

AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE E CAPTAÇÃO CELULAR DO ÁCIDO BARBÁTICO *CLADONIA SALZMANNII* ENCAPSULADO FRENTE A CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO CARCINOMA DE EHRLICH.

Juliana de Oliveira Costa¹; Noemia Pereira da Silva Santos²

¹Estudante do Curso de Nutrição- CAV – UFPE; E-mail: ²Docente/pesquisador do Depto de – CAV – UFPE: npereiradasilvasantos@gmail.com.

Sumário: Este trabalho visa a avaliação da citotoxicidade e captação celular de ácido barbático de *Cladonia salzmannii* encapsulado frente ao tumor ascítico sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich. Os lipossomas convencionais (AB-LC) e furtivos (AB-LF) foram produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico. A citotoxicidade foi avaliada frente a células ascíticas de tumores experimentais Sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich e células indiferenciadas de macrófagos J774. A captação de AB-LC e AB-LF por células do tumor ascítico experimental S-180 foi investigada por microscopia de fluorescência. Os valores de IC₅₀ foram maiores para as células J774, sugerindo inibição tumoral *in vitro* e baixa toxicidade para células saudáveis. A captação celular foi mais intensa, após 3h de incubação. Estes achados demonstraram que a encapsulação do ácido barbático em lipossomas proporcionou uma redução na toxicidade, aumentando, portanto a sua atividade antitumoral.

Palavras-chave: ácido barbático; citotoxicidade; captação celular;

INTRODUÇÃO

O ácido barbático é um ácido liquênico típico de *Cladia aggregata* e, também está presente em espécies de *Cladonias* (YAMAMOTO *et al.*, 1996). Ocorre também em *Rhizocarpon geographicum* e *Usnea longissima* MALLAVADHANI *et al.*, 2004). Apesar de grandes interesses no estudo químico dos líquens, devido a ação antitumoral de seus metabólitos secundários, existe uma limitação para o uso dessas substâncias como protótipo para novas moléculas bioativas, devido principalmente a sua baixa hidrossolubilidade e aos efeitos tóxicos (PARHI *et al.*, 2012). O ácido barbático apresenta diversas atividades biológicas tais como: antimicrobiana, inibidor da cadeia transportadora de elétrons, inibidor da síntese de leucotrieno B₄(LTB₄) e citotóxica frente a diferentes linhagens cancerígenas (PEREIRA *et al.*, 1994). Apesar de grandes interesses no estudo químico dos líquens, devido a ação antitumoral de seus metabólitos secundários, existe uma limitação para o uso dessas substâncias como protótipo para novas moléculas bioativas, devido principalmente a sua baixa hidrossolubilidade e aos efeitos tóxicos (MICHELETTI *et al.*, 2009). Entre os vários sistemas de entrega de droga, os lipossomas, vesículas formadas por bicamadas lipídicas, representam uma abordagem avançada na veiculação de moléculas farmacológicas. Grande parte do interesse em explorar esses carreadores é devido às vantagens como a facilidade de obtenção, o seu tamanho e biocompatibilidade, a capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos e ainda pela possibilidade de modificar suas superfícies (WANG *et al.* 2011). A literatura relata um número reduzido de informações quanto à atividade antitumoral do ácido barbático. Em 2010, Martins e colaboradores avaliaram a atividade citotóxica do extrato etéreo e ácido barbático purificado de *Cladia aggregata* e observaram que as linhagens de células cancerígenas Hep-2, NCI-H292 (carcinoma muco epidermóide de pulmão) e KB (carcinoma epidermóide nasofaríngeo). Submetidas a 20 µg/mL do composto apresentaram relevantes ação citotóxica frente a diferentes linhagens

cancerígenas, tais como Hep-G2, NCI-H292, e KB. A CI_{50} foi entre 2,5 - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para células Hep-2 e KB. Enquanto para as células NCI-H292 foi aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No entanto, o mecanismo de atuação deste composto merece melhor elucidação (MARTÍNS *et al.*, 2010). Nesse contexto, o presente estudo propõe a avaliação da citotoxicidade e captação celular de ácido barbático de *Cladonia salzmannii* encapsulado frente ao tumor ascítico carcinoma de Ehrlich.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os lipossomas convencionais (AB-LC) e furtivos e (AB-LF) contendo ácido barbático (AB) foram preparados utilizando-se a técnica de hidratação do filme lipídico. Os estudos de citotoxicidade foram conduzidos com células do tumor ascítico sarcoma-180 e Carcinoma de Ehrlich e uma linhagem saudável, macrófagos J774 obtidas do Banco de células. O método colorimétrico de MTT foi utilizado para determinar a viabilidade celular. Foi efetuado a contagem e as células foram cultivadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1×10^6 células/mL. Após 24 de incubação, as células serão submetidas aos tratamentos com AB, AB-LC, AB-LF, obtendo-se as concentrações finais no poço de 40, 20, 10, 5 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do AB. O 5-Fluoracil (5Fu) foi utilizado como controle positivo. Após 48h será adicionado em cada poço, 25 μL de solução de MTT (5mg/mL), e as placas serão incubadas por 3h. Após a incubação o sobrenadante foi removido e adicionados 200 μL de dimetilsulfóxido. A absorbância foi determinada em Leitor de Elisa. A partir dos dados, uma curva de resposta da dose será traçada e a concentração inibitória 50% foram determinados (SANTOS *et al* 2005). A captação celular dos lipossomas fluorescentes foi investigada em células do tumor ascítico sarcoma 180. Uma densidade de 1×10^4 células/mL (1mL/poço) foi cultivada em meio suplementado, sobre lamínula, em placas de 12 poços por 72h. As formulações marcadas foram preparadas com rodamina. Foi utilizada uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipossomas fluorescentes em cada poço. Para quantificar a fluorescência intracelular, as células do tumor ascítico carcinoma de Ehrlich foram cultivadas em placas de 96 poços (198 $\mu\text{L}/\text{poço}$) e após 48h serão incubadas com os lipossomas marcados com rodamina. Serão adicionados lipossomas fluorescentes na concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram incubadas por 0,5; 1; 3 e 24h. Nestes tempos pré-determinados as células foram lavadas em meio. Em seguida lisadas com triton a 0,5% em NaOH 0,2 N e meio não suplementado. O controle foi constituído por poços de células que não foram tratadas, porém lisadas. Sua absorbância foi quantificada no intuito de descontar a fluorescência inerente às células e ao meio. Para determinação da captação celular foi utilizada a equação: Absorbância do Uptake celular = Absorbância das células tratadas – Absorbância das células não tratadas. Será elaborada uma curva de rodamina em meio RPMI (0, 312 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a fim de determinar a quantidade rodaina captada. A leitura foi realizada no leitor de microplacas com fluorescência, FLUOstar Omega à uma excitação 544 nm e emissão de 590 nm. A eficiência absorção celular foi expressa concentração de rodamina captada (LIRA *et al.*, 2010).

RESULTADOS

A Citotoxicidade do ácido barbático livre e encapsulado foi determinada em células dos tumores ascíticos, sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich. Para avaliar algum possível efeito tóxico frente a células saudáveis utilizou-se a linhagem de macrófagos J774. Nas concentrações de 40; 20; 10; 5 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido barbático, os percentuais de inibição foram: 79,18; 70,25; 37,8; 15,79; 9,77% para S-180 e 81,32; 63,07; 51,0; 14,65; 4,14 % para células TAE. Já para as células J774 a inibição foi de 31,76; 7,15; 4,56; 3,41 e 1,8%, nas mesmas concentrações. O controle positivo, 5-Fu apresentou percentuais de inibição de 22,93; 20,25; 16,91; 11,98; 6,92% para S-180 e 32,31; 16,55; 3,20; 2,22 e 1,44% para

TAE, enquanto que para células J774, foi evidenciada uma moderada redução na proliferação (48,05; 36,27; 31,84; 30,13 e 26,77%), nestas nas mesmas concentrações testadas. Os lipossomas convencionas contendo ácido barbático apresentaram percentuais de inibição de 81,06; 78,94; 35,89; 3,2; 1,09% frente a S-180 e 80,41; 77,23; 60,54; 11,1; 5,67% frente ao TAE, respectivamente. Por outro lado os lipossomas furtivos contendo o ácido barbático apresentaram o mesmo comportamento frente a estas mesmas células. Os valores de inibição foram 81,71; 79,82; 30,4; 3,46; 0,42% e 80,37; 78,19; 62,32; 20,55; 2,87%, para o S-180 e TAE respectivamente. Os valores de IC_{50} para as células S-180 e TAE não apresentaram diferenças estatísticas, tanto para o ácido barbático livre quanto encapsulado. Por outro lado o 5-fluorouracil usado o como o controle positivo, revelou valores altos de $IC_{50}=49.62\pm 3.47$ $\mu\text{g/mL}$ para S-180 e $61,59 \pm 8.81$ $\mu\text{g/mL}$ para TAE, isso confirma que o ácido barbático, livre e encapsulado em lipossomas convencionais e furtivos, foi significativamente mais ativo do que o 5-Fu frente a proliferação destas células tumorais estudadas. Além disso, é possível afirmar que o 5-Fu não foi capaz de reduzir a viabilidade celular de células S-180, nestas condições, uma vez que substâncias com IC_{50} superiores as doses testadas 40 $\mu\text{g/mL}$. Nos estudos de citotoxicidade com células indiferenciadas não cancerígenas macrófagos J774 observou-se uma discreta redução na proliferação celular quando incubadas ácido barbático livre e encapsulado. As IC_{50} do AB, AB-LC e AB-LF frente a células J774 não foram determinadas nas doses testadas. Já o 5-Fu apresentou umas IC_{50} de 38,18 $\mu\text{g/mL}$ Este estudo de captação celular revelou uma interiorização eficiente das formulações testadas, em células S-180, 3h após o tratamento. Embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, a captação celular foi maior para a formulação furtiva, especialmente após 1 hora.

DISCUSSÃO

Como pode ser visto o ácido barbático, tanto livre quanto encapsulado apresentou inibição dose-dependente, frente a células S-180 e TAE, mostrando inclusive atividade superior ao 5-Fu, um análogo de nucleotídeo com atividade antitumoral já descrita (Boente et al., 2010). Entretanto, não foi verificada diferença entre AB, AB-LC e AB-LF e a inibição foi praticamente a mesma, frente às duas linhagens cancerosas. Esses achados são bastante satisfatórios, uma vez que os esquemas quimioterápicos atuais fazem uso de agentes antineoplásicos, que têm limitações como um índice terapêutico estreito e efeitos tóxicos em não cancerosas (Pharhi, et al 2012), O ácido barbático, *in vitro*, demonstrou o oposto. A literatura relata que a presença do PEG na superfície de lipossomas furtivos diminui a interação do lipossoma com a superfície do macrófago, impedindo a captura celular do fármaco. Isso mostra que a peguilação desta vesícula lipídicas, também as deixa “furtivas” *in vitro*. Esses achados estão de acordo com resultados relatados anteriormente, onde lipossomas carregados com fármaco com ligantes específicos (fator básico de crescimento de fibroblatos- bFGF) foram obtidos com diferentes proporções de PEG na sua composição. Esses autores observaram que a captação dos lipossomas pelos macrófagos diminuiu com o aumento da quantidade de PEG-DSPE. Em particular, contendo 5 ou 10% do polímero, mostrou uma absorção significativamente reduzida, sendo essas concentrações suficientes para inibir a captação celular pelos macrófagos. No presente trabalho observamos que a uma concentração de 5% de PEG praticamente não houve captação dos AB-LF pelos macrófagos. Como pode ser visto o estudo de captação celular revelou uma interiorização eficiente das formulações testadas, em células S-180, 3h após o tratamento, estando de acordo com outros achados (Jain et al., 2012). Embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, a captação celular foi maior para a formulação furtiva, especialmente após 1 hora. Isso sugere que, nas primeiras horas de contato com as células

cancerígenas, a captação é mais eficiente para formulações peguiladas. Apesar dos relatos de que o PEG, presente na superfície de lipossomas furtivos, diminuírem a endocitose por células cancerosas *in vitro* (Liang et al., 2008), é importante avaliar a influência do tempo de exposição, mais especificamente, a partir de que momento as células cancerosas diminuem a captura de formulação peguilada. Na nossa pesquisa, observamos que até as primeiras três horas, a captação foi maior para formulações furtivas.

CONCLUSÕES

O ácido barbático foi mais tóxico para células cancerígenas do que para células saudáveis, *in vitro*, contudo a encapsulação (Convencional e furtiva) não aumentou estatisticamente sua citotoxicidade. Os estudos de captação celular revelaram um pico de captação em torno de três horas após o contato das células com os lipossomas e em torno de 24 horas a quantidade de lipossomas intacelular diminui.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro durante a execução do projeto. A professora Dr^a. Noêmia pela orientação e pela oportunidade oferecida de engrandecer o meu curriculum e meus conhecimentos científicos.

REFERÊNCIAS

- BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, out. 2011.
- BERGRAN, B. R. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e cultura, São Paulo**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líques. **Química nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 110-124, jan/fev. 1998
- MARTINS, C. B. M.; LIMA, M. J. G.; SILVA, F. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.1, p. 115-122, jan-fev. 2010.
- MOREIRA, J. N.; GASPAR, R.; ALLEN, T. M. Targeting Stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, Edmonton, v. 1515, n.2, p. 167-176, dez. 2001.
- SANTOS N.P., NASCIMENTO S.C., WANDERLEY M.S.O, TELLES N., CASTRO C.M.M B., PEREIRA E.C., SILVA N.H., HONDA N.K., SANTOS-MAGALHÃES N.S., Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.64 p.154–160, 2006.
- PARHI, P.; MOHANTY, M.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, Orissa, v.17, n. 17-18, p. 1-9, set. 2012.
- YAMAMOTO, Y.; MATSUBARA, H.; KINOSHITA, Y.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHAHI, I. Naphthazarin derivatives from cultures of the lichen *Cladonia cristatella*, **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1239-1242, dez. 1996.