúde pública, pois de acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem 200 milhões de pessoas infectadas e 600 milhões estão sob o risco potencial de contrair a infecção em todo mundo (WHO, 1994). Inquéritos do Ministério da Saúde e Fundação Nacional da Saúde ressaltam estes dados ao indicar o coeficiente de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias na ordem de 24,81 e 25,06 óbitos por 100.000 habitantes, para o Brasil e para Região nordeste, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

No Brasil, estima-se que existam entre 5 e 6 milhões de indivíduos infectados. As áreas endêmicas importantes estão compreendidas em uma faixa que abrange as regiões orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco (Zonas do litoral e Mata, ao Agreste e do Sertão), a quase totalidade dos Estados de Alagoas e Sergipe, grande parte da Bahia e de Minas Gerais e a Zona Serrana do Espírito Santo (Rey, 1992).

Acredita-se que a esquistossomose mansônica penetrou no Brasil através do tráfico de escravos e com os imigrantes orientais, entre os quais foram detectados numerosos indivíduos parasitados pelo *S. japonicum* e *S. haematobium*. Entretanto, apenas o *S. mansoni* se fixou, seguramente pela existência de hospedeiros intermediários adequados e condições ambientais semelhantes às da região de origem (NEVES *et al.*, 2000).

O ciclo evolutivo (Figura 1) do *Schistosoma mansoni* compreende dois estágios distintos: o primeiro acontece em caramujos do gênero *Biomphalaria*, caracterizando o hospedeiro intermediário. O outro estágio é mantido por seu principal hospedeiro definitivo, o homem. É através das fezes do homem infectado que saem os ovos do *S. mansoni* - cada fêmea elimina aproximadamente 300 ovos por dia, até no máximo 15.000 ovos por grama de fezes. Estimulada por condições ambientais favoráveis (por exemplo, luz e temperatura), ocorre a eclosão dos ovos, em contato com a água, liberando o miracídio, o qual nada rapidamente em busca do caramujo. Ao penetrar através das partes moles do caramujo, os miracídeos perdem sua porção ciliada, transformando-se em esporocisto primário e depois, em secundário. Cerca de 30 dias após a infecção do molusco, as cercárias saem e nadam muito ativamente.. Encontrando o homem, penetram através da pele, caem na circulação

sanguínea e/ou linfática e, após 30 dias, vão se alojar no sistema porta-hepático. No hospedeiro definitivo, ocorre o dimorfismo sexual dos vermes adultos sem diferenciação dos sexos, sendo a fêmea de maior tamanho e mais fina. Após o alojamento da fêmea no canal ginecóforo do macho ocorre a postura de ovos nos vasos sanguíneos da submucosa do intestino. Os ovos atravessam a parede do intestino e caem na luz, onde se misturam as fezes que, em contato com água eclodem liberando o miracídeo, reiniciando assim o ciclo evolutivo (PESSÔA & MARTINS, 1988).

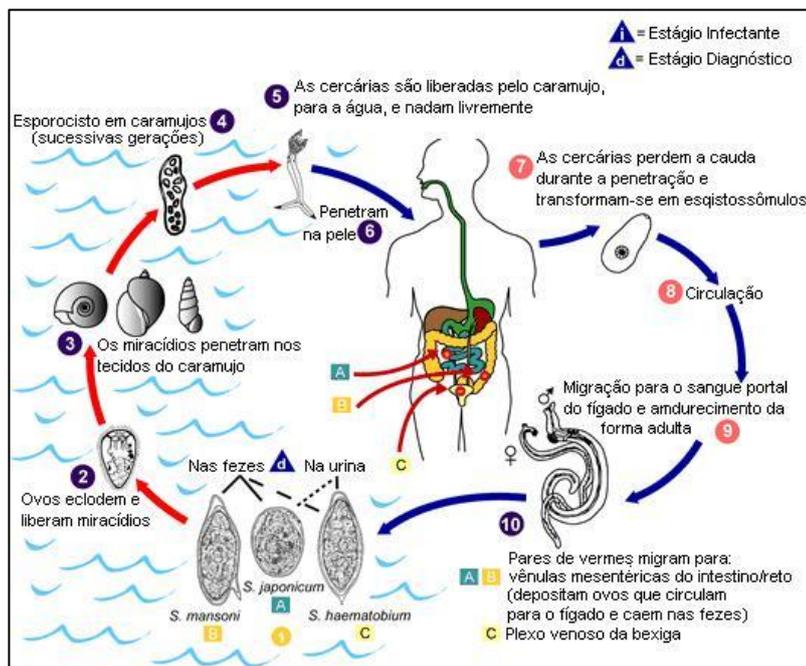


Figura 1 Representação esquemática do Ciclo evolutivo do *S. mansoni*.

Fonte: Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_ESQUI05.htm. Acesso em 21 de agosto de 2001.

O diagnóstico para esquistossomose através do exame parasitológico de fezes é relativamente fácil e rápido, dependendo da carga parasitária e do tempo de infecção. Entre os vários métodos empregados para a pesquisa de ovos do *S. mansoni* nas fezes, é muito usado o de sedimentação espontânea (NEVES, 2000), pois sendo o ovo muito pesado há facilidade para sua deposição com o sedimento. O método de contagem de ovos nas fezes descrito por Kato-Katz, em 1954, é uma técnica quantitativa de esfregaço espesso, usando um volume de fezes de peso conhecido, onde são contados todos os ovos presentes na lâmina (PESSÔA & MARTINS, 1998).

A quimioterapia vem tendo um papel central na estratégia de controle da esquistossomose. As duas drogas atualmente empregadas para o tratamento são o praziquantel e a oxaminiquina que se caracterizam por sua eficácia, baixa toxicidade e fácil administração (REY, 1992).

O praziquantel é um derivado pirazinoisoquinolínico desenvolvido após ter-se descoberto, em 1972, que esta classe tinha atividade anti-helmíntica. Após sua captação rápida, o praziquantel apresenta dois efeitos principais sobre os helmintos sensíveis. Nas menores concentrações eficazes, provoca uma atividade muscular aumentada, seguida por contração e paralisia espástica levando os vermes afetados a se soltarem dos tecidos hospedeiros. Em concentrações terapêuticas maiores acontece um dano tegumentar, o que ativa os mecanismos de defesa do hospedeiro e resulta em destruição dos vermes (FALLON *et. al.*, 1992; LINDER & THORS, 1992; BRINDLEY, 1994). As membranas dos helmintos afetados parecem ser o alvo primário da ação do praziquantel, mas o mecanismo molecular ainda não é conhecido, o composto aumenta a permeabilidade da membrana a certos íons divalentes, sobretudo o Ca^{++} (PAX *et. al.*, 1978; BLAIR *et. al.*, 1992).

Como agente de segunda escolha para o tratamento da esquistossomose existe a oxaminiquina, que é um dos mais ativos metabólitos de uma nova série de compostos 2-aminometiltetraidroquinolínicos com atividade esquistossomicida e baixa toxicidade em animais de laboratório (Foster, 1973). A eficácia do tratamento é exclusivamente sobre o *S. mansoni*. Os machos preferencialmente concentram o medicamento e morrem quando ainda estão alojados no fígado do paciente. O seu mecanismo de ação primário parece resultar de uma ativação enzimática da droga, em um processo dependente de ATP. Em vermes sensíveis ocorre alquilação de macromoléculas essenciais, inclusive o DNA (CIOLI *et. al.*, 1993).

1.3 MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA: POLISSACARÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS

Um novo enfoque vem sendo proposto para o tratamento de diversas patologias a partir de substâncias que atuam modificando a resposta do hospedeiro a uma doença, consistindo assim em utilizar-se da resposta imune para buscar uma melhora frente a uma determinada enfermidade. Os modificadores da resposta biológica (MRB) têm sido amplamente estudados, provenientes de diversas fontes e apresentam variados mecanismos de ação (HAN *et. al.*, 1999).

Uma esfera onde estes MRB's têm sido amplamente caracterizados é no que diz respeito às neoplasias. Assim, um agente pode ser classificado como um MRB se atuar através de pelo menos um dos seguintes mecanismos: a) aumento direto da resposta anti-tumoral do hospedeiro, promovendo o aumento de número ou atividade das células efetoras, ou da produção de mediadores solúveis, como as citocinas; b) redução dos mecanismos supressores, promovendo, desta forma, o aumento indireto da resposta imune do hospedeiro ao tumor; c) aumento das defesas do hospedeiro através de seu efeito como mediador natural ou sintético das respostas imunes; e d) Modificação das características de membrana das células tumorais, de forma a aumentar sua imunogenicidade, alterar seus padrões de disseminação metastática ou torná-las mais susceptíveis à destruição por mecanismos imunológicos ou por agentes citotóxicos (MITCHELL, 1988).

Uma variedade de polissacarídeos provenientes de diversas fontes vem demonstrando habilidade de estimular o sistema imune, ou seja, atuar como MRB (BOHN & BEMILLER, 1995; KIDD, 2000).

Os polissacarídeos consistem de longas cadeias contendo centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos. Também denominados glicanos, os polissacarídeos diferem entre si na identidade das suas unidades monossacarídicas, e nos tipos de ligação glicosídica, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas. Os homopolissacarídeos contêm apenas um único tipo de unidade monomérica; os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (LENHINGER *et. al.*, 2000).

Nos últimos anos, os polissacarídeos têm sido descritos como moléculas farmacologicamente ativas, em diversos campos de atuação - antiviral (HASLLIN *et. al.*, 2001), anticoagulante (MUELLER & SCHEIDT, 1994; STUELP, 1997) e anti-tumoral (WHISTLER *et. al.*, 1916; BOHN & BEMILLER, 1995; KIDD, 2000). O primeiro relato de um polissacarídeo com atividade anti-tumoral foi de um experimento realizado com moléculas extraídas das paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao Sarcoma 180 (BRADNER *et. al.*, 1958).

Alguns fatores parecem influenciar a atividade anti-tumoral dos polissacarídeos como: estrutura da cadeia principal, grau de ramificação, presença do grupo substituintes, massa molecular e conformação (BOHN & BEMILLER, 1995). A partir desses fatores pode-se, em alguns casos, prever a eficácia ou não de um determinado polissacarídeo como agente anti-tumoral e potencializa sua ação (CARNEIRO LEÃO, 1998).

Alguns polissacarídeos são capazes de estimular o sistema imune, produzindo, respostas a nível humoral e celular. A resposta humoral não tem sido considerada o aspecto mais importante do mecanismo de ação anti-tumoral, uma vez que os anticorpos produzidos, especialmente IgM, são deficientes quanto à memória, maturação de afinidade e variação isotípica. A produção de anticorpos ocorre principalmente por estímulo direto, dos linfócitos B, sem uma participação significativa das células T e macrófagos. Este mecanismo pode justificar o desenvolvimento de tolerância quando estas moléculas são administradas sistematicamente (ABBAS *et al.*, 2000a).

Quanto à resposta celular, os macrófagos são considerados elementos importantes, por estarem diretamente relacionados à captação dos polissacarídeos administrados por via sistêmica, e também na produção de citocinas, as quais ampliam a resposta imune, estimulando linfócitos T citotóxicos e células NK (ABBA *et al.*, 2000a).

O protocolo para avaliar a atividade anti-tumoral de polissacarídeos tem quase sempre empregado o Sarcoma 180 (S-180), um tumor alogeneico murino, que se origina em qualquer parte do corpo e caracteriza-se pela sua rápida proliferação. Apresenta forma sólida, pouco hemorrágica, podendo originar-se espontaneamente em fêmeas adultas de rato. A forma ascítica foi desenvolvida em 1951 por Charlotte Friend através de injeção intraperitoneal (i.p) do fluido leitoso macerado do S-180 sólido em camundongos albinos suíços (ZUCKERBERG, 1972; CARNEIRO LEÃO, 1998).

1.4 POLISSACARÍDEOS DA GOMA DE *Anacardium occidentale*

O cajueiro, amplamente distribuído em regiões litorâneas do Nordeste brasileiro, pertence ao gênero *Anacardium*, composto por 21 espécies descritas pela botânica clássica (JOHNSON, 1973; LIMA, 1988). Posteriormente, este número reduziu-se a nove no trabalho de MITCHELL & MORI (1987), sendo descrita ainda, mais uma nova espécie, totalizando dez. Trata-se de uma árvore de folhas perenes, simples, inteiras e alternadas, com ramificações baixas (SOARES, 1986). Em geral, apresenta o caule com diâmetro superior a 20 cm, ereto, com copa simétrica (OHLER, 1979). O sistema radicular caracteriza-se por uma pivotante bem desenvolvida que pode ultrapassar 10 m de profundidade. O fruto (a castanha) encontra-se preso à extremidade de um pedúnculo hipertrofiado, comumente chamado de maçã do cajueiro ou pseudo-fruto, completando seu desenvolvimento entre seis a oito semanas após a polinização (WAIT & JAMIESON, 1986).

Diversas aplicações biotecnológicas dos componentes de *A. occidentale* têm sido pesquisadas, como atividade moluscicida (MENDES *et al.*, 1990; JURBERY *et al.*, 1995) antimicrobiana (KUDI *et al.*, 1999; KUBO *et al.*, 1999; AKINPELU, 2001) e anti-Leishmania (FRANCA *et al.*, 1996).

Várias espécies de *A. occidentale* apresentam casca resinosa contendo uma goma que é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado ácido, utilizado como substituto da goma arábica. Propriedades adesivas, atividades inseticidas e emulsificantes são apontadas como justificativas para possíveis usos da goma do cajueiro. Esta contém como constituintes principais os monossacarídeos galactose (61%), arabinose (14%), ramnose (7%), glicose (8%), ácido glicurônico (5%), além de pequenas quantidades (2% de cada) de manose, xilose e ácido metilglicurônico (PAULA & RODRIGUES, 1995; MENESTRINA *et al.*, 1998).

Este polissacarídeo, com massa molecular de $1,1 \times 10^5$, apresenta uma cadeia principal formada por unidades de D-Galp unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), substituídos em O-6. Foi relatada a presença de quatro substituintes distintos, a saber: a) β -D-GlcA (1 \rightarrow 6)- β -D-Galp (1 \rightarrow 6)- β -D-Galp (1 \rightarrow 6) ; b) α -D- Galp-(1 \rightarrow 6)-D- Galp; c) α -L-Araf-(1 \rightarrow 6)-D-Galp; e d) α -L-Rhap- (1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA (MENESTRINA, *et al.*, 1998).

O heteropolissacarídeo proveniente de *A. occidentale* (P JU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (ROCHA *et al.*, 2001). Este polissacarídeo apresentou atividade antitumoral *in vitro*, frente a células Hela (MENESTRINA *et al.*, 2000). Também foi testado *in vivo* contra o Sarcoma 180, obtendo-se inibição do crescimento tumoral na ordem de 39,6% e 55,1%, utilizando-se uma única aplicação ip., nas doses de 100mg.kg^{-1} e 200mg.kg^{-1} respectivamente (MENESTRINA *et al.*, 1996)

2.0 JUSTIFICATIVA

A encapsulação de modificadores de resposta biológica em lipossomas apresenta-se como uma possibilidade terapêutica promissora, pois esses sistemas de liberação controlada parecem potencializar a eficácia de substância encapsulada (KILLION & FIDLER 1988). Vários polissacarídeos tem demonstrado ser potencialmente bons modificadores de resposta biológica (BOHN & BEMILLER, 1995; CARNEIRO LEÃO, 1998; HAN *et al.*, 1999; BIRONAITE *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2000; KIDD, 2000). O polissacarídeo da goma do cajueiro (PJU), conforme relatos da literatura, tem demonstrado atividade biológica (MENESTRINA *et al.*, 1996; STEVAN *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2001).

O acesso à matéria-prima para elaboração deste princípio ativo (PJU) é favorecido pelo amplo cultivo do cajueiro, no nordeste (400.000-450.000 há), considerando ainda que cada árvore produz 178 a 2000 g/ano de goma, com um valo médio de 700 g/ano. A atividade extrativa do exsudado é favorecida em árvores com idade superior a 25 anos, pois aumenta a produção de castanha. Além do mais, trata-se de um recurso natural, renovável, que pode ser explorado sem agressões ambientais.

Quanto aos modelos biológicos abordados neste trabalho, foram escolhidos o câncer e a esquistossomose experimentais devido às importâncias epidemiológicas, justificando-se, então, a pesquisa de novas alternativas terapêuticas.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter formas farmacêuticas de nova geração (lipossomas) contendo polissacarídeo obtido da goma de *Anacardium occidentale* (P JU), com potencial atividade antineoplásica e antiparasitária.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.2.1 Formular e caracterizar lipossomas contendo P JU.

3.2.2 Avaliar a atividade antitumoral in vivo dos lipossomas contendo P JU, frente ao Sarcoma 180.

3.2.3 Avaliar o efeito do tratamento com P JU frente a infecção experimental por *S. mansoni*.

4.0 MATERIAIS

4.1 POLISSACARIDEO

O P JU foi extraído, purificado e quimicamente caracterizado a partir da goma de *Anacardium occidentale*, no departamento de Bioquímica, UFPR, e gentilmente cedido pelo prof. Dr. Marcelo Iacomini.

4.2 ANIMAIS

4.2.1 Camundongos

Camundongos (*mus musculus*), *Swiss*, fêmeas, com idade entre 35 a 45 dias e peso médio de 25,0 g foram obtidos no biotério do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) UFPE.

4.2.2 Caramujos

Foram Utilizados caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* mantidos no biotério do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) UFPE.

4.2.3 *Schistosoma mansoni*

Foi utilizada a cepa BH (BELO HORIZONTE), oriunda do Departamento de Parasitologia da UNICAMP e mantida no setor de Esquistossomose Experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) UFPE.

4.3 CÉLULAS

4.3.1 Sarcoma 180

O Sarcoma 180 (S-180), provenientes do departamento de antibióticos, UFPE, foi mantido no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE, através de passagens infra-peritoneais (i.p) semanais em camundongos *Swiss*, fêmeas, com idade variando entre 45 e 60 dias e peso médio de 35,0 g.

4.4 REAGENTES

Foram utilizados reagentes de grau analítico, adquiridos de vários fornecedores como:

ERICH: parafina.

MERCK: ácido acético, clorofórmio, etanol, metanol.

REAGEN: eosina, hematoxilina.

SIGMA: ácido fosfatídico, colesterol, estearilamina.

VETEC: cloreto de sódio, éter etílico, fenol, formaldeído, fosfato ácido de sódio, fosfato básico de sódio, xilol.

4.5 EQUIPAMENTOS

Balança eletrônica: SARTORIUS.

Banho-maria com agitador horizontal: BIOBLOCK.

Centrífuga: KUBOTA – KN.70

Estufa: FANEM LTDA. 002.CB.

Lupa: OLYMPUS.

Microscópio: OLYMPUS – CA-2

Micrótomo: AMERICAM OPTICA.

Potenciômetro: JENEWAY

Evaporador rotativo: BUCHI.

Sonda ultrasônica: BIOBLOCK.

Ultra-centrífuga: HITACHI

5.0 MÉTODOS

5.1 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas forma preparados pelo método de evaporação de fase reserva utilizando uma modificação proposta por Amselem *et al.* (1990). Os componentes lipídicos [fosfatidilcolina de soja (EP) ou de ovo (PC), colesterol (CH), estearilamina (AS) e ácido fosfátídico (AF)] foram solubilizados em um sistema clorofórmico: metanol 3:1 (v/v) e mantidos sob agitação mecânica, a 28° C, durante 15 minutos. A concentração de lipídeos utilizada variou entre 36 e 96 µl em 10 µl de solução tampão fosfato de sódio, 0,2 M, pH 7,4.

A solução obtida foi evaporada por 20 minutos, a 30° C, sob agitação de 100 rpm, em evaporador rotativo, com o objetivo de eliminar o sistema solvente formando, assim o filme lipídico. Este foi hidratado com solução tampão fosfato de sódio, 0,2 M, pH 7,4 contendo P JU (0-6,0 mg.ml⁻¹), mantido sob agitação mecânica por 40 minutos, a 28° C. Finalmente, a preparação foi submetida à ultrasonicação, 80 W, por 250 segundos, a 4° C. As formulações desenvolvidas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Formulação dos lipossomas

FORMULAÇÃO	COMPOSIÇÃO (Proporção Molar)	[LIPÍDEO/SOL. TAMPÃO] (µmol. µl)	P JU (mg.ml ⁻¹)
F ₁	EP: CH: ST (7:2:1)	36	2,5
F ₂	EP: CH: ST (7:2:1)	36	1,0
F ₃	EP: CH: ST (7:2:1)	36	0
F ₄	EP: CH: ST (7:2:1)	48	2,5
F ₅	EP: CH: ST (7:2:1)	48	1,0
F ₆	EP: CH: ST (7:2:1)	48	0
F ₇	EP: CH: ST (7:2:1)	48	2,5
F ₈	EP: CH: ST (7:2:1)	48	0
F ₉	EP: CH: ST (7:2:1)	48	2,5
F ₁₀	EP: CH: ST (7:2:1)	48	0
F ₁₁	EP: CH: ST (7:2:1)	64	6,0
F ₁₂	EP: CH: ST (7:2:1)	64	2,0
F ₁₃	EP: CH: ST (7:2:1)	96	5,0
F ₁₄	EP: CH: ST (7:2:1)	48	4,5
F ₁₅	EP: CH: ST (7:2:1)	48	0

(EP, fosfatidilcolina de soja; CH, Colesteral; ST, Esterilamina; AF, Ácido Fosfatídico; PC, Fosfatidilcolina de ovo).

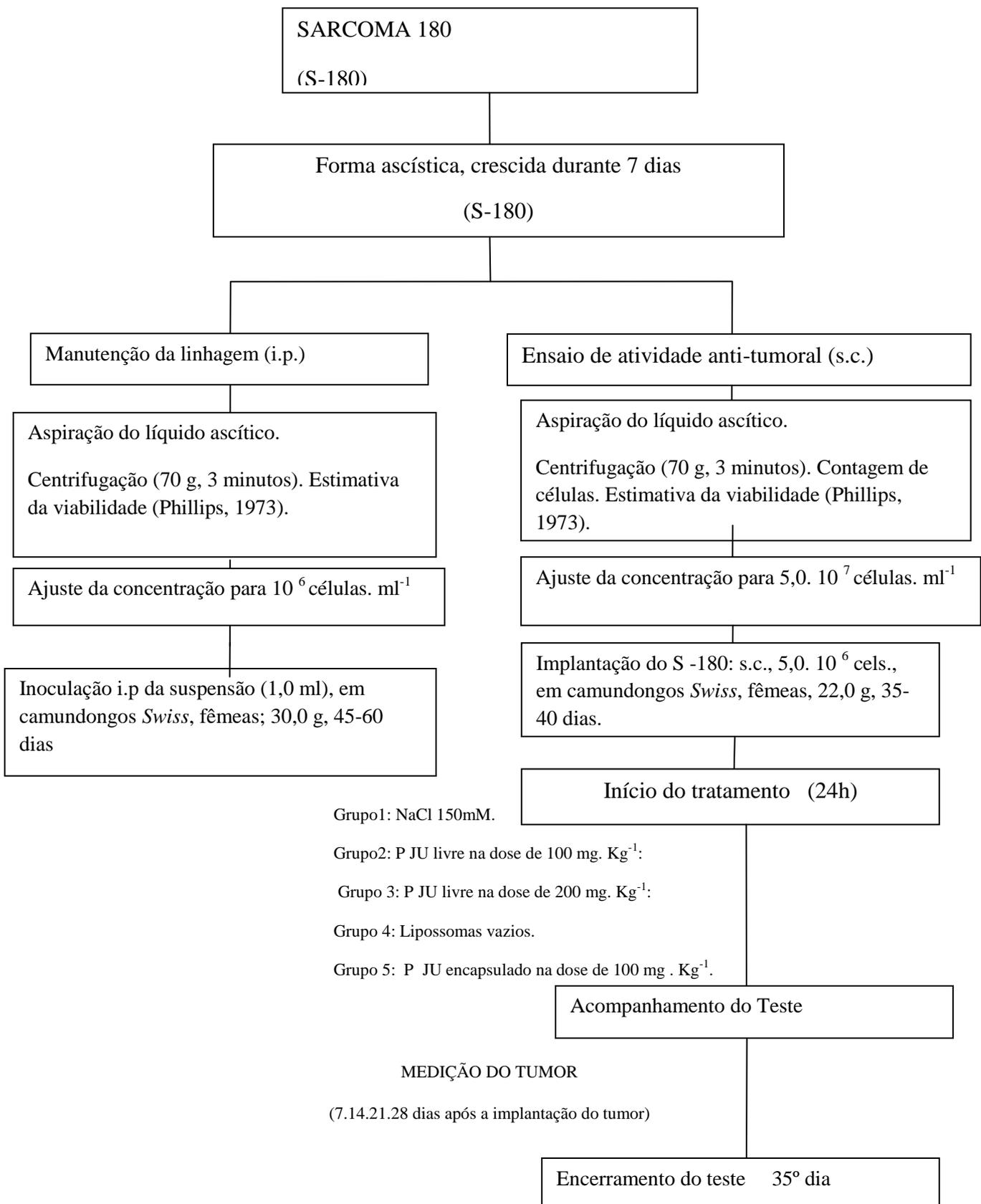


Figura 2: Representação esquemática dos procedimentos envolvendo o Sarcoma 180 (CARNEIRO LEÃO 1998)

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

5.2.1 Avaliação da estabilidade acelerada

A análise da estabilidade acelerada consiste em avaliar o comportamento das formulações sob mudanças bruscas de temperatura, umidade, luz e outros aspectos (HOWARD *et. al.*, 2000). Todas as formulações foram submetidas à análise de estabilidade acelerada. Apenas as que se apresentaram estáveis foram submetidas aos testes de estabilidade em longo prazo, conforme descrito no item 5.2.2. Realizaram-se os testes de estabilidade acelerada descritos a seguir.

5.2.1.1 Ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras foram submetidas a ciclos de 8 horas sob temperatura ambiente e 16 horas a 4° C. Tais ciclos foram monitorados através de avaliação por microscopia óptica (M.O.), e também por análise macroscópica das amostras até a formação visível de fases.

5.2. 1.2 Estresse mecânico

Uma alíquota (2,0 mL) de cada formulação foi avaliada com 180 movimentos horizontais por minuto, durante 48 horas, a 37° C. A resistência das amostras foi por microscopia óptica (M.O.), e também pelo aspecto macroscópico da amostra testada.

5.2. 1. 3 Centrifugação

Uma alíquota (1,0 mL) da formulação em teste foi centrifugada 600xg, durante uma hora, a 4° C. Foram realizadas observações microscópicas e macroscópicas das amostras com o objetivo de avaliar sua estabilidade.

5.2.2 Avaliação da estabilidade em longo prazo

As formulações foram analisadas em intervalos regulares ou até a manutenção de estabilidade nos parâmetros a seguir:

5.2.2.1 Aspecto Macroscópico

Avaliaram-se visualmente as formulações quanto a sua homogeneidade ou aparecimento de mudanças no aspecto geral. Os critérios utilizados foram: cor, deposição de grumos, floculação e formação de fases. A observação foi realizada em três intervalos (0, 30 e 60 dias após a formulação).

5.2.2.2 Variação de pH

O pH das formulações foi monitorado em intervalos regulares, semanalmente, até 49º dia, e nos 60º, 120º e 180º dias, utilizando um potenciômetro digital.

5.2.2.3 Aspecto em microscopia óptica

Em intervalos regulares (0, 30 e 60 dias), uma alíquota das formulações foi observada por microscopia óptica (M.O.). Para este monitoramento, o critério utilizado em função do tempo foi à formação de grumos.

5.2.2.4 Teor do P JU encapsulado

Foi realizada a dosagem do teor de P JU encapsulado em intervalos determinados (0, 30, 60, 90 dias) conforme descrito no item 5.2.3 com o objetivo de avaliar a variação da quantidade de polissacarídeo encapsulado.

5.2.3 Taxa de encapsulação do P JU nos lipossomas

A taxa de encapsulação do P JU foi determinada através de ultracentrifugação dos lipossomas a 3000xg, a 4° C, durante 1 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi dosado pelo método de fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956). Utilizando curva padrão de d-glicose variando entre as concentrações de 8 a 80 µg. Para caçulo de taxa de encapsulação utilizou-se a seguinte fórmula:

$$TE = [(P_{JUT} - P_{JU s}) / P_{JU t}] \cdot 100$$

(TE – Taxa de encapsulação; P JU t Quantidade de polissacarídeo de *A. occidentale* total; P JU s– Quantidade de polissacarídeo de *A. occidentale* no sobrenadante)

5.3 ENSAIOS *IN VIVO*

5.3.1 Seleção de animais

Os camundongos foram mantidos durante 5 dias em ambiente de temperatura e umidade estáveis, em condições semelhantes às do teste. Ao final deste período, os animais foram selecionados considerando-se peso e idade. Cada grupo teste foi constituído por, no mínimo, dez animais. Este procedimento foi aplicado aos ensaios de atividade anti-tumoral (item 5.3.2) e de efeito sobre a infecção experimental por *S. mansoni* (item 5.3.3).

5.3.2 Atividade anti-tumoral do p ju livre e encapsulado em lipossomas frente ao sarcoma 180.

Os procedimentos relacionados ao sarcoma 180 (S-180) estão sumarizados no fluxograma apresentado na figura 2.

5.3.2.1 Manutenção da Linhagem Tumoral

A manutenção da linhagem foi realizada através de passagens i.p semanais. O S-180, na forma ascítica, foi mantido em camundongos fêmeas adultas durante sete dias. Após este período, estes animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e o líquido ascítico contendo as células tumorais foi aspirado. As células foram contadas, a sua viabilidade celular estimada (Philips, 1973) e a concentração ajustada para 10^{-6} células.mL⁻¹. Novos animais foram, então, inoculados i.p com esta suspensão celular (1.0ml).

5.3.2.2 Implantação do tumor

As células tumorais, crescidas previamente durante 7 dias, foram aspiradas e centrifugadas (70xg, a 4°C, por 5 minutos). Uma alíquota do segmento foi utilizada para contagem das células e teste de viabilidade celular com Azul de Trypan (PHILIPS, 1973). De acordo com esta contagem, ajustou-se a concentração de células viáveis para 5,0.10⁷ células. ml⁻¹, utilizando uma solução de NaCl 150 mM estéril. Os camundongos foram inoculados via subcutânea (s.c.) na região dorsal direita com volume de 0,1 ml por animal.

5.3.2.3 Organização dos grupos experimentais e tratamento

Todos os animais foram implantados com S-180, conforme descrito no item 5.3.2.2.1, de forma aleatória e marcados individualmente. Após 24h da implantação do tumor, os camundongos foram tratados com soluções preparadas em NaCl 150 Mm, e esterilizadas por filtração em membranas Millipore[®] 0,22 µm (1,0 ml), por via i.p., de acordo com o seguinte esquema:

Grupo	Tratamento
NaCl 150 mM.	NaCl 150 mM.
P JU livre na dose 100	P JU livre (100 mg. Kg ⁻¹).
P JU livre 200	P JU livre (200 mg. Kg ⁻¹).
Lipossomas vazios.	Lipossomas vazios.
P JU encapsulado 100	P JU encapsulado (100 mg . Kg ⁻¹).

5.3.2.4 Acompanhamento e avaliação final do teste

Para o acompanhamento e avaliação final dos efeitos dos polissacarídeos livres e encapsulados nos animais tratados, utilizou-se a metodologia recomendada por Bradner *et al* (1958). Com o objetivo de acompanhar a evolução do teste, medidas perpendiculares dos tumores foram realizadas semanalmente, a partir do 7º dia após o início do tratamento, ao longo de 5 semanas. O teste foi encerrado no 38º dia, quando os animais foram anestesiados com éter, e sacrificados por exsanguinação. Os tumores foram ressecados e pesados.

Os valores obtidos pelas medidas perpendiculares foram utilizados para calcular o volume médio (VTM), de acordo com REN *et al.* (1995), segundo a fórmula:

$$VTM = \frac{DMA (DME)^2}{2}$$

(VTM, volume tumoral médio, mm³; DMA, diâmetro maior, mm; e DME, diâmetro menor, mm).

O percentual de inibição do crescimento do tumor foi calculado através da seguinte fórmula (BLASCHEK *et al.*, 1992; REN *et al.*, 1995):

$$\text{Percentual de inibição (\%)} = 100 (A-B) / A$$

(A, peso médio dos tumores do grupo controle; e, B, peso médio dos tumores do grupo tratado).

5.3.3 ATIVIDADE ATI-TUMORAL DO P JU LIVRE E ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS FRENTE AO *S. mansoni*

Os procedimentos relacionados ao efeito do P JU livre e encapsulado em lipossomas frente a animais infectados pelo *S. mansoni* estão descritos no fluxograma da Figura 3.

5.3.3.1 Organização dos grupos experimentais

Os animais utilizados neste experimento foram divididos em 10 grupos, como distribuídos a seguir:

Grupos infectados pelo. *S. mansoni*

NaCl 150 mM.

P JU livre

P JU encapsulado

Lipossomas vazios.

P JU encapsulado

P JU livre

NaCl 150 mM.

P JU livre (100 mg. Kg⁻¹, 24 horas após a infecção)

P JU encapsulado (100 mg. Kg⁻¹, 24 horas após a infecção)

Lipossomas vazios.

P JU encapsulado (100 mg. Kg⁻¹, 42° dia após a infecção)

P JU livre (100 mg. Kg⁻¹, 42° dia após a infecção)

Grupos não infectados pelo. *S. mansoni*

NaCl 150 mM.

P JU livre

P JU encapsulado

Lipossomas vazios.

NaCl 150 mM.

P JU livre (100 mg. Kg⁻¹, 24 horas após a infecção)

P JU encapsulado (100 mg. Kg⁻¹, 24 horas após a infecção)

Lipossomas vazios.

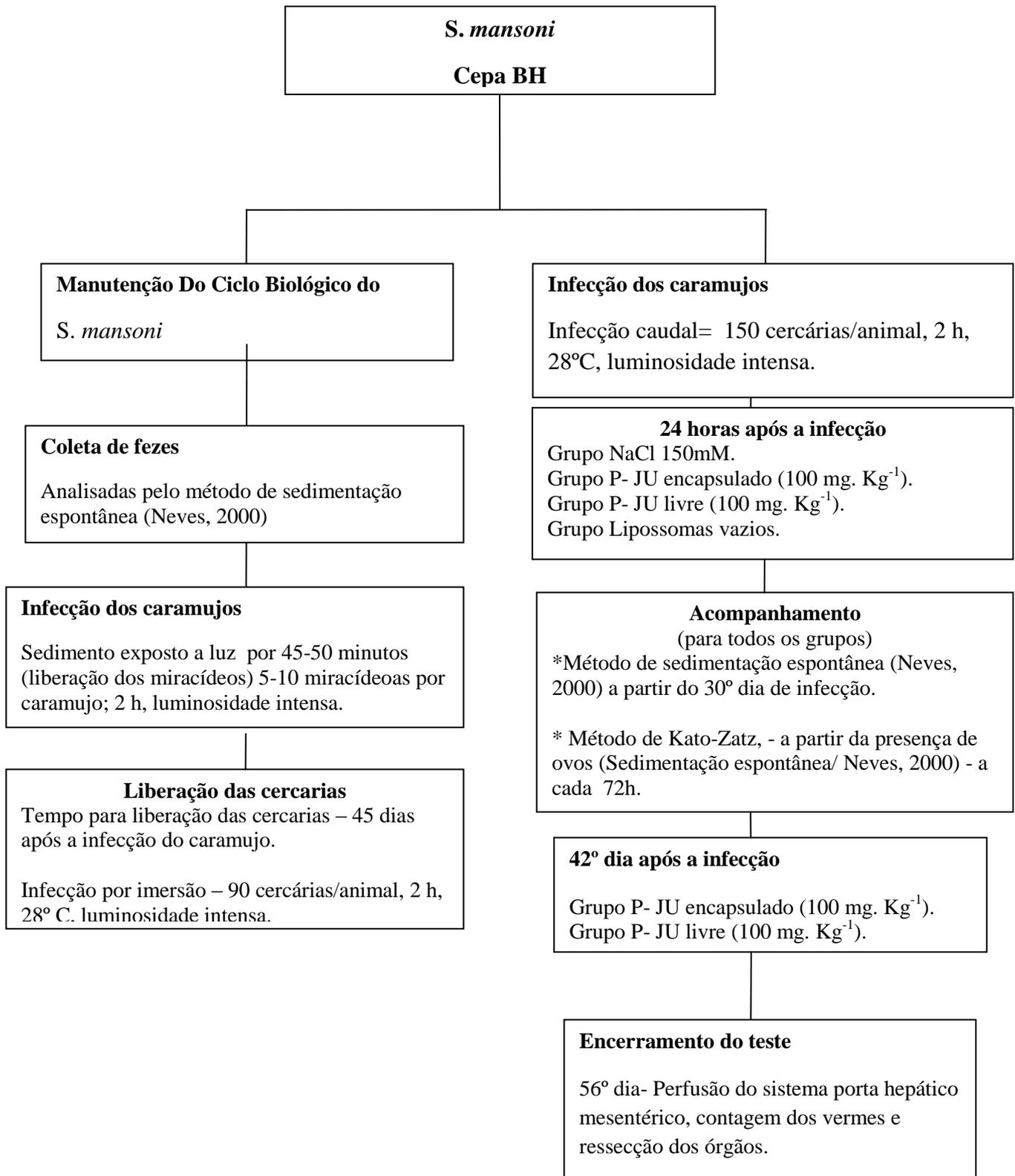


Figura 3: Representação esquemática dos procedimentos in vivo envolvendo *S. mansoni* (manutenção do ciclo biológico e infecção experimental).

5.3.2.2 *Manutenção do ciclo biológico do S. mansoni*

5.3.2.2.1 Coleta das fezes

As fezes de camundongos foram coletadas durante 2h, e após este período foram recolhidas e analisadas segundo o método de sedimentação espontânea (Neves, 2000). As fezes foram solubilizadas em água destilada, filtradas em um fragmento de gaze e recolhidas em um cálice de sedimentação. O volume do cálice foi completado com água destilada. As fezes foram lavadas 3 (Três) vezes em intervalos de aproximadamente 2h até que o sobrenadante se apresentasse límpido (PESSOA & MARTINS, 1988).

5.3.2.2.2 Infecção dos caramujos

O sedimento contendo os ovos de *S. mansoni* foi colocado em uma placa de Petri e exposto a luz, por 45-50 minutos, a 28° C, a fim de que ocorresse a liberação dos miracídeos. Cada caramujo, então, foi exposto a 5-10 miracídeos durante 2h. Após a infecção, os caramujos foram mantidos em aquário, com pouca luminosidade, e após 30 dias aproximadamente, estavam no período propício para liberação das cercárias.

5.3.2.2.3 Infecção experimental pelo *S. mansoni*, Tratamento e Análise Histopatológica

Os caramujos foram expostos à luminosidade intensa, a 28° C, por 40-60 minutos, e dispostos em recipientes contendo água destilada, a fim de liberar as cercárias. Estas foram contadas e estabeleceu-se uma relação do volume de suspensão necessária para expor cada camundongo a 150 cercárias. Os camundongos foram submetidos à infecção caudal, ou seja, foram contidos de forma a expor apenas a cauda, a qual foi mergulhada na suspensão cercariana e mantida durante 2 h, a 28° C, sob luminosidade intensa de forma a favorecer a penetração das cercárias (OLIVIER & STIREWALT, 1952). Após os procedimentos acima descritos os animais foram tratados, monitorados e o encerramento do teste ocorreu conforme esquema da Figura 3.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 FORMULAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

6.1.1 Otimização da formulação de lipossomas contendo P JU

Embora os lipossomas se apresentem como estruturas estáveis, mostram uma fluidez que está relacionada com a composição lipídica e com a temperatura. Denomina-se temperatura de transição de fase (T_c) aquela que gera uma passagem de estado gel para o líquido-cristalino (SZOKA & PAPAHDJOPOULOS, 1980; FORNOVI *et al.*, 1989). Quanto maior a proporção de ácidos graxos saturados, mais alta será a temperatura de transição (LEHNINGER *et al.*, 2000). A transição de fase nas bicamadas pode ser descrita como um processo de passagem da ordem para a desordem, onde existe uma expansão lateral da bicamada, alteração em sua espessura e densidade, além de mudanças entre as cadeias hidrocarbonadas e interações polares na interface lipídeo-água (JACOBSON & PAPAHDJOPOULOS, 1975). Cada lipídeo possui uma T_c característica, a qual pode ser alterada utilizando-se misturas de fosfolipídeos ou pela adição de colesterol (FORNOVI *et al.*, 1989). Quinze formulações foram preparadas utilizando diversos constituintes e variadas proporções (Tabela 1), e avaliadas quanto à estabilidade acelerada, com o objetivo de otimizar a preparação (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da estabilidade das formulações contendo P JU

FORMULAÇÃO	ESTRESSE [48 h / 180 movimentos/min]	CENTRIFUGAÇÃO [1 h / 3000 rpm]	CICLO GELO/ DEGEL
F ₁	Estável	Estável	Superior a 10 ciclos
F ₂	Estável	Estável	Superior a 10 ciclos
F ₃	Estável	Estável	Superior a 10 ciclos
F ₄	Estável	Estável	2 ciclos
F ₅	Estável	Estável	2 ciclos
F ₆	Estável	Estável	3 ciclos
F ₇	Precipitado	Cremagem	2 ciclos
F ₈	Precipitado	Cremagem	3 ciclos
F ₉	Estável	Estável	Superior a 10 ciclos
F ₁₀	Estável	Estável	Superior a 10 ciclos
F ₁₁	Estável	Cremagem	2 ciclos
F ₁₂	Estável	Cremagem	23 ciclos
F ₁₃	Precipitado	Cremagem	1 ciclo
F ₁₄	Precipitado	Cremagem	1 ciclo
F ₁₅	Precipitado	Cremagem	1 ciclo

Os parâmetros considerados para avaliar a estabilidade acelerada foram o estresse mecânico, centrifugação e ciclos de congelamento/descongelamento. Apenas as formulações, F₈, F₉, F₁₃, F₁₄ e F₁₅, apresentaram formação de precipitado, indicando perda da estabilidade, sob agitação mecânica (180 movimentos/minuto, durante 48 horas, a 37° C. As amostras que apresentaram melhor perfil, quando submetidas à centrifugação, foram as que continham menor concentração de P JU. As formulações F₁₁, F₁₃ e F₁₄ que continham as maiores concentrações de polissacarídeo perderam a estabilidade, formando uma visível drenagem. Uma vez que as preparações F₇, F₈, F₁₂ e F₁₄ também foram instáveis à centrifugação, sugere-se que a perda da estabilidade neste teste pode estar relacionada com características constituintes do lipossoma. No que diz respeito ao parâmetro ciclo (gelo/desgelo), considerou-se estável a formulação que conseguiu suportar uma série superior e dez ciclos. As amostras F₁, F₂, F₃, F₉ e F₁₀ apresentaram este perfil.

Diante do exposto, as formulações que apresentaram melhor estabilidade acelerada foram as carregadas positivamente, constituídas por EP: CH: AS (7:2:1) e denominadas F₁, F₂ e F₃. A proporção lipídica utilizada foi compatível com aquela empregada por Silva (1197) na obtenção de lipossomas contendo penicilina G. As preparações neutras (F₇ e F₈) apresentaram-se bastante instáveis, confirmando os relatos da literatura (CROMMELIN, 1984). Já as preparações de carga negativa (F₉ e F₁₀) mostraram uma estabilidade intermediária entre as positivas e as neutras.

Quanto ao material encapsulado, dois objetivos são imprescindíveis: a liberação adequada do fármaco, além da manutenção e estabilidade do princípio ativo durante o armazenamento (STRICKER & KIBAT, 1985). Tentou-se aumentar a concentração do P JU no interior dos lipossomas (F₁₁, F₁₃, e F₁₄), o que sempre gerava um aumento da viscosidade. Tal fato pode ser atribuído à alta viscosidade do P JU descrita por PAULA & RODRIGUES (1995).

As formulações foram avaliadas através de microscopia óptica (M.O), considerando o aparecimento de grumos como fator determinante para perda da estabilidade. As formulações F₁, F₃, F₉ e F₁₀ apresentaram-se sem grumos até o final da observação (60 dias), enquanto nas demais formulações vários grumos eram visíveis por M.O no 30° dia da análise.

Quando submetidas à avaliação macroscópica, as formulações de lipossomas apresentam aspectos semelhantes (suspensão esbranquiçada, opaca e fluida), exceto a formulação que continha fosfatidilcolina de ovo, que se mostrou levemente amarelada. Ao longo do tempo, verificou-se formação de fase conseqüente perda da estabilidade em algumas formulações. Por outro lado, outras preparações mantiveram o aspecto macroscópico inicial

ao longo do tempo e por isso foram considerados estáveis (F₁, F₂, e F₃). Os resultados obtidos com a avaliação macroscópica estão descritos na Tabela 3.

A seleção das formulações baseou-se neste conjunto de resultados e considerando-se a sua posterior aplicação biológica. Para tal, são requisitos básicos e estabilidade, associada a uma concentração de P JU adequada na formulação, pois relatos anteriores (MENESTRINA *et al.*, 1996) descreviam o emprego de doses na ordem de 100 e 200 mg.kg⁻¹. Assim, as amostras F₁ (lipossomas contendo P JU na concentração de 2,5 mg.ml⁻¹) F₃ (lipossomas vazios) foram selecionados para realização dos outros testes de estabilidade e posterior aplicação *in vivo*.

Tabela 3: Estabilidade macroscópica das formulações de lipossomas contendo P JU.

FORMULAÇÃO	ASPECTO MACROSCÓPICO		
	Tempo zero	30 dias	60 dias
F ₁	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida
F ₂	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida
F ₃	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida
F ₄	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₅	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₆	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₇	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₈	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₉	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida	Formação de fases
F ₁₀	SE. Opaca. fluida	SE. Opaca. fluida	Formação de fases
F ₁₁	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₁₂	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₁₃	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₁₄	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	
F ₁₅	SE. Opaca. fluida	Formação de fases	

6.1.2 Avaliação do pH

Esta avaliação foi realizada em intervalos regulares (Figura 4), relacionando os valores de pH da formulação e da solução dispersante (solução tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4). As formulações não apresentaram variação significativa no valor de pH em função do tempo. Tais resultados estão em concordância com os obtidos por OLIVEIRA (1998).

Para acompanhar a formulação, o pH foi monitorado por mais seis meses, obtendo-se ao final deste período, um valor de 6,0. Constatou-se, assim, que a variação do pH não foi

acentuada. A hidrólise dos fosfolipídeos é um fator gerador da perda de estabilidade dos lipossomas. Tal hidrólise está intimamente relacionada com o pH, o qual deve ser considerado como um fator crítico para se obter uma vida mais longa para a preparação (LIMA, 1995).

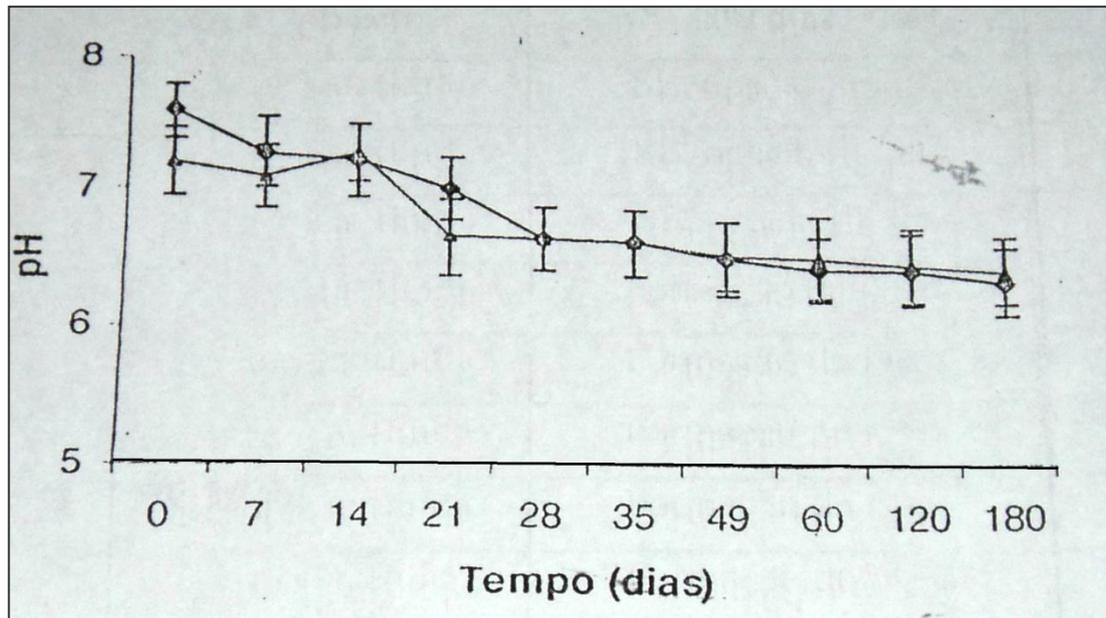


Figura 4 Avaliação do pH das formulações de escolha contendo P JU [Δ , F₁ Formulação de lipossomas contendo P JU (2.5 mg/ml⁻¹); \blacklozenge , F₃ Formulação de lipossomas vazios

6.1.3 Cálculo da taxa de encapsulação (TE) e acompanhamento do teor de P JU encapsulado.

De acordo com a curva padrão de D-glicose ajustada aos valores experimentais pelo método dos mínimos quadrados, determinou-se que a taxa de encapsulação do P JU era na ordem de 42%. Este resultado é compatível com o relato anterior (WONG *et al.*, 1992), onde foram encapsulados um lipopolissacarídeo e um antígeno polissacarídeo de *Brucella abortus*, com uma TE de 45%. Entretanto, KILLION & FIDLER (1998) obtiveram uma TE de 70% para o muramil tripeptídeo, um imunomodulador utilizado para controle de metástases.

A concentração do P JU encapsulado em lipossomas foi monitorado através do acompanhamento do teor de encapsulação ao longo do tempo (0-90 dias). O teor de P JU encapsulado que inicialmente foi de 42%, após noventa dias decaiu para 36%. Assim, a formulação F3 apresentou uma perda de 14,2% do princípio ativo (P JU), ao longo dos 90 dias. Este resultado é satisfatório se comparado a outras descrições da literatura (OLIVEIRA, 1998). A pequena variação na quantidade do P JU encapsulado nos lipossomas ao longo do tempo, representa a possibilidade de utilizar essas preparações na terapêutica, considerando-se

que, para serem aplicados, os lipossomas precisam manter o princípio ativo encapsulado durante o armazenamento (STRICKER & KIBAT, 1995).

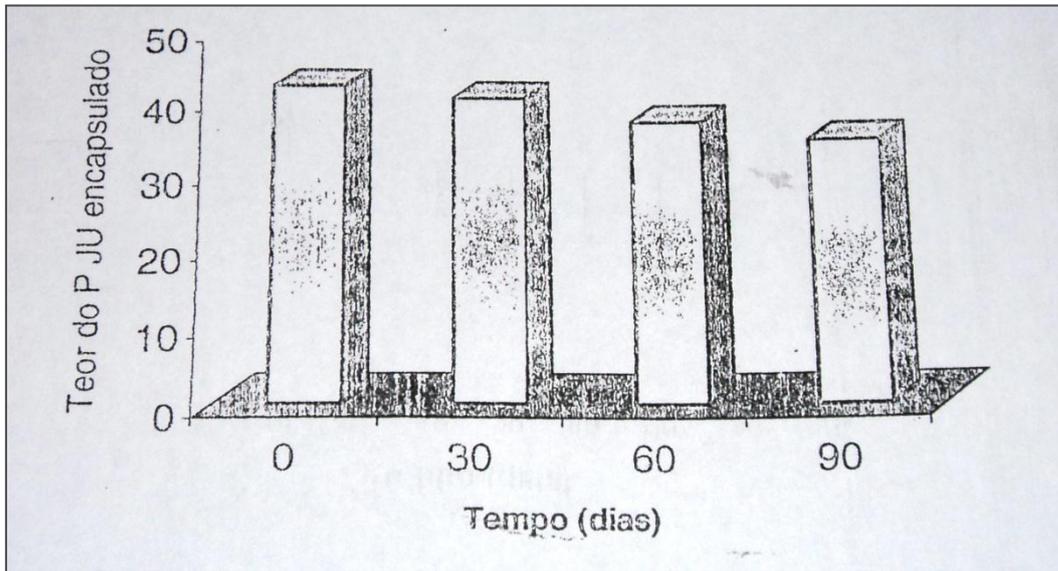


Figura 5 Teor do P JU encapsulado em lipossomas

6.2. ATIVIDADE ANTI-TUMORAL IN VIVO DO P JU LIVRE ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS

O Sarcoma 180 (S-18), também conhecido como Tumor de Crocker, foi descoberto em 1914, como uma massa localizada na região dorsal direita de um rato albino macho. Apesar do diagnóstico inicial de carcinoma, não foi possível, na época, determinar sua origem. A linhagem tumoral foi mantida através de sucessivos transplantes subcutâneos, após o que suas características histológicas modificaram-se, variando entre carcinoma e sarcoma. Passou, então, a ser denominado Sarcoma 180, devido às suas características morfológicas e seu comportamento biológico. Quando implantado via s.c., o S-180 dá origem a uma massa sólida, infiltrada no tecido conjuntivo subcutâneo (ZUCKERBERG, 1972).

A manutenção da linhagem do S-180 pode ser realizada por via s.c. ou i.p. Na primeira opção, fragmentos do tumor sólido podem ser depositados no tecido conjuntivo subcutâneo com auxílio de um trocáter. Neste caso, a qualificação do implante para fins de padronização da técnica é dificultada. Neste trabalho, optou-se pela manutenção de linhagem por via i.p. o que permite a quantificação das células implantadas, em qualquer etapa necessária (ZUCKERBERG, 1972; MIURA *et al.*, 1995; CARNEIRO LEÃO, 1998).

6.2.1 Inibição do crescimento tumoral

O efeito P JU livre encapsulado em lipossomas sobre os S-180 está apresentado na tabela 4. A atividade destas formulações foi avaliada em tratamento com dose única i.p.' aplicada 24 h após a implantação do tumor, nas concentrações de 100 e 200 mg.kg⁻¹. verifica-se que ambas as formulações, nas doses aplicadas, não apresentaram atividade anti-tumoral frente ao S-180, conforme pode ser observado pela ausência de significância estatística entre os percentuais de regressão obtidos. Estes resultados discordam dos descritos por MENESTRINA *et al.*, (1996) para o P JU livre, que obtiveram regressão na ordem de 39,60% e 55,1%, nas mesmas doses e condições experimentais. Tais resultados podem ter sido ocasionados por diversos fatores. Verificou-se um crescimento acelerado da massa tumoral, especialmente no grupo controle, com uma conseqüente alta taxa de mortalidade dos animais. Isto possivelmente estaria relacionado à adaptabilidade das células tumorais na linhagem de camundongos utilizada. Outras possibilidades envolveriam a concentração de células empregada, assim como o tempo de experimento (35 dias). Entretanto, a maioria dos relatos que avaliam a atividade anti-tumoral de polissacarídeos frente ao S-180 descreve o uso de 5,0x10⁶ células/implante e de 35 dias de experimento como utilizado neste trabalho (BRADNER *et al.*,1958; CHIHARA *et al.*, 1970a; LEDERKRERNER *et al.*, 1983; SUGA *et al.*, 1984; YAMADA *et al.*, 1984; MIZUNO *et al.*, 1986,1992,1995; KIHU *et al.*, 1989; BLASCHEK *et al.*, 1992; KITAMURA *et al.*, 1994; OHNO *et al.*, 1995; ZHUANG *et al.*, 1995; CARNEIRO LEÃO *et al.*, 1998).

Tabela 4: Atividade anti-tumoral *in vivo* do P JU livre e encapsulado em lipossomas.

GRUPO	DOSE (MG kg ⁻¹)	VTM (mm ³ : M=dp)	Peso tumor (g: M=dp)	Regressão Tumoral(%)
NaCl	-	12,72±2,03	9,08±2,37	-
P JU livre	100	12,06± 3,97	10,42± 2,30	-
P JU livre	200	10,58±1,78	9,19±2,68	-
Lipossomas vazios	-	11,74±4,17	8,79±1,15	1,21 ^a
P JU encapsulado	100	12,12±2,69	8,16±2,43	10,13 ^a

[M, média; dp, desvio padrão VTM₃₅, volume tumoral médio no 35º dia; -, regressão tumoral não observada, letras iguais indicam que há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey: p> 0,05)].

6.2.2 Aspectos histopatológicas do sarcoma 180

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações ocasionadas pelos tratamentos, foi realizada a análise desses tumores do ponto de vista histopatológico.

O S-180, quando implantado por via s.c, apresentou-se em sua maior parte, por células tumorais. Em menor aumento (200x), observou-se o estroma escasso, ou seja, faixas delgadas de tecido conjuntivo frouxo envolvendo as células de S-180, onde vasos sanguíneos puderam ser evidenciados. Quanto às características do parênquima do tumor, ZUCKERNEG (1972) e CARNEIRO LEÃO (1998) observaram que as células do S-180 se organizaram em ninhos ou cordões, apresentando morfologia poliédrica, núcleos volumosos, com nucléolos evidentes, citoplasma claro e pouco basófilo. Figuras típicas de mitose foram encontradas com frequência.

Áreas de necrose também foram identificadas, em dois padrões morfológicamente distintos: necrose coagulativa, em que o arcabouço celular se manteve preservado; e liquefativa, onde ocorreu uma completa dissolução de elementos celulares e apenas fragmentos eosinofílicos foram observados. A necrose é um processo de morte celular caracterizado por diversas alterações ultra-estruturais, com a interrupção da continuidade da membrana plasmática, *blebbing*, digestão nuclear (picnose), além de edema e formação de precipitados mitocôndrias (TRUMP & BEREZESKY, 1996; MELLO *et al.*; 2001).

Os tumores tratados com P JU livre e encapsulado em lipossomas não apresentaram diferenças macroscópicas significativas, conforme descrito no item 6.2.1. Da mesma forma, observou-se que, morfológicamente, o parênquima dos tumores tratador com o P JU encapsulado assemelhou-se ao do grupo controle. A coloração pelo Tricrômico de Masson permitiu evidenciar a presença de delicadas traves colágenas em volta das células tumorais e próximas a infiltrados linfo-plasmocitários, não observados no controle. Estas observações estão de acordo com o relato de CARNEIRO LEÃO (1998), que observou um perfil histopatológico semelhante ao tratar animais portadores de S-180 com a (1→3),(1→4)- α -D-glucana do líquen *Remalina celastri*.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO P JU LIVRE E ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS FRENTE À ESQUITOSSOMOSE EXPERIMENTAL

6.3.1 Aspectos parasitológicos

Neste trabalho, foi utilizada a cepa oriunda de Belo Horizonte (BH) e moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*, adaptadas à infecção pelo miracídio do *S. mansoni* (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993).

As cercárias para infecção dos animais foram quantificadas por contagem estimada, utilizando-se uma carga parasitária de 150 cercárias por animal, observando-se, uma infecção relativamente regular e ausências de mortes prematuras. Este resultado difere das observações de OLIVEIRA (1994), onde a contagem estimativa causou irregularidades nas infecções experimentais, com carga de 100 cercárias/animal que apresentaram mortalidade antes de completar o ciclo, provavelmente devido a uma maior carga parasitária, e com alguns animais não se infectando. Vale a pena ressaltar que a carga parasitária utilizada neste experimento (150 cercárias/animal) pode ser considerada alta quando comparada aos relatos da literatura (TEIXEIRA *et al.*, 1996; FRÉZARD *et al.* 1997).

A partir do 38º dia da infecção, uma série de exames parasitológicos foi iniciada para a detecção e contagem de ovos nas fezes, utilizando-se o método de Kato-Zatz. Por volta do 42º dia, a presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes de todos os animais foi detectada. Os grupos experimentais que foram tratados com P JU encapsulado apresentaram uma redução significativa no número de ovos quando comparados ao grupo controle (Tabela 5). A redução relativa ao grupo controle foi na ordem de 82,1% para os grupos tratados com P JU encapsulado, administrado 24 h após a infecção e no 42º dia após a infecção, respectivamente. Comparando-se eliminação média de ovos durante o experimento, quanto aos animais tratados com P JU encapsulada em lipossomas e administrando i.p. 42º dias após a infecção, verificou-se uma redução marcante na ordem de 93,5% no intervalo entre 52º e 56º. Vale salientar que o efeito deste tratamento desenvolveu-se em um intervalo de apenas 14 dias, o que ressalta o resultado obtido.

PROCÓPIO *et al.* (2000^a), trabalhando em condições experimentais semelhantes para avaliar o efeito da α -glucana sulfatada de *R. celastri*, avaliou de ovos nas fezes, tendo observado uma redução estatisticamente significativa, comparada ao grupo controle, na ordem de 61,5%, 75,2% e 92%, nos 42º, 50º e 56º dias após a infecção, respectivamente.

Tabela 5: Eliminação média de ovos *S. mansoni* após O tratamento com PJU livre e encapsulado em lipossomas.

GRUPO	DOSE (MG kg ⁻¹)	INÍCIO TRATAMENTO	Nº ovos <i>S. mansoni</i> /g de fezes (M±dp)					
			38º dia	42º dia	46º dia	49º dia	52º dia	56º dia
NaCl 150 mM	-	24 horas	0	43,2±20,0 ^a	258±36,0 ^b	390±153,5 ^c	398,4±108,1 ^d	336,0±51,8 ^c
P JU livre	100	24 horas	0	72,0±19,6 ^a	186,0±49,5 ^b	462,0±230,5 ^c	390,0±167,9 ^d	270,0±98,7 ^e
P JU encapsulado	100	24 horas	0	30,0±15,4 ^a	240,0±1,85,4 ^b	612,0±130,7 ^b	414,0± 220,8 ^d	60,0± 20,5 ^a
Lipossomas vazios	-	24 horas	0	24,0±17,9 ^a	438,0±144,5 ^c	522,0±233,8 ^b	366,0± 174,6 ^d	176,0± 67,1 ^b
P JU encapsulado	100	42 horas	0	60,0±22,0 ^a	402,0±135,1 ^c	504,0±233,4 ^b	616,0±316,9 ^b	40,0±19,9 ^h
P JU livre	100	42 horas	0	60,0±24,0 ^a	204,0±95,7 ^b	296,0±125,8 ^g	144,0±76,3 ^d	141,0±49,9 ^b

M, média; dp, desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey: $p > 0,05$). Os camundongos foram infectados por via caudal com uma carga parasitária de 150 cercárias/animal e tratados de acordo com diferentes esquemas terapêuticos. A infecção foi acompanhada através da eliminação de ovos nas fezes pelo método de Kato-katz, até o 56º dia, quando o experimento foi finalizado].

A perfusão do sistema porta-hepático-mesentérico permitiu a coleta dos vermes adultos alojados nesses vasos, registrando-se o número total, assim como o de machos, fêmeas e pares acasalados. A tabela 6 representa o perfil de recuperação dos vermes adultos no 56º dia após a infecção.

Observou-se, em todos os grupos, uma predominância de vermes machos, na ordem de 70%. Utilizando-se o P JU encapsulado num esquema de tratamento 42 dias após a infecção, ocorreram reduções estatisticamente significativas quanto ao número total de vermes e de machos (54,2% e 14,9%, respectivamente). Esses resultados estão de acordo com o relato de ARAÚJO *et al.*, os quais empregaram o derivado sulfatado da α glucana de *R. celastri*.

Tabela 6: Efeito do tratamento com P JU livre e encapsulado em lipossomas sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

GRUPO	DOSE (MG kg ⁻¹)	INÍCIO TRATAMENTO	MACHOS	FÊMEAS	VERMES ACASALADOS	TOTAL
NaCl 150 mM	-	24 horas	29,4±14,11 ^a	8,0±2,9 ^b	2,8±1,0 ^c	38,0±16,0 ^d
P JU livre	100	24 horas	20,0±7,3 ^a	9,4±3,0 ^b	6,4±2,1 ^c	29,4±10,1 ^d
P JU encapsulado	100	24 horas	23,0± 8,1 ^a	8,8±3,7 ^b	4,0±1,6 ^c	31,8±14,0 ^d
Lipossomas vazios	-	24 horas	22,8± 11,2 ^a	8,4±3,8 ^b	2,4±1,8 ^c	31,2±10,3 ^d
P JU encapsulado	100	42 horas	12,0±6,7 ^a	5,4±2,6 ^b	3,2±1,1 ^c	10,4±7,1 ^d
P JU livre	100	42 horas	14,2±6,9 ^b	7,0±2,9 ^b	4,2±2,3 ^c	21,2±10,3 ^e

(Resultados expressos em \pm desvio padrão. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativamente entre os tratamentos (Teste de Tukey: 0,05). Os camundongos foram infectados por via caudal com uma carga parasitária de 150 cercárias/ animal e tratados de acordo com diferentes terapêuticos. Os vermes foram qualificados no 56º dia após a infecção, quando o experimento foi finalizado).

Os protozoários e helmintos que atingem a corrente sanguínea c/ou tecidos, freqüentemente, são capazes de sobreviver e proliferar, uma vez que estão bem adaptados aos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, especialmente à fagocitose por neutrófilos e macrófagos e à lise mediada pelo sistema complemento (ABBAS *et al.*, 2000b).

Na esquistossomose, estes fenômenos são parcialmente explicados pelas características do tegumento. Várias camadas celulares tomam o parasito bastante resistente aos neutrófilos e macrófagos. Em paralelo, ocorre uma absorção de proteínas do hospedeiro na superfície do helminto, caracterizando um tipo de "camuflagem", associada a uma

descamação do tegumento, o que ocasiona troca do revestimento antigênico (BRUNET *et al.*, 1998; CAPRON, 1998).

Em várias helmintíases, como na esquistossomose, os mecanismos específicos de defesa são mediados através do clone de linfócitos T_{H2}, ou seja, através de I_GE e eosinófilos. Trata-se de citotoxicidade celular mediada por anticorpos, onde as moléculas de I_GE ligam-se à superfície do parasita, permitindo o ataque dos eosinófilos. Estes liberam o conteúdo de seus grânulos (enzimas), os quais destroem os parasitas (BRUNET *et al.*, 1999). O *S. mansoni* adulto, tem sido relatado o reconhecimento de sequências GalNAcβ- (1→4) – GlcNAc-R (LDN) e GalNAc-β- (1→4) e GalNAc-β- (1→3)-α- Gal, as quais podem ser reconhecidas pelos hospedeiros, via I_GE e I_GM (KHOO *et al.*, 1997); NYAME *et al.*, 1999), podendo ainda ser utilizadas como elemento diagnóstico (Hamilton *et al.*, 1999). De forma geral vários estudos relatam o reconhecimento de carboidratos por parte do sistema imune, como o descrito para lipopolissacarídeos de origem bacteriana. Receptores específicos, como o receptor de manose e o CD14 para lipopolissacarídeo, também foram descritos (JANEWAY *et al.*, 2000). Considerando o reconhecimento dos carboidratos presentes em diversos patógenos pelo sistema imune, pode-se sugerir que a atuação de alguns polissacarídeos como MRB é função deste estímulo às células de defesa que os carboidratos parecem exercer.

FRÉZARD *et al.* (1997) avaliaram o efeito da oxaminiquina livre (OXA) e encapsulada em lipossomas (LOXA) na dose de 10mg.kg⁻¹, frente à esquistossomose em camundongos infectados com carga parasitária de 60 ou 90 cercárias/animal. Verificou-se uma reação significativa do número de vermes recuperados no grupo tratado com o LOXA, por via s.c. 1 dia antes ou 3,7 ou 14 dias após a infecção, quando comparado aos grupos controle, lipossomas vazios e OXA. O efeito máximo de LOXA, com 97% de redução da carga parasitária, foi observado quando administrado um dia antes da infecção.

6.3.2 Aspectos histopatológicos

A análise dos fígados de animais não-infectados tratados com P JU livre e encapsulado (100 mg.kg⁻¹), com NaCl 150mM e com lipossomas vazios não demonstrou aspectos sugestivos de alterações histopatológicas. Os aspectos analisados espaço porta, veia centrolobular, hepatócitos e sinusóides hepáticos, encontram-se dentro dos parâmetros de normalidade, sugerindo ausência de efeito tóxico do P JU. Os cordões de hepatócitos apresentaram arranjos característicos. Os capilares sinusóides e a veia centro lobular

mostraram contornos e distribuição regulares. O sistema porta-hepático dos animais tratados não apresentaram qualquer modificação estrutural quando comparado ao do controles. Os resultados são compatíveis com os descritos por PROCÓPIO *et al*, (2000b), que utilizou a α -glucana sulfatada de *R. celastri*.

A avaliação histopatológica dos baços dos animais tratados e controles demonstrou ausência de alterações significativas. Os nódulos linfóides dos animais tratados e controle não mostraram diferenças aparentes, principalmente, no que diz respeito à caracterização de um centro germinativo típico da polpa branca do baço. De maneira geral, não foram observadas diferenças significativas entre o parênquima esplênico dos animais tratados e controles.

Entre os animais infectados pelo *S. mansoni*, foram observadas importantes alterações na estrutura hepática. Nos camundongos tratados com NaCl 150 mM e com lipossomas vazios, foram observados infiltrados linfoplasmocitários, granulomas em diversas etapas de desenvolvimento, contendo ovos do parasita, além da presença de vermes adultos no interior de vasos sangüíneos. Essas alterações foram associadas à etiologia da hipertensão portal e hepatomegalia, devido à lesão da estrutura dos hepatócitos, artérias e sinusóides, com prejuízo hepático (MAGALHÃES-FILHO & SILVA, 1994).

Nos grupos tratados, observou-se um perfil histopatológico semelhante ao descrito para os grupos controles (NaCl e lipossomas vazios), ressaltando-se a ausência de verme no interior dos vasos hepáticos o número médio de lesões histopatológicas presentes no fígado, intestino e baço de animais infectados pelo *S. mansoni* está apresentado na figura 10. Não houve diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey, $p > 0,05$) entre os grupos.

TEIXEIRA *et al*, (1996) avaliaram os efeitos do *Corynebacterium parvum* (0,7mg duas vezes por semana durante 4 semanas, 30 dias antes e 30 dias depois da infecção). Quanto à proteção do hospedeiro, reação tecidual e quimiotaxia *in vivo*, em camundongos infectados com carga parasitária de 90 cercárias/animal (cepa BH). Pela contagem de vermes adultos observou-se uma redução no grupo profilático comparado ao grupo controle na ordem de 44%. As reações teciduais foram descritas em todos os grupos, embora não tenham ocorrido diferenças marcantes entre eles. Este relato corrobora os resultados apresentados neste trabalho. Entretanto, PROCÓPIO *et al*. (2000b) descreveu uma redução significativa no número de lesões hepáticas entre os grupos controle e tratado utilizando uma carga parasitária de 150 cercárias /animal e administrando uma única dose de 100mg.kg^{-1} α -Glu-SO₄ de *R. celastri*.

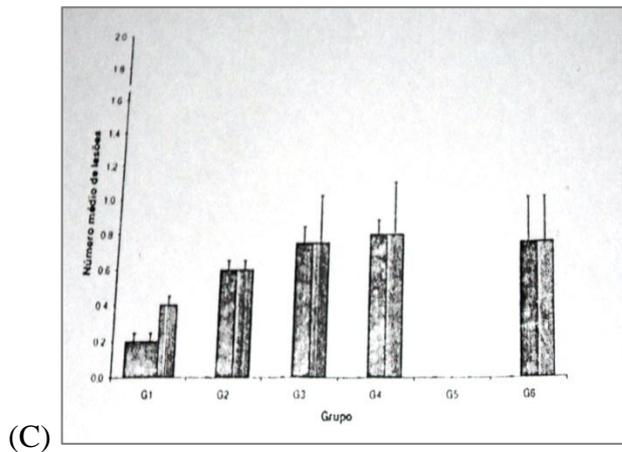
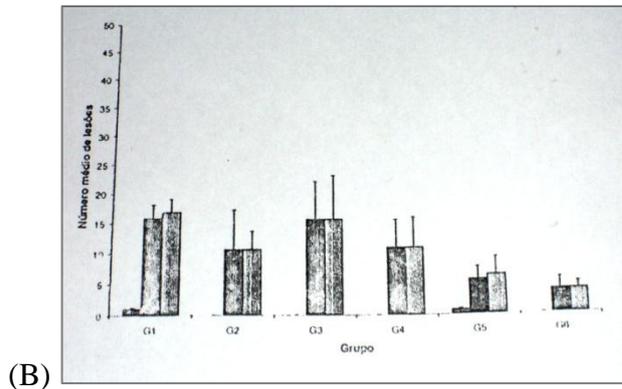
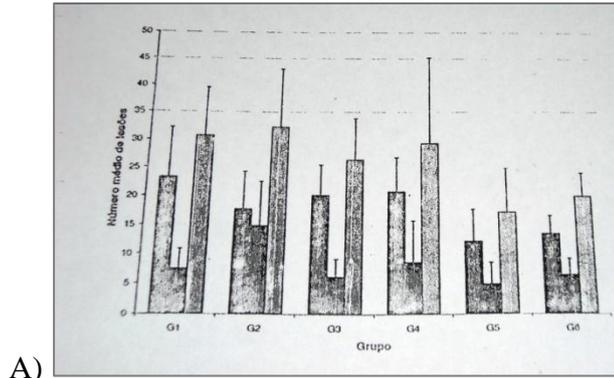


Figura 6A, 6B e 6C - Número médio de lesões histopatológicas observadas em fígado, intestino e baço de camundongos infectados pelo *S. mansoni*. A, Fígado; B, Intestino; e, C Baço. Granuloma; Granuloma com ovos de *S. mansoni*; e, Total. G1, Controle (NaCl^+ 150 mM); G2, p-JU encapsulado em lipossomas (100 mg.KG^{-1} , 24 H após a infecção); G-3, P-JU livre (100 mg.kg^{-1} , 24 h após a infecção); G4, Lipossomas vazios; G5, P-JU encapsulado em lipossomas (100 mg.kg^{-1} , 42º dia após a infecção); e. G6, P-JU livre (100 mg.kg^{-1} , 42º dia após a infecção).

6.4 DISCUSSÃO FINAL

A atividade biológica dos polissacarídeos pode ser considerada em função de sua estrutura química e de seu efeito sobre o sistema imune. Tais observações são relacionadas à atividade anti-tumoral dos polissacarídeos, que ainda é a abordagem mais freqüente.. Persistem dúvidas e resultados contraditórios, a respeito do grande número de relatos. Aceita-se que as (1→3)- β-D -glucanas, substituídas por unidades de *Glep* em 0-6 são as estruturas que apresetam um maio efeito anti-tumoral (BOHN & BEMILLER, 1995; KIDD, 2000).

Entre os fatores que podem influenciar a atividade anti-tumoral, citam-se:

a) estrutura da cadeia principal; b) grau de ramificação; c) presença de grupos substituintes; d) massa molecular e conformação (BOHN & BEMILLER, 1995).

a) **Estrutura da cadeia principal.** Os relatos indicam que as estruturas com cadeia principal β-(1→3) *Glep* apresentam a maior atividade anti-tumoral. Esses polissacarídeos podem ser aleatoriamente substituídos em 0-6, por unidades de β- D-*Glep*.,(BOHN & BEMILLER, 1995). O P JU apresenta uma cadeia constituída β-(1→3) – *Galp*, (MENESTRINA, *et al.*, 1998).

b) **Grau de ramificação.** O grau de atividade anti-tumoral das β-(1→3) - glucanas parece estar relacionado com a presença e o posicionamento de grupos ramificantes. Entre as (1→3), (1→6) - β-D- glucanas estudadas, as que apresentam grau de ramificação (DB) entre 0,20 e 0,33 são as mais ativas, a exemplo dos polissacarídeos de *Volvariella volvacea* (DB 0,20; MISAKI *et al.*, 1986; KISHIDA *et al.*, 1989), *Pleurotus ostreatus* (DB 0,25; YOSHIOKA *et al.*, 1985), *Amanita muscaria* (DB 0,28; KIHIO *et al.*, 1989) e *Lentinus edodes* (DB 0,33; CHIHARA *et al.*, 1970b). O grau de ramificação, se maior que 0,33, inversamente proporcional à atividade anti-tumoral, como observado para a fração CO-1, de *Cordyceps ophiogloissoides* (DB 0,37; YAMADA *et al.*, 1984), β - glucanas I, de *Auricularia auricula-judae* (DB 0,66; MISAKI *et al.*, 1981), e *Pestalotia sp.*, 815, com DB de 0,67 (MISAKI *et al.*, 1984).

c) **Grupos substituintes.** O P JU apresenta quatro substituintes distintos em 0-6: a) β-D –*Glep* A(1→6)- β-D –*Galp*-(1→6)-β-D -*Galp*-(1→6)-; b) α-D-*Galp*-(1→6)- D-*Galp*; c) α-L-Araf- (1→6)- D-Gal; e d)) α-L- *Rhap*- -(1→4)- β-D - *Glep* A (MENESTRINA *et al.*, 1998). O DB deste polissacarídeo não foi determinado,entretanto esses autores consideram o P JU como uma estrutura altamente ramificada, devido à necessidade de realizar três degradações de Smith consecutivas para remover os substituintes e caracterizar a estrutura da cadeia

principal. Tem sido descrita uma relação entre a presença de grupos substituintes e a potencialização do efeito biológico. A atividade ant- tumoral da α -D-Galp-(1 \rightarrow 3), -(1 \rightarrow 4)- D-glucana de *R. celastri* foi potencializada por sulfatação (CARNEIRO LEÃO *et al.*, ; 1997: CARNEIRO LEÃO, 1998). PROCÓPIO *et al.* (2000a e b) relataram a eficácia do tratamento utilizando este derivado sulfatado frente à infecção experimental por *S. mansoni*. A potencialização da atividade tem sido justificada por uma conformação mais ativa, ligação eletrostática ao receptor e/ou ligante, entre outros (BOHN & BEMILLER, 1995). Assim, a derivatização química do P JU representaria uma interessante possibilidades para potencializar o seu efeito biológico.

d) Massa molecular e conformação. Os polissacarídeos com maior atividade anti-tumoral são os que apresentam alta massa molecular (> 90000) e estruturas ordenadas, vesículas recobertas com polímeros como o polietilenoglicol. Por outro lado, a interação dos lipossomas com os macrófagos pode representar uma promissora opção terapêutica. Desta forma, considerável atenção tem sido dispensada à encapsulação de MRB em lipossomas, devido à habilidade natural destas vesículas em serem captadas por macrófagos e estimular sua atividade (KILLION & FIDLER, 1998). Uma vez que os polissacarídeos requerem uma etapa de captação pelos macrófagos, a encapsulação destas moléculas em lipossomas devido causar uma potencialização de seu efeito biológico. Os resultados apresentados neste trabalho, especialmente quanto ao efeito frente à infecção experimental pelo *S. mansoni* parecem reforçar tais observações.

6.5 PERSPECTIVAS

Algumas observações realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como os resultados obtidos, permitem traçar algumas perspectivas:

Outras informações propostas a partir de diferentes cargas na superfície podem ser desenvolvidas e otimizadas. A aplicação *in vitro* de tais formulações, a comparação dos possíveis efeitos terapêuticos e a investigação farmacocinética desses compostos poderia resultar em produtos de interesse terapêutico. O desenvolvimento de formulações mistas contendo drogas já utilizadas na terapêutica, como a oxaminiquina e o praziquantel (para a esquistossomose) ou quimioterápicos (para neoplasias) representa uma possibilidade para otimizar os resultados deste trabalho.

Quanto à atividade biológica do P JU encapsulado em lipossomas, pode-se considerar a realização de experimentos *in vitro*, com o objetivo de caracterizar melhor os efeitos obtidos, assim como elucidar aspectos de seu mecanismo de ação.

Visando padronizar o desenvolvimento dos tumores e, conseqüentemente, otimizar o estudo da atividade anti-tumoral do J PU livre e encapsulado em lipossomas, Uma possibilidade seria realizar curvas de crescimento com as células de S-180, a fim de avaliar as melhores condições experimentais.

Avaliações mais detalhadas a nível histopatológico, incluindo o uso de outras colorações, a exemplo do PAS (Ácido periódico de Schiff), Picro-Sirius, Tricrômicos de Gomori, Mallory ou Masson, e impregnação pela prata podem contribuir para uma melhor caracterização das alterações morfológicas encontradas. Com este mesmo objetivo, técnicas de morfometria também podem ser empregadas.

7.0 CONCLUSÕES

7.1 A melhor formulação de lipossomas contendo P JU foi obtida utilizando-se EP: CH: (7:2:1), a qual se apresentou estável pó 90 dias. A taxa de encapsulação de 42% considerada satisfatória, uma vez que o PJU apresentou uma pequena redução do teor encapsulado ao longo do tempo (14,2%).

7.2 Em relação à atividade anti-tumoral *in vivo*, frente ao Sarcoma 180, o P JU livre encapsulado em lipossomas não apresentaram um efeito estatisticamente significativo.

7.3 Quanto à infecção experimental pelo *S mansoni*, apenas o P JU encapsulado lipossomas, e administrado i.p 42 dias após a infecção, reduziu a eliminação de >88,1%), a recuperação de vermes adultos e machos do sistema porta-hepático Mesentérico (54,2% e 14,9% respectivamente), quando comparado aos grupos (NaCl e lipossomas vazios).

7.4 Do ponto de vista histopatológico, não foram observadas alterações qualitativas e quantitativas como efeito de animais infectados pelo *S. mansoni*.

7.5 Nenhuma alteração microscópica foi observada no fígado e baço de camundongos tratados com P JU livre e encapsulado em lipossomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H; POBER, J. S. Regulation of immune response. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. FI.; POBER, J. S. (eds.) **Cellular and molecular immunology**. 4.ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 2000a.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Immunity to parasites. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (eds.) **Cellular and molecular immunology**. 4. ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 2000b.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Immunity to tumors. In ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (eds.) **Cellular and molecular immunology**. 4. ed., Philadelphia: W. B. Saunders, 2000c.

AMSELEM, S.; CABIZON, A.; BARENHOLZ, Y. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for deinical use. **Am. Pharm. Assoc.** v. 79, p. 1045-1052, 1990.

ANKIPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Atacardium occidentale*. **Fisioterapia**. v. 72, p.286-7,2001.

ARANGO, G. H. Testes paramétricos. In: **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ARAÚJO, R. V. S.; PROCÓPIO, A. E. A.; SANTANA, J. V.; MALAGUEÑO, E.; LOPES, S, L.; CORIN.P. A. J.; IACOMINI, M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A. Effeet of the sulphated α -D-glucan from the lichen *Romalina celsa*stri in a mild experimentalinfection by *S. mansoni*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DEBIOQUIMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 30., 2001, Caxambu. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001. p. 83.

ASLANI, A.; SMITH, R. C.; ALLEN, B. J.; PAVLAAKIS, N.; LEVI. J. A. The predietive value of body protein for chemoterapy-induced toxicity. **Câncer**. v. 88, p . 796-803, 2000.

BABA, H.; KUNIMOTO, T.; NIITA, K.; SATO,K.; HASSHIMOTO. S.; KOHNO, M.;KITA, Y.; OGAWA, H. Rapid tumor regression and induction of tumor-regressing activity in serum by various immune-modulating agents. **Int. J. Immunopharmacol.** v. 8, p. -569- 572, 1986.

BANGHAM, A. D. Diffusion of' univalent ions across the lamellae of' swollenphospholipids. **J. Mol. Biol.** v. 13, p.238-252, 1965.

BARROS, L. M. Biologia Floral, Colheita e Rendimento. In : LIMA, V. P. M. S. **Acultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil/VETENE, 1988. p. 301-319.

BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R. Melhoramento genético do cajueiro In: ARAÚJO, S. P. P.; Silva, V. V. (eds.) **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: Embrapa-CNPC, 1995. p. 73-96.

BARROS, L. M.; MELO, Q. M. S. Alguns aspectos sobre a cultura do caju (*Anacardium occidentale L.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 9, p. 29-38, 1987 .

BENDAS G: immunoliposome: A promising approach to targeting cancer the Biodrugs. **Biodrugs**. v. 15, 215-224, 2001.

BIRONATTE, D.; NESLAND, J. M.; DALEN, H.; RISBERG, B.; BRYNE, M. N-G influence the in vitro adhesive and invasive behaviour of three metastatic cell **Tumour Biol**. v. 21, p. 165-75, 2000.

BLAIR, K. L.; BENNETT, J. L.; PAX, R. A. Praziquantel: physiological evidencesite(s) of action in magnesium-paralyzed *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**. v. 1 59-66, 1992.

BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Phythium aphanidern culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumour storage solubitised cell-wall (1→3). (1→6)-β-D- glucans. **Carbohydr. Res**. v 231, p. 29, 1992.

BLUME, C.; CEVC, G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo* **B.B.A**. v. 1146, p 157- 168, 1993.

BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1→3)- β-D- Glucans as biological response modified review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym**. v. 28, p. 1995.

BRADNER, W. T.; CLARKE, D. A.; STOCK, C. C. Stimulation of host defense experimental cancer. I. Zymosan and Sarcoma 180 in mice. **Câncer Res**. v. 18, p. 34, 1958.

BRASILEIRO FILHO, C. **Patologia Geral**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

BRINDLEY, P. J. Relationships between chemotherapy and immunity in *Schistosoma mansoni* **Adv. Parasitol.** v. 34, p. 133- 161, 1994.

BRUNET, L. R.; DUNNE, D. W.; PEARCE, E. J. Cytokine interaction and in responses during *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitol. Today.** v. 14, p.42.1998.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas GOODMAN GILMAN, A.; RALL, T. W.; NIES, A. S. (eds.) **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 96-124.

CAPRON, A. Schistosomiasis: forty years war on the worm. **Parasitol. Today.** Vol.379-384, 1998.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M.; IACOMINI BUCHI, D. F. Effect of the sulphated derivative of the α -D-glucan from the *Ramalina celestri* against HeLa cells. **Acta Microsc.** v. 6, Suppl. B, Set 97, p. 2, 1997.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A. **Atividade anti-tumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celestri***. 1998. 145p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Pará, Curitiba.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; SANTANA, J. V.; MALANGUEÑO, E.; LOPES, S. L.; KOBAYASHI, M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Effect of the sulphated derivative of α -D-glucan from the lichen *Ramalina celestri* against experimental schistosomiasis. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 28. , 1999, Caxambu. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1999. P. 114.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y. ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). **Nature.** V. 225. P. 943-944, 1970a.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y. Y. ARAI, Y.; FUKUOKA,, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus adodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). **Cancer Res.** V. 30. P. 2776-2781. 1970b.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER,S. L. Drug resistance in schistosomes.**Parasitol. Today.** V. 9. P. 162-166, 1993.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Neoplasia. In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS. S. L. (eds.) **Pathologic basis of disease.** 6. Ed. **Philadelphia:** W. B. Sauders, 2000.

CROMMELIN, D. J. A. Influence of lipid composition na dionic strength on the physical stability of liposomes. **J. Pharm. Sci.** v. 1559-1563, 1984.

DENNERT, G.; TUCKER, D. Antitumor polysaccharide lentinan- a T-cell adjuvant. **J. Natl. Cancer Inst.** V. 51, p. 1727-1729, 1973.

DIE, I. V.; GOMORD, V.; KOOYMAN, F. N.; BERG, T. K. V.; CUMMINGS, R. D.; VERVELD, L. Core α -(1 \rightarrow 3)- fucose is a common modification on N-glycans is parasitie helminths and constitutes an important epitope fo IgE fom *Haemaphysalis contortus* infected sheep. **FEBS Lett.** V. 463. P. 189-93, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS. P. A.: SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** V. 28. P. 350, 1956.

FALLON, P. G.; COOPER, R. O.; PROBERT, A. J.; DOENHOFF. M. J. Immunodepndent chemotherapy of Schistosomiasis. **Parasitology.** V. 105, Suppl...p.41-48, 1992.

FORNOVI, I. R.; RAMÓN, M. T. G.; RIVIEIRA, A. M. Métodos de preparación y caracterización de estructuras liposómicas. **Afinidad.** V. 46, p. 460-466, 1989.

FOSTER, R. The preclinical development of oxaminiquine. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo v. 15, p. 1-9, 1973.

FRANCA, F.; LAGO, E. L.; MARDSEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.* V. 29, p. 229-32, 1996.

FREZARD, F.; MELO, A. L. Evaluation of the schistosomical efficacy of liposomes entrapped oxamniquine, *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* v. 39, p.97-100, 1997.

GOMAA, K.; KRAUS, J.; FRANZ, G.; RÖPER, H. Structural investigations of glucans from cultures of *Glomerella cingulata* Spaulding & von Schrenck. **Carbohydr. Res.** v 217, p. 153-161, 1991.

CREGORIADIS, G. Drug entrapment in liposomes. **FEBS Lett.** v. 36, p. 292-296, 1973.

HABA, S.; FHAMAOKA, T.; TAKATSU, K.; KITAGAWA, W. Selective suppression of T-cell activity in tumor-bearing mice and its improvement by lentinan, a potent antitumor polysaccharide. **Int. J. Cancer.** v.18, p. 93-104, 1976.

HAGAN, P.; NDHLOVI, P. D.; DUNNE, D. Schistosome immunology: more questions the answers. **Parasitol. Today.** v.14, p.407-412, 1998.

HAMILTON, J. V.; CHIODINI, P. L.; FALLON, P.G.; DOENHOFF, M. J. Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemoeyanin (KLH) and serodiagnostic *Schistosoma mansoni* egg antigens. **Parasitology.** V. 118, p 83-89, 1999.

HAMURO, J.; RÖLLINGHOFF, M.; WAGNER, H. β -(1 \rightarrow 3) - Glucan-mediated augmentation of alloreactive murine cytotoxic T-lymphocytes *in vivo*. **Cancer Res.** v 38, p 3080-3085, 1978.

HAMURO, J.; CHIRARA, G. Lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator: its experimental and clinical application, and possible mechanism of immune modulation. In: FENICHEL, R., L., CHIRIGOS, M. A. (eds.) **Immune modulation agents and their mechanisms.** 1985. p. 409-436.

HAN, S.B.; LEE, C. W.; JEON, Y. J.; HONG, N.D.; YOO, I.D.; YANG, K.; KIM, H. M. The inhibitory effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology.** v.41, p. 157-164, 1999.

HASLLIN, C.; LAHAYE, M.; PELLEGRINI, M.; CHERMANN, J.C. *In vitro* anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tefrasporic stages of the Mediterranean red alga *Aspargopsis armata*. **Planta Med.** v. 4, p. 301-305.

HO, C. Y.; LO, T. W. C.; LEUNG, K. N.; immunostimulating activities of anti-tumor polysaccharide antigen isolated from *Klebsiella pneumonia*. **Immunopharmacol.** v.46, p. 1-13, 2000.

HOWARD, C. A.; NICHOLAS, G. P.; LOYD, V. A. **Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos.** 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

HUSSAR, D. A. New drugs 2000. **Part II. Nursing.** v. 30, p. 55-62, 2000a.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/ibge/default.php>>. Acesso em: 21 ago. 2001.

INCA. Instituto Nacional do câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil Disponível em: <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2001/neoplasia.html>>. Acesso em: 22ago. 2001.

JACOBSON, K.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. **Biochem.** V. 14, p. 152- 161, 1975.

JAMSHAD, M.; FARR. S. J.; KEANEY, I. W. Poloxamer sorption on liposomes: comparison: with polystyrene latex and influence on solute efflux. **Int. J. Pharm.**v. 48. p. 125- 131, 1988.

JANEWAY, C. A. ; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia, o sistema biológico na saúde e na doença.** 4. ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul, 2000.

JOHNSON. D. The botany origin and spread of the cashew *Anacardium occidentale h.- J. Plant. Crops.* v. 90, p. 191-4, 1995.

JUBERG, P.; SARQUIS. O.; DOS SANTOS, J. A.; FERREIRA, R. Effect of niclosamide (Bayluscide WP70). *Anacardium occidentale* hexane extract and *Euphorbia apledens* látex on behavior of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), under laboratory conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v 90. P. 191-4, 1995.

KHOO, K.H.; CHATTERJEE, D.; CAULFIELD. J. P.; MORRIS, H. R.; DELL, A. Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum*: identifications of novel core structures and terminal sequences. **Glycobiol.** v. 7, p. 663-667, 1997.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Altern. Med. Rev.** v. 5, p. 4-27, 2000.

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; NAGAI, K.; UKAI, S.; HARA, C. (1→3) - α -D-Glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O- (carboxymethyl)ated derivatives. **Carbohydr. Res.** v. 189, p. 273-279, 1989.

KIHO, T.; KATSURAGAWA, M.; NAGAI, K.; UKAI, S.; HAGA, M. Structure and antitumor activity of a branched (1→3) - D- glucan from the alkaline extract of *Amanita muscaria*. **Carbohydr. Res.** v. 224, p. 237-243, 1992.

KILLION, J. J.; FIDLER, I. J. Therapy of cancer metastasis by tumoricidal activation of tissue macrophages using liposome-encapsulated immunomodulators. **Pharmacol. Ther.** v. 78, p. 141-154, 1998.

KISHIDA, E.; SONE, Y.; MISAKI, A. Purification of an antitumor-active, branched (1→3) - D- glucan from *Volvariella volvacea*, and elucidation of its fine structure. **Carbohydr. Res.** v. 193, p. 227-239, 1989.

KITAMURA, S.; HORI, T.; KURITA, K.; TAKEO, K.; HARA, C.; ITOH, W.; TABATA, K.; ELGSAETER, A.; STOKKE, B. T. An antitumor, branched (1→3) - D- glucan from a water-extract of fruiting bodies of *Cryptoporus volvatus*. **Carbohydr. Res.** v. 263, p. 111-121, 1994.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. *Anti-heliobacter pylori* agents from the cashew apple. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, p. 533-7, 1999.

KUDI, A. C.; UMOH, J. U.; EDUVIE, L. O.; GEFU, J. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.** v. 67, p. 225-8, 1999.

LASIC, D.; MARTIN, F. J. Liposomes. **Farm. Vestn. Ljubljana**, v. 40, p. 197-208, 1989.

LEDDERKREMER, R. M.; COUTO, A.; RUMI, L. S.; CHAISSEING, N. A. Purification of a new polysaccharide from *Cyttaria johowii* (Esp) and studies on its antitumor activity. **Carbohydr. Res.** v. 113, p. 331-335, 1983.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, E. M. **Lipossomas: Estrutura, propriedades e aplicações.** 1995. 209 p. Tese(Mestrado em Fármacos e Medicamentos), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

LIMA, V. P. M. S. Botânica. In: LIMA, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no nordeste do Brasil.** Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil/ETENE. 1988. p.15–61.

LINDER, E.; THORS, C. *Schistosoma mansoni*: Praziquantet-induced tegumental lesions exposes actin of surface spines and-allows binding of actin depolymerizing factor. gelsolin. **Parasitol.** v. 105, p.71-79, 1992.

MAGALHÃES FILHO, A.; SILVA, J. F. Patologia e patogenia da esquistossomose mansônica'. In: MALTA, J. (eds.) *Esquistossomose mansônica.* Recife: Universitária, 1994. p.61 -80.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; MARIA, S. S. Morte celular. In: CARVALHO, H. F.;RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001.** Barueri: Manole, 2001. p.275-281.

MENDES, N. M.; OLIVEIRA, A. B.; GUIMARÃES, J. E.; PEREIRA, J. P.; KATZ, N. Molluscicide activity of a mixture of -N- alkyl salicylic acids (anacardic acid) and 2 of its complexes with copper (II) and lead (II). **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 23, p. 217-24, 1990.

MENESTRINA, J. M; CARNEIRO LEÃO, A.M. A.; STUELP, P.M.; MACHADO, M. J.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Partial characterization and anti-tumoral activity of the polysaccharide from cashew gum. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 25., 1996, Caxambu. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1996. P. 116.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P.A.J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudates os *Anacardium occidentale*. **Phytochem.** v. 47, p. 715-721, 1998.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica.** 2.ed. São Paulo:Michalany, 1991

MINISTERIO DA SAUDE. Informações em saúde. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/informe/bolet.htm>>. Acesso em : 22 agos. 2001.

MISAKI, A.; KAKUTA, M.; SASAKI, T.; TANAKA, M.; MIYAJI, H. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3) – β-D.- glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other

polysaccharides containing (1→3) glycosidic linkages. **Carbohydr. Res.** v.92, p. 115-129, 1981.

MISAKI, A.; KAWAGUCHI, K.; MIYAJI, H NAGAE, H.; HOKKOKU, S.; KAKUTA, M.; SASAKI, T. Structure of *pestalotan*, a highly branched (1→3) – β- D.- glucan elaborated by *Pestalotia sp.* 815, and the enhancement of its antitumor activity by poliol modification of the side chains. **Carbohydr. Res.** v. 129, p. 209-227, 1984.

MITCHELL, J. D.; MORI, S. A. The cashew and relatives (Anacardioum: Anacardiasceae). Mem. N. York Bot. Gard . v. 42, p.1- 72, 1987.

MITCHELL, M. S. Combining chenrothenaphy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 80, p. 1445-1450, 1988.

MIURA, T.; OHNO, N.; SUDA, M.; MIURA, N. N.; SHIMADA, S.; YADOMAE, T. Inactivation of (1→3) – β- D.- glucan in mice. **Biol Pharm. Bull.** v.18, p. 1797-1801, 1995.

MIZUNO, T.; OHSAWA, K.; HAGIWARA, N KUBOYAMA, R. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maiatake, *Grifola frondosa*. **Agric. Biol. Chem.** V. 50, p. 1679- 1988, 1986.

MIZUNO, T.; ANDO, M.; SUCIE, R.; ITO, H.; SHIMURA, K; SUMIYA, T.; MATSUURA, A. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edeiblemushroom, Ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of Polyporous confluens. **Biosci. Biotech. Biochem.** v. 56, p. 34-41, 1992.

MIZUNO, T.; KINOSHITA, T.; ZHUAG, C.; ITO, H.; MAYUZUMI, Y. Antitumor-active heteroglycans from Niohshimeji mushroom, *Tricoloma giganteum*. **Biosci. Biotech. Biochem.** v.59, p. 59, p 568-571, 1995.

MUELLER, R. SHEIDT, S. –History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for, the future. **Circulation.** v. 89, p. 432-449, 1994.

MÜLLER, B. m.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Chemical structure and biological activity of, water-soluble polysaccharides from *Cassia angustifolia* leaves. **Planta Med.** v. 55, p. 536-539, 1989.

NAMBER, M.C.; Cashew: In: KOZLOWSKI, T.T. (ed.) **Ecophysiology of Tropical crops.** London: Academic Press, 1977. 502 p.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, M. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2000. p. 212-234.

NYAME, A. K.; LEPPANEN, A. M.; DeBOSE-BOYD, R.; CUMMINGS, R. D. Mice infected with *Schistosoma mansoni* generate antibodies to LacdiNAc – (GalNAc- β -(1 \rightarrow 4) – (GlcNAc) determinants. **Glicobiol.** v. 9, p. 1029-1035, 1999.

OHLER, J. G. **Cashew** Amsterdam: Koninkrijk Instituut voer de tropen, 1979, 260 p.

OHNO, N.; TERUI, T.; CHIBA, N.; KURACHI, K.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Resistance of highly branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans to formolysis. **Chem. Pharm. Bull.** v. 43, p. 1057-1060, 1995.

OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. **Biol. Pharm. Bull.** V. 18, p 1320-1327, 1995.

OLIVEIRA, A. C. P. **Formulação e caracterização físico-química de carreadores coloidais de penicilina G benzatina e estudo comparativo da cinética de liberação *in vitro***. 1998. 75 p. Teses (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

OLIVEIRA, C. C. G. **Identificação de antígenos comuns entre miracídeo de *Schistosoma mansoni* e seus hospedeiros intermediários, pertencentes ao gênero *Biomphalaria*** 1994. 69 p. Tese (Mestrado em Biofísica) Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** p 19-32, 1952.

OUSSOSEM, W. M.C.; ELING, D.J.A.; CROMMELIN, G.; STORM, J. The influence of the route administration and liposome composition on the potential of liposomes to protect tissue against local toxicity of two antitumor drugs, *B. B.B.A.* p. 159-172, 1998.

PARK J. W.; KIR'PTTN D. B.; HONG K.; SHALABY R.; SHAO L.; NIELSEN U. B.; MARKS J. D.; PAPAHADJOPOULOS, D. Tumor targeting using immunoliposomes. *J. Contr. Release.* v. 74, p. 95-113, 2001

.

PAULA, R. C. M. ; RODRIGUE.S, J. F. Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polym.** v. 26, p.177-181, 1995.

PAX, R.; BENNET, J. L.; FETTERER, R. A Benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. **Naunynada**, arch. Pharmacol. p. 309-315, 1978.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**, 11. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE, M. K. (ed.) Tissue culture: methods and applications. New York: Academic Press, 1973 .p.406-8.

PROCÓPIO, A. E. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LOPES, S. L.; LIMA- FILHO, J. L.; GRIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A. Further studies about the effect of the sulphated- α -D- glucan from *Ramalina celastri* against experimental schistosomiasis. In Reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular, 29., 2000a, Caxambu. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000. p. 111.

PROCÓPIO, A, E. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LOPES, S. L.; DUARTE ,H. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A effect of the sulphated- α -D- glucan from *Ramalina celastri* on histopathological liver injuries caused by *S. mansoni* infection. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E FISILOGIA MOLECULAR, 29., 2000b. Caxambu. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000. p. 111.

PUSIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. S. T. P. **Pharma Sci**, p. 107- 113, 1989.

RAVILY, V.; SANTANELLA, C.; VIERLING, GULIK, A. Phase behavior of fluocarbon di-*o*-alkyl-glycerophosphocholines and glycerophosphoethanolamines and long term shelf stability of fluorinated liposomes. B. B. A. v. 1324, p.1-17 , 1997.

REN, D. L.; WANG, J. Z.; NODA, H.; AMANO, H.; OCAWA, S. The effects of an algal polysaccharide from *Gloiopeltis tenax* on transplantable tumor and immune in mice. **Planta Med.** v.61, p. 120-125, 1995.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 158-160.

ROCHA, C.; MENEZES, F. F.; LOPES, S. M. L.; IACOMINI, M.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. Effect of the polysaccharide from *Anacardium occidentale* in skin wound healing. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 29., 2000b. Caxambu. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001. p. 83.

SAITÔ, H.; OHKI, T.; TAKASURA, N.; SASAKI, T. A ^{13}C - NMR-spectral study of a gelforming branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight **Carbohydr. Res.** v. 58, p. 293_305, 1977.

SAITÔ, H.; YOSHIOKA, Y.; UEHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. Relationship between conformation and biological response for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and hostmediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. **Carbohydr. Res.** v 217, p.181-190, 1991.

SIKIK, I. New approaches in cancer treatment. **Ann. Oncol.** Suppl 6: 149-53, 1999.

SILVA, J. R. Interação de lipossomas de penicilina G benzantina com células HEP-2. 1997. 52 p. Tese (Mestrado em bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

SOARES, J. B. **O caju: aspectos tecnológicos.** Fortaleza, Banco Nordeste Brasil, 1986.

STEVAN, F. R.; MENESTRINA, J. M., S. ; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Biological activities os polysaccharide from gum A. Occidentale exsudate against HELA BIOLOGIA MOLECULAR, 29., 200, Caxumba. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000. P. 111.

STUELP, P. M. **Atividade anti-coagulante de α e β -D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celestri* modificadas quimicamente.** 1997. 114 p. Tese (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

STRICKER, H.; KIBAT. P. G. Storage satability of aqueous lipossoma dispersions. In: SCHMIDT, K. H. (ed) **Lipossomas as drug carriers.** Stugart: Georg Thieme, 1985. P. 48-60.

SUDA, M.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Modulation of the antitumor effect and tissue distribution of highly branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, SSG, by carrageenan. **Biol. Pharm. Bull.** v. 18, p. 772-775, 1995.

SUGA, T.; SHIIO, T.; MAEDA, Y. Y.; CHIHARA, G. Antitumor activity of lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive affect on 3-methylcholantrenc-induced carcinogenesis. **Cancer Res.** v. p. 5132-5137, 1984.

SZOKA, F.; PAPAHADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.** v. 9, p.467-508.

TEIXEIRA, K. M.; COUTINHO, E. M.; ABATH, F. G. C.; MONTENEGRO, S. M. L. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni*. II *Corynebacterium parvum*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 38, p 359-363, 1996.

TORCHILLIN, V. P.; OMELIANENKO, V. G.; PAPISOV, M. I.; BOGDANOV Jr., A. A.; TRUBETSKOY, V. S.; HERRON, J. N.; GENTRY, C. A. Poly(ethyleneglycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. **B. B. A.** v. 1995, p. 11-20, 1994.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K. The role of altered $(Ca^{2+})_I$ regulation in apoptosis, oncosis and necrosis. **B. B. A.** v. 1313, p. 173-178, 1996.

TURANEK J.; ZALUSKA D.; VACEK A.; BORKOVCOVA P.; THURNVALDOVA J.; BLAHA, L.; MASEK, K. Stimulation of nonspecific immunity, haemopoiesis and incorporated in liposomes. **Int. Immunopharmacol.** V. 1, p. 167-75, 2001.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Encapsulation of water soluble drug in a liposome preparation: removal of free drug by washing. **Drug Develop. Pharm.** V. 21. P. 1329-1338, 1995.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística.** Rio de Janeiro: Ed. Campus, 1981. P. 141-156.

WAIT, A. J.; JAMIERSON. G. I. The cashew: its botany and cultivation. **Queensland Agric. J.** p.235-257, 1986.

WEISS, G. R. Chemotherapy. I: WEISS, G. R. (ed) **Clinical oncology.** New Jersey: Prentice Hall, 1993. P.97-109.

WHISTLER, R. L.; BUSHWAY, A. A.; SIGH, P. P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** V. 32. P.235-275, 1976.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. TROPICAL DISEASES RESEARCH. Shistosomiasis. In: WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. TROPICAL DISEASES RESEARCH. Schistosomiasis. Progress 1975-1994: Highlights 1993-1994. Twelfth programme report of UNDP/ World Bank/ WHO Special programme for research and training in tropical diseases. Geneva, 1995. Cap. 5, p. 77-86.

WONG, J. P.; CRERWONOGRODZKY, J. W.; DI NINNO, V. L.; STANDNYK, L. L.; KNODEL, M. H. Lopsome potentiation of humoral immune response to lipopolysaccharide and O-polysaccharide antigens of *Brucella abortus*. **Immunol.** V. 1, p. 123-138, 1992.

YAMADA, H.; KAWAGUCHI, N.; OHMORI, T.; TAKESHITA, Y.; TANEYA, S. -I.; MIYAZAKI, T. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. **Carbohydr. Res.** V. 125, p. 107-115, 1984.

YAMADA, H.; KOMIYAMA, K.; KIYOHARA, H.; CYONG, J. -C.; HIRAKAWA, Y.; OTSUKA, Y. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from the roots of *Angelica acutiloba*. **Planta Med.** V. 56, p. 182-186, 1990.

YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITÔ, H.; UEHARA, N.; FUKUIKA, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (F FR) QUÉL.: isolation and structure of a β -glucan. **Carbohydr. Res.** V. 140, p. 93-100, 1985.

ZAKÁNY, J.; CHIHARA, G.; FACHET, J. Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic hosts. **Int. J. Cancer.** v. 25, p. 371-376, 1980.

ZANOTTI-MAGALHAES, M.; MAGALHAES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Shistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Pública.** v. 27, p. 412-20, 1993.

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thumbergii*). **Biosci. Biotech. Biochem.** v. 59, p. 563-567, 1995.

ZUCHERBERG, C. **Estructura e histoquímica del Sarcoma 180**. 1972. 55 p. Tese (Doutorado em Medicina), Faculdade de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.