

# AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA $\beta$ -LAPACHONA NA FORMA LIVRE E ENCAPSULADA EM SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Érika Cristina Gonçalves Mousinho da Silva<sup>1</sup>; Rosa Valéria da Silva Amorim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Bacharelado em Farmácia - UNINASSAU; E-mail: erika\_mousinho@hotmail.com

<sup>2</sup>Docente/Pesquisador do Depto de Histologia e Embriologia - CCB - UFPE; E-mail: rosa.amorim@ufpe.br

**Sumário:** A B-lapachona ( $\beta$ -LAP), uma ortonaftoquinona sintetizada a partir do lapachol que é obtido da família das Bignoneaceae, e com atividade antitumoral, apresenta uma utilização farmacêutica limitada pela sua alta toxicidade. Tem sido bastante estudada, visando sua utilização na terapia contra o câncer, através de estudos que possam contornar sua toxicidade e a pouca solubilidade em água, possibilitando sua utilização para fins de uso médico. O presente estudo investiga diferentes formas de associação da B-lapachona a polímeros bioadesivos, seja na forma de nanopartículas de poly (methyl-co-maleic anhydride), formuladas pelo método de evaporação do solvente ou em conjugação a quitosana e avaliação da sua ação adjuvante, para minimizar o potencial toxicológico da B-LAP, que foi analisada através de ensaios de toxicidade aguda para avaliação do efeito hepatoprotetor da quitosana, após administração oral dos conjugados, em camundongos Swiss. Caracterizou-se as formulações de acordo com os parâmetros físico-químicos e morfológicos e para os estudos de toxicidade aguda da droga, administrou-se por via oral, em camundongos albinos fêmeas, a B-LAP em sua forma livre e conjugada à quitosana na dose de 80mg/kg, quando conjugada foi utilizada a proporção B-LAP/quitosana de 1:1. Após administração oral os animais foram observados quanto aos sinais clínicos apresentados e sacrificados para extração de órgãos objetivando a realização de estudos de alterações bioquímicas no soro e alterações histopatológicas a nível de fígado, rins e baço. Observou-se em análise comparativa, apenas alterações morfológicas a nível hepático, nos animais tratados com a B-LAP livre, onde se detectou a presença de vacuolização do citoplasma, quando comparada ao controle, alterações está que não foi detectada no fígado do animal submetido à B-LAP conjugada a quitosana.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -lapachona; chitosan; nanoparticles; toxicidade aguda.

## INTRODUÇÃO

A B-LAP apresenta uma utilização farmacêutica limitada pela sua alta toxicidade e em virtude de suas propriedades farmacológicas, a B-LAP tem sido bastante estudada visando sua utilização na terapêutica em diversas doenças e em especial em diferentes tipos de câncer. A alta toxicidade e a pouca solubilidade em água da B-LAP tornam essa droga anticâncer de limitado uso médico para a sua administração in vivo apresentando muitos problemas a serem solucionados, tais como: eficiência de ação bastante limitada, baixa biodisponibilidade e alta citotoxicidade, causando forte efeito colateral, precisando, portanto, de uma estratégia alternativa para melhorar sua eficácia em uma possível terapia. O desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, utilizando polímeros bioadesivos, tem recebido bastante atenção para o estudo de sistemas de liberação controlada de agentes farmacologicamente ativos, administrados por via oral, pois tem demonstrado ser uma importante estratégia para contornar suas toxicidades e a pouca solubilidade em água (HEJAZI et al, 2002). Por outro lado, a via oral é um dos modos preferidos para a administração de medicamentos. No entanto, uma grande quantidade dessas drogas

permanece pouco disponível quando administrado por esta via. Uma possível estratégia para contornar ou minimizar estas propriedades indesejáveis e, assim, melhorar a absorção da B-LAP e sua ação pode ser a utilização de nanopartículas biodegradáveis com propriedades bioadesivas, com potencial uso para administração oral.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) (Sigma-Aldrich); A B-lapachona será cedida pelo Prof. Celso de Amorim Câmara (UFRPE), ácido acético, NaOH, KCl, CaCl<sub>2</sub>, tampões Fosfato de Potássio e HCl/KCl, entre outros. Todos os reagentes serão de grau analítico.

**Animais** - foram utilizados, Camundongos Albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas com seis meses de idade e com peso variando entre 25 a 40 g, provenientes do Biotério Depto. Antibióticos. Os animais receberam água e dieta *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 2$  °C). O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal de Pernambuco sob Protocolo de nº 23076.016084/2014-29.

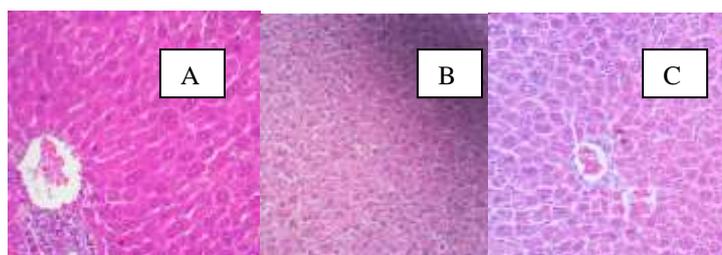
Foram preparadas nanopartículas com o copolímero mucoadesivo poly(methylco-maleic anhydride) ou Gantrez® para encapsulação da B-LAP, denominada assim NpBIO-B-LAP, pelo método de evaporação do solvente em rotavapor. Foi realizada a quantificação da eficiência de encapsulação (EE%) da B-LAP a partir das NpBIO. O diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta das NpBIO foram determinados por Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) e Anemometria Laser Doppler eletroforética, respectivamente, usando um sistema de analisador de Zetamaster (CETENE). Quitosanas de baixo e médio peso molecular foram purificadas e despolimerizadas para formação do conjugado quitosana/B-LAP, para isso a solução da  $\beta$ -LAP dissolvida em etanol 70% foi associada a uma solução da quitosana dissolvida em ácido acético, ambas na proporção (1:1). O conjugado foi liofilizado e armazenado para posterior uso. Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas, divididos em grupos de seis animais para B-LAP livre e seis para o conjugado B-LAP-QSDp. Foram administradas aos animais, doses únicas por via oral (80 mg/Kg), na forma livre e conjugada a quitosana, ambas dissolvidas em água destilada, sendo que no grupo controle os animais receberam solução salina, 0,5%. Nos ensaios foram observados os sinais clínicos e peso dos animais, dos diferentes grupos, durante 30 minutos, e depois a cada 24hs, por um período de 14 dias. Ao final do ensaio, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo removido 1 mL de sangue para testes bioquímicos e os órgãos (Fígado, Rins e Baço) para análises histomorfológicas. Os órgãos foram depositados em formaldeído 10% e em seguida, realizaram-se procedimentos padrão para processamento e preparação de cortes histológicos que foram observados posteriormente em microscópio óptico para avaliação de alterações hepáticas, renais e esplênicas.

### RESULTADOS

As nanopartículas bioadesivas NpBIO-B-LAP apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de  $213,0 \pm 0,1$ , um índice de polidispersão PDI de  $0,111 \pm 0,008$  e o potencial zeta de  $-44,2 \pm 16,2$ . A eficiência de encapsulação foi de  $38,0 \pm 6,4$ , devido ao baixo percentual de encapsulação obtido, não foi possível a realização do ensaio de toxicidade aguda com esta amostra. Alternativamente, foi realizado a conjugação da B-LAP com a quitosana purificada e depolimerizada, para os estudos de toxicidade aguda. Ao realizar a observação dos comportamentos dos animais, tratados com a droga livre e conjugadas alterações de comportamento foram observadas, dentre estas, o movimento estereotipado mostrou-se intenso nas duas apresentações da droga. Notou-se também nos dois grupo um aumento

moderado nas frequências cardíaca e respiratória. Tais sinais apresentados foram observados nos primeiros 30 minutos da administração. Observou-se também que não houve perda de peso corporal dos animais, nos grupos estudados.

As análises histológicas de rim, baço e fígado foram realizadas e foi observado apenas alterações a nível hepático, nos animais tratados com a B-LAP livre, onde se detectou a presença de vacuolização do citoplasma, próximo ao núcleo, quando comparada ao controle, alterações está que não foi detectada no fígado do animal submetido à B-LAP conjugada (figura 1), propondo assim um efeito hepatoprotetor da quitosana frente a ação da tóxica B-LAP.



**Figura 1** – Corte de Fígado de camundongo albinos Swiss (A-Controle, B- $\beta$ -LAP livre, C-B-LAP-QsDp). Aumento final 400X HE.

## DISCUSSÃO

A B-LAP tem sido mundialmente alvo de estudos, desde o início da década de 90, devido ao excelente potencial farmacológico *in vitro* e *in vivo*, quanto às atividades antitumorais e antivirais. Entretanto, devido à sua alta toxicidade e pouca solubilidade em água, existe atualmente uma grande limitação no uso clínico deste composto. A exposição crônica a B-LAP em camundongos pode produzir efeitos tóxicos imprevisíveis a depender dos níveis de dose. Medeiros et. al., 2012 observou que a dose de 10mg/kg da B-LAP dissolvida em DMSO a 10%, não foi notadamente tóxica para camundongos imunossuprimidos (IS), após uma semana de exposição crônica, enquanto os animais tratados com 20mg/kg apresentaram lesões na cauda que se tornaram necróticas. Em ratos albinos é referido na literatura uma  $DL_{50}$  da B-LAP de 80 mg/kg via intraperitoneal (SANTANA et. al., 1968). Estudos histomorfológicos em órgãos como fígado, rim e baço são comuns na literatura revelando um papel importante, especialmente quando se quer avaliar o potencial de toxicidade de novas substâncias e formulações para fins terapêuticos (SANTANA et al., 2015). Análises histológicas feitas com substâncias tóxicas de origem sintética ou natural demonstram que os órgãos mais afetados são o fígado, apresentando alterações nos hepatócitos do tipo edema, focos de infiltrado inflamatório, hemorragia e aumento de presença de mitose e os rins apresentando hemorragia, congestão vascular e presença de cristais hemáticos. Também é ressaltado que as alterações variam de leve a acentuada dependendo do tipo e da concentração da substância (MARTINS et al, 2009). A avaliação toxicológica de novas substâncias – quando estas apresentam elevada toxicidade – demonstram que é comum, principalmente no tecido hepático, haver alteração celular, dependendo da concentração administrada, podendo ser reversível ou não a recuperação desses órgãos (VASCONCELOS et al, 2007). No presente estudo foi encontrada alteração a nível hepático. O que pode ser justificada pelo fato de que o fígado é geralmente o órgão mais acometido quando se administram determinadas substâncias. O que é provável devido a fatores como a posição anatômica, que o torna mais vulnerável e sua própria característica funcional (MENDES, 1988). É importante a realização de análises de possíveis alterações em órgãos como o fígado, quando se utiliza produto de origem natural de propriedades desconhecidas, no intuito de investigar distúrbios hepáticos ocasionados por parte de certas drogas e realizar análises histopatológicas a fim de verificar

interferências na atividade normal do fígado (SILVA et al., 2014). É no fígado onde ocorre a metabolização de drogas e detoxificação de substâncias, portanto a verificação de toxicidade hepática em ensaios pré-clínicos é de grande importância para uso terapêutico de novas drogas. Lesões neste órgão vital inviabilizam a adoção de novas terapias que poderiam ser eficazes no tratamento de diferentes doenças (FOLGUEIRA; BRENTANI, 2004).

### CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a utilização da quitosana em conjugação com a B-LAP, em estudos de toxicidade aguda, através da administração oral em camundongos Swiss, possibilitou uma maior absorção da droga, que apresenta pouca solubilidade em água, e associado a isto apresentou um efeito adjuvante, quando minimizou ou preveniu os efeitos histopatológicos no fígado, comparado ao observado nos animais administrados com a B-LAP livre.

### AGRADECIMENTOS

Os autoras agradecem ao Prof. Celso de Amorim Câmara (UFRPE) pelo fornecimento da B-LAP, a Profa. Ivone Antônia de Souza (Dpto. Antibióticos-UFPE) pela colaboração nos estudos de toxicidade aguda ao CETENE pelas análises no Zetamaster e finalmente a PROPESQ-UFPE em conceder a Bolsa de Iniciação Científica.

### REFERÊNCIAS

- FOLGUEIRA, M. A. A. K; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. Oncologia molecular. Editora Atheneu, São Paulo, p. 135-144, 2004.
- JIHONG XU, GAIL WAGONER, JAMES C. DOUGLAS, PAUL D. DREW  $\beta$ -Lapachone ameliorization of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 254: 46-54, 2013.
- MENDES F. T. Fígado e drogas. In: Dani, R, Castro, LP. *Gastroenterologia clínica*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 80, p.1035-1042, 1988.
- MARTINS, V.G. Avaliação da toxicidade de substâncias antivirais derivadas de Algas Marinhas e substâncias sintéticas em camundongos BALB/c. Dissertação de Mestrado 2009.
- MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J. COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. *Toxicology Applied Pharmacology*, 17: 01 – 11. 1970.
- RIBEIRO, A. F. Alterações histológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos, Dissertação de Mestrado, 2012.
- SANTANA CF, LIMA OG, D'ALBUQUERQUE IL. Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (Tabebuia avellanedae). *Rev Inst Antib* 8 (1/2): 89 – 94, 1968.
- SANTANA, M. A. N, SILVA, I. B, BARBOSA, J.A P., LIMA, I. R. VIEIRA, J. R. C., LIMA, LEITE, R. M. P, LEITE, S. P. L. Histomorphometric analysis in kidney tissue of mice treated with *Indigofera Suffruticosa* Mill. *Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ISSN, 0975-1491, 2015.
- SILVA, I. B. LIMA, I. R. SANTANA, M. A N. LEITE, R. M. P, LEITE, S. P. L. *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae): Hepatic Responses in Mice Bearing Sarcoma 180. *Int. J. Morphol.*, 32, 1228-1233, 2014.
- VASCONCELOS, T. H. C., MODESTO-FILHO, J., DINIZ, M. F. M., SANTOS, H. B., AGUIAR, F. B., MOREIRA, P. V. L. Estudo Toxicológico Pré-Clínico Agudo com o Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(4): 583-591, 2007.

