

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese de derivados aminados do limoneno e desenvolvimento de nanopartículas estáveis para o tratamento de leishmaniose e câncer cervical.**

STELA REGINA FERRARINI

Porto Alegre, Março de 2013.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese de derivados aminados do Limoneno e desenvolvimento de nanopartículas estáveis para o tratamento de leishmaniose e câncer cervical.**

Tese apresentada por **Stela Regina Ferrarini** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Vera Lucia Eifler Lima

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Adriana Raffin Pohlmann

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.02.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira  
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dr. Andréia Buffon  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Ruy Carlos Ruver Beck  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ferrarini, Stela Regina  
Síntese de derivados aminados do Limoneno e desenvolvimento de nanopartículas estáveis para o tratamento de leishmaniose e câncer cervical. / Stela Regina Ferrarini. -- 2013.  
260 f.

Orientadora: Vera Lucia Eifler-Lima.  
Coorientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nanotecnologia. 2. Química Orgânica Medicinal. 3. Leishmania. 4. Câncer Cervical. 5. Limoneno. I. Eifler-Lima, Vera Lucia, orient. II. Pohlmann, Adriana Raffin, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido sob orientação da profa. Vera Lucia Eifler Lima no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal -LaSOM da Faculdade de Farmácia e co-orientação da prof<sup>a</sup>. Adriana Raffin Pohlmann no Laboratório de Síntese de Micro e Nanopartículas aplicadas à Terapêutica, Instituto de Química, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte fundamental foi realizada no laboratório Lab. 405/Nanotecnologia, Faculdade de Farmácia da mesma universidade. Os ensaios *in vitro* (antileishmania e antitumoral) foram desenvolvidos no departamento de parasitologia da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Silvia Reni Bortolin Uliana e no Laboratório de Estudos Bioquímicos e Citológicos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Andréia Buffon. A pesquisa foi financiada pelo CNPq, CAPES e da Rede Nanocosméticos.



**“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu.  
Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e  
sonhamos.”**

**PAULO BELEKI**





Aos meus pais, irmãos, sobrinha e namorado que sempre acreditaram em mim, me apoiaram em todos os momentos e me incentivaram a aceitar desafios.

Dedico



## AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Vera L. Eifler Lima pelo incentivo à pesquisa, orientação e por acreditar no meu potencial durante todos esses anos.

À prof<sup>a</sup>. Adriana R. Pohlmann, por toda disponibilidade e orientação prestada, pelo apoio e compreensão que sempre manifestou.

À prof<sup>a</sup>. Silvia S. Guterres agradeço pelo apoio, disponibilidade e pelo conhecimento transmitido ao longo do curso de Doutorado.

Às prof<sup>as</sup> Sílvia Uliana e Andréia Buffon, por terem acreditado no meu trabalho e terem me recebido em seus laboratórios.

Aos professores, Paulo Schneider, Aloir Merlo, Maria do Carmo Peralba pelos equipamentos e atenção disponibilizados.

Aos meus amigos e colegas do LaSOM: Mari, Fabi, Fernando, Pati, Flávia, Fernanda, Eduardinho, Dudu e Gabriel, agradeço pelo apoio e incentivo.

Aos amigos e colegas do LABC e do Laboratório de parasitologia, Dani, Livia, Janicer e Danilo pelo apoio nos ensaios *in vitro*.

Aos meus amigos e colegas do laboratório 405 e K204, em especial: Ana Carol, Cami, Cati, Alana, Noé, Willian, Karina, Rossana, De Jornada, Luana, Fernanda, pela amizade, apoio e pela troca de conhecimentos.

À Deni, minha irmã, pela parceria, amizade, companheirismo e exemplo de força de viver.

À minha família, pelo apoio e incentivo, por terem partilhado comigo cada dificuldade desse trabalho e por serem responsáveis por mais essa conquista.

Ao Paulo que está comigo todos os dias e não me deixa desistir nunca, pelo carinho, companheirismo e sobretudo, o amor.

Ao Celito e Lilia, pelos ensinamentos, apoio e incentivo disponibilizados.

À Deus, que me dá forças para acreditar a cada dia, que sempre posso cada vez alcançar e conseguir mais.



À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.



**APRESENTAÇÃO**



De acordo com as normas vigentes no Estatuto do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, esse exemplar está organizado da seguinte maneira:

**Capítulo 1:** Introdução e objetivos gerais do trabalho.

**Capítulo 2:** Síntese de derivados aminados do limoneno e avaliação *in vitro* frente à *leishmania amazonensis*.

**Capítulo 3:** Polarimetry as an analytical method to quantify limonene-loaded nanoemulsions.

**Capítulo 4:** Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo derivados aminados do limoneno para o tratamento de leishmaniose.

**Capítulo 5:** Avaliação da atividade antitumoral do limoneno livre e nanoencapsulado frente a câncer cervical.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiv
RESUMO .....	xxvi
ABSTRACT.....	xxviii
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
1.REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.1 O limoneno.....	3
1.1.1 Limoneno como material de partida .....	4
1.1.2 Atividade antimicrobiana e antifúngica .....	8
1.1.3 Atividade anti-leishmania .....	9
1.1.5 Atividade antileishmania versus antitumoral .....	11
1.2 Sistemas de Liberação nanoestruturados .....	14
1.2.1 Nanocarreadores- nanopartículas poliméricas .....	15
1.2.2 Nanoemulsões .....	17
2. OBJETIVOS.....	23
3. REFERÊNCIAS BBLIOGRÁFICAS .....	27
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>33</b>
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1 Estudos anteriores do Grupo de Pesquisa em Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM) .....	37
1.2 A Leishmaniose.....	39
1.2.1 O parasita e o ciclo de transmissão.....	40
1.2.2 Tratamento.....	41
1.2.3 Tratamento da leishmaniose no Brasil .....	43
1.2.4 Terpenos e derivados candidatos a fármacos anti-leishmania .....	44
2 OBJETIVOS.....	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.1 Síntese de $\beta$ -aminoálcoois .....	49
3.1.1 Aminólise do óxido de limoneno com amina alifática.....	50
3.1.2 Aminólise do óxido de limoneno com amina aromática. ....	54
3.1.3 Síntese de derivados tosilados a partir dos aminoálcoois. ....	57
3.2 Atividade anti-leishmania .....	61
4 EXPERIMENTAL .....	65
4.1 Materiais .....	65
4.2 Protocolos sintéticos .....	65
4.2.1 Procedimento geral para síntese de $\beta$ -aminoálcoois.....	65
4.2.2 Procedimento geral para síntese de derivados tosilados.....	67
4.3 Avaliação da atividade biológica dos compostos contra formas promastigotas de Leishmania sp.....	69
4.3.1 Microteste de MTT com limoneno e derivados sintetizados .....	69

4.4 Análise estatística.....	70
5 CONCLUSÕES .....	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>79</b>
1 INTRODUÇÃO .....	81
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	83
2.1 A pele íntegra .....	83
2.2 A pele lesionada pela leishmaniose cutânea .....	83
2.3 Sistemas de liberação nanoestruturados .....	85
2.3.1 Nanopartículas poliméricas e sua atividade antileishmania. ....	85
2.4 Estudo anterior do grupo de pesquisa .....	87
3 HIPÓTESE DO TRABALHO E OBJETIVOS.....	89
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
4.1 Materiais.....	91
4.2 Aparelhos e Equipamentos.....	91
4.3 Solventes e outros materiais .....	92
4.4 Métodos .....	92
4.4.1 Síntese dos $\beta$ -aminoálcoois.....	92
4.4.2 Etapa de pré-formulação .....	93
4.4.3 Preparação das suspensões de nanocápsulas.....	93
4.4.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas .....	94
4.4.5 Doseamento dos ativos nas suspensões coloidais .....	97
4.4.6 Preparação das bases semissólidas contendo nanocápsulas .....	101
4.4.7 Caracterização dos hidrogéis contendo nanocápsulas .....	101
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	105
5.1 Etapa de pré-formulação .....	105
5.1.1 Teste de inchamento do polímero .....	105
5.2 Validação do método de quantificação por CLAE .....	107
5.3 Validação do método de quantificação por CG-MS .....	108
5.4 Estratégias para encapsulação de limoneno .....	113
5.5 Desenvolvimento das nanocápsulas.....	116
5.6 Caracterização das suspensões de nanocápsulas .....	117
5.6.1 Suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo limoneno, ou CH8, ou limoneno e CH8.....	117
5.6.2.2 Demais caracterizações das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas	127
5.6.2.3 Estudo de estabilidade .....	129
5.7 Avaliação morfológica .....	130
5.8 Desenvolvimento de formulações semissólidas para tratamento tópico de leishmaniose. ....	131
5.8.1 Caracterização dos hidrogéis contendo nanocápsulas .....	132
6 CONCLUSÕES .....	141
7 REFERÊNCIAS .....	143

<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>149</b>
1 INTRODUÇÃO .....	151
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	153
2.1 Câncer .....	153
2.1.1 Aspectos gerais e ciclo celular .....	153
2.1.2 Apoptose.....	155
2.2 Câncer Cervical.....	157
2.2.1 Diagnóstico e tratamento do câncer cervical .....	160
2.2.2 Produtos naturais como fonte de compostos bioativos.....	161
2.3 Nanopartículas poliméricas e suas aplicação antitumoral. ....	164
3. HIPÓTESE DO TRABALHO E OBJETIVOS .....	167
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	167
4.1 Materiais .....	169
4.2 Aparelhos e Equipamentos .....	169
4.3 Solventes e outros materiais .....	170
4.4 Métodos .....	170
4.4.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas .....	170
4.4.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas .....	170
4.4.3 Doseamento dos ativos nas suspensões coloidais.....	173
4.4.4 Determinação das taxas de associação <sup>54</sup> .....	173
4.4.5 Atividade antitumoral do limoneno livre e nanoencapsulado .....	173
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	177
5.3 Validação do método de quantificação por CLAE .....	177
5.1 Desenvolvimento das nanocápsulas .....	178
5.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas .....	178
5.2.1 Distribuição de tamanho de partícula .....	178
5.2.2 Demais caracterizações das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas ..	180
5.2.3 Estudo de estabilidade .....	181
5.4 Avaliação da viabilidade celular em células tumorais humanas-SiHa tratadas com limoneno livre e carregado em nanocápsulas de núcleo lipídico. ....	183
6 CONCLUSÕES .....	187

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Limoneno e seus isômeros <i>R</i> e <i>S</i> .	4
Figura 2: Síntese de derivados do limoneno por Ferrarini.	6
Figura 3: Monoterpenos monocíclicos oxigenados onde o limoneno serve de precursor.	10
Figura 4: Desenho esquemático da preparação de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões pelo método de deslocamento de solvente.	17
Figura 5: Estrutura e isômeros do limoneno	35
Figura 6: Isômeros do óxido do limoneno disponíveis comercialmente.	36
Figura 11: Terpenos avaliados para atividade anti-leishmania.	45
Figura 12: Mecanismo de ação do limoneno 1 para a atividade antileishmania.	46
Figura 13: Representação da diasterosseletividade para o isômero <i>trans</i> do óxido de limoneno na aminólise por amins primárias.	50
Figura 14: Estruturas químicas do LaSOM 28 e LaSOM 120	51
Figura 15: Espectro de absorção na região do infravermelho do LaSOM 28.	52
Figura 16: Espectro de massas do LaSOM 28.	52
Figura 17: Espectro de <sup>1</sup> H RMN do LaSOM 28.	53
Figura 18: Espectro de C <sup>13</sup> APT de LaSOM 28.	54
Figura 19: Estruturas químicas do LaSOM 08 e LaSOM 122.	54
Figura 20: Espectro de massas do LaSOM 8, com a representação da estrutura de alguns fragmentos.	55
Figura 21: Espectro de <sup>1</sup> H RMN do LaSOM 8.	56
Figura 22: <sup>13</sup> C RMN do LaSOM 8 com atribuição em cada pico relacionada ao respectivo átomo de carbono.	57
Figura 23: Espectro de absorção na região do infravermelho do LaSOM 123.	59
Figura 24: Espectro de massas do produto 41, com a representação da estrutura de alguns fragmentos.	59
Figura 25: Espectro de <sup>1</sup> H RMN do produto 41	60
Figura 26: <sup>13</sup> C RMN do LaSOM 123, com atribuição em cada pico relacionada ao respectivo átomo de carbono.	61
Figura 27: Esquema gráfico desse trabalho	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 31: Modelos de mecanismo de encapsulação de nanocápsulas.	81
Figura 32: Estrutura esquemática das camadas da pele	83
Figura 33: Pele lesionada.	84
Figura 34: Limoneno e derivados aminados utilizados para a preparação de nanoestruturas	87
Figura 35: Modificações na massa do filme polimérico de poli(ε-caprolactona) após imersão no limoneno e seus derivados por 30 dias.	105
Figura 36: Modificações na massa do filme polimérico de Eudragit® RS 100 após imersão no limoneno e seus derivados por 30 dias.	105
Figura 37: a) Curvas-padrões para a quantificação de derivados de limoneno em nanocápsulas poliméricas; b) Cromatogramas com os perfis dos picos de validação.	105

Figura 38: Cromatogramas gasosos dos componentes da formulação .....	116
Figura 39: Distribuição do tamanho de partícula das formulações. ....	118
Figura 40: Intensidade de luz captada pela câmera ao longo de 60s em função do diâmetro de partícula .....	120
Figura 41: Distribuição do tamanho de partícula das formulações. ....	121
Figura 42: Intensidade de luz captada pela câmera ao longo de 60s .....	124
Figura 43: a) Distribuição do tamanho das partículas em relação a intensidade (esquerda superior) e distribuição do tamanho das partículas em 3d (direita superior) referente a LNC-L28. b) Diâmetro médio das partículas baseado na concentração (esquerda inferior) e uma foto do vídeo que analisa as partículas pelo movimento browniano (direita inferior).....	126
Figura 44: Diâmetro e pH médio das suspensões durante o armazenamento. ....	129
Figura 45: Análise por espalhamento múltiplo de luz das suspensões de nanocápsula.....	130
Figura 46: Fotomicrografias obtidas por MET das suspensões de nanocápsulas ..	131
Figura 47: Distribuição de tamanho de partícula dos hidrogéis.....	162
Figura 48: Distribuição do tamanho das partículas por espectrometria de correlação de fótons.....	164
Figura 49: Perfil reológico dos géis.....	168
Figura 50: Ciclo de replicação celular para célula em mitose. ....	155
Figura 51: Diagrama representativo dos mecanismos de apoptose. ....	156
Figura 52: Carcinogênese cervical pelo HPV. ....	158
Figura 53: Hipótese de trabalho desse capítulo envolve a incorporação de limoneno em nanopartículas poliméricas que potencializa a atividade antitumoral.....	167
Figura 54: Distribuição do tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas .....	178
Figura 55: Diâmetro e pH médio das suspensões durante o armazenamento. ....	182
Figura 56: Análise por espalhamento múltiplo de luz das suspensões de nanocápsula.....	183
Figura 57: Efeito do limoneno em solução ou das formulações de nanocápsulas sobre a proliferação de células de câncer cervical. ....	184

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade anti-leishmania de compostos sintetizados e do limoneno 1 (LaSOM 11).....	62
Tabela 5: Diferentes modelos matemáticos que descrevem fluidos não newtonianos <sup>34</sup> .....	103
Tabela 6: Avaliação das precisões inter e intra-dia do método analítico para o doseamento dos derivados de limoneno em nanocápsulas. concentração teórica de 10 µg/ml. ....	112
Tabela 7: Avaliação da exatidão do método analítico para o doseamento dos derivados de limoneno em nanocápsulas.....	112
Tabela 8: Compostos majoritários presentes nos “fixadores de perfume”.....	114
Tabela 9: Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser.....	147
Tabela 10: Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser.....	150
Tabela 11: Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por espalhamento de luz dinâmico.....	150
Tabela 12: Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após a preparação.....	151
Tabela 13: Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser. ....	125
Tabela 14: Caracterização físicoquímica das nanocápsulas de núcleo lipídico. ....	125
Tabela 15: Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após a preparação. ....	128
Tabela 16: Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser .....	179
Tabela 17: Caracterização físicoquímica das nanocápsulas de núcleo lipídico. ....	180
Tabela 18: Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após a preparação. ....	181
Tabela 19: Valores de IC <sub>50</sub> de limoneno em solução, formulações de nanocápsulas contendo limoneno e formulações brancas (livres de qualquer ativo) em linhagem de células de câncer cervical (SiHa).....	186



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><sup>13</sup>C RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<b><sup>1</sup>H RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>APT</b>	<i>Attached Proton Test.</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Cell Culture</i>
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CV</b>	Coeficiente de variação
<b>CLAE</b>	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
<b>CG-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamina
<b>HGLNCLim</b>	Hidrogel contendo limoneno nanoencapsulado
<b>HGLNCL08</b>	Hidrogel contendo LaSOM 08 nanoencapsulado
<b>HGLNCL28</b>	Hidrogel contendo LaSOM 28 nanoencapsulado
<b>HGLNCCH8</b>	Hidrogel contendo chalcona nanoencapsulada
<b>HGLNCLICH</b>	Hidrogel contendo limoneno e chalcona 08 nanoencapsulado
<b>HG</b>	Hidrogel branco
<b>HGBr</b>	Hidrogel contendo nanocápsulas de poli (ε-caprolactona) sem ativos.
<b>HMG-CoA</b>	β-Hidróxi-β-Metilglutaril-Coenzima A
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibitory concentration, 50%, ou Concentração que inibe 50%
<b>IV</b>	Espectroscopia no infravermelho com transformações de Fourier



<b>LD<sub>50</sub></b>	Lethal dose, 50%, ou Concentração (ou dose) letal de uma substância
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MeONa</b>	Metóxido de sódio
<b>MO</b>	Reator de microondas
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde para 50% de uma determinada população
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline, ou Tampão fosfato-salino
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b><i>p</i>-TsCl</b>	Cloreto de <i>p</i> -toluenosulfonila
<b>TCM</b>	Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico

## RESUMO

O limoneno é um terpeno presente no óleo essencial de plantas cítricas. É relatado na literatura como um composto com atividades farmacológicas interessantes tais como: atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e nociceptiva, e antileishmanial. A presente tese relata a funcionalização do limoneno utilizando Síntese Orgânica Clássica (em solução) através das reações de aminólise e tosilção. Obtiveram-se seis compostos que foram testados para avaliar uma possível atividade antileishmanial. Dentre esses derivados, os compostos tosilados apresentaram maior citotoxicidade frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*. Porém, os compostos LaSOM 08 e LaSOM 28 apresentaram atividade mais pronunciada em estudos desenvolvidos anteriormente, assim, foram os derivados escolhidos para o desenvolvimento das nanoestruturas. Nanopartículas contendo limoneno e dois derivados mais ativos, LaSOM 08 e LaSOM 28 foram desenvolvidas. Dentre os nanossistemas, nanocápsulas poliméricas e nanoemulsão foram os dois sistemas contemplados nesse estudo. Foi possível obter nanoestruturas com características monomodais, nanométricas, com diâmetro desejado para a finalidade proposta, além de serem estáveis no período de 30 dias. Nanocápsulas de núcleo lipídico foram incorporadas em hidrogéis e apresentaram-se estáveis nessas formulações. Com a nanocápsulas de núcleo lipídico contendo limoneno, ensaios *in vitro* em células de câncer cervical humano (SiHa) foram realizadas e demonstraram que o limoneno apresentou interessante atividade antitumoral potencializada quando esse terpeno estava contido na nanocápsulas poliméricas.



## ABSTRACT

Limonene is a terpene present in the essential oil of citrus plants. It is reported in the literature as a compound with interesting pharmacological activities such as: antimicrobial, antifungal, cytotoxic nociceptive and antileishmanial activities. This thesis, reports the functionalization of limonene using Classical Organic Synthesis (in solution) especially through aminolysis and tosylation reactions. Six compounds were obtained and tested for a possible activity *Leishmania*. Among these derivatives, compounds tosilados showed higher cytotoxicity against promastigotes of *L. amazonensis*. However, the compounds LaSOM 08 and LaSOM 28 showed activity more pronounced in studies conducted previously. Thus, the derivatives were selected for the development of nanostructures. Nanoparticles containing limonene and two most active derivatives (LaSOM 08 and LaSOM 28) were developed. Among the nanosystems, polymeric nanocapsules and nanoemulsion were the two systems included in this study. Was possible to obtain characteristics nanostructures with monomodal, nanometric, diameter desired and stable over 30 days. Core lipid nanocapsules were incorporated into hydrogels and were stable in these formulations. *In vitro* assays with human cervical cancer cells (SiHa) and ore lipid nanocápsulas containing limonene, demonstrated that terpene has interesting antitumor activity that was potentiated when the limonene polymer was contained in the nanocapsules.











## 1. REVISÃO DE LITERATURA

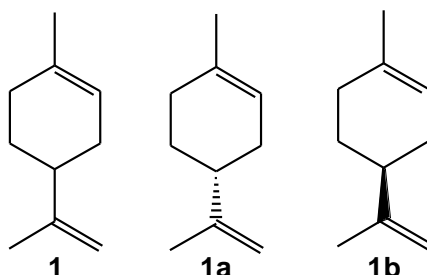
A química dos produtos naturais para o processo de desenvolvimento de novos fármacos nas últimas décadas é expressiva: estima-se que 40% dos novos fármacos aprovados nesse período tenham a sua origem em algum produto natural. Em função desse percentual pronunciado, as empresas farmacêuticas estiveram, ao longo desta década, em busca de novas substâncias ativas. Paralelo a isso, outras alternativas, como o uso da nanotecnologia para potencializar a atividade biológica de compostos biologicamente ativos está sendo muito utilizada pelas empresas farmacêuticas objetivando a inovação tecnológica nesse setor produtivo. Espera-se que, num futuro bem próximo, novos medicamentos sejam lançados no mercado para tratar doenças que ainda não apresentam cura. Para isso, as áreas de Produtos Naturais, Síntese Orgânica e Nanotecnologia se unem a fim de responder aos novos desafios implantados.

### 1.1 O limoneno

Os terpenóides constituem uma grande variedade de compostos de origem vegetal. Esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de uma unidade do isopreno, ordenados em cadeia, com rearranjos posteriores, sendo derivada do ácido mevalônico. Os esqueletos carbonados dos terpenos são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (isoprênicas). Os compostos terpênicos mais comuns nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos) e os sesquiterpenos.<sup>1</sup>

O limoneno **1** (figura 1) pertence à classe dos terpenos e está presente majoritariamente na composição do óleo essencial de plantas cítricas.<sup>2,3</sup> Ele é abundante no país, o que o torna um produto de fácil obtenção e baixo custo,<sup>4</sup> utilizado igualmente como produto de partida para a síntese de compostos naturais e derivados.<sup>5</sup> Além disso, seus derivados têm sido estudado com a intenção de se obter novos candidatos a fármacos. Por apresentar um carbono assimétrico, o

mesmo existe na forma de dois estereoisômeros  $R(+)$  **1a** a partir do limão e da laranja e o isômero  $S(-)$  **1b** do capim-limão (figura 1).



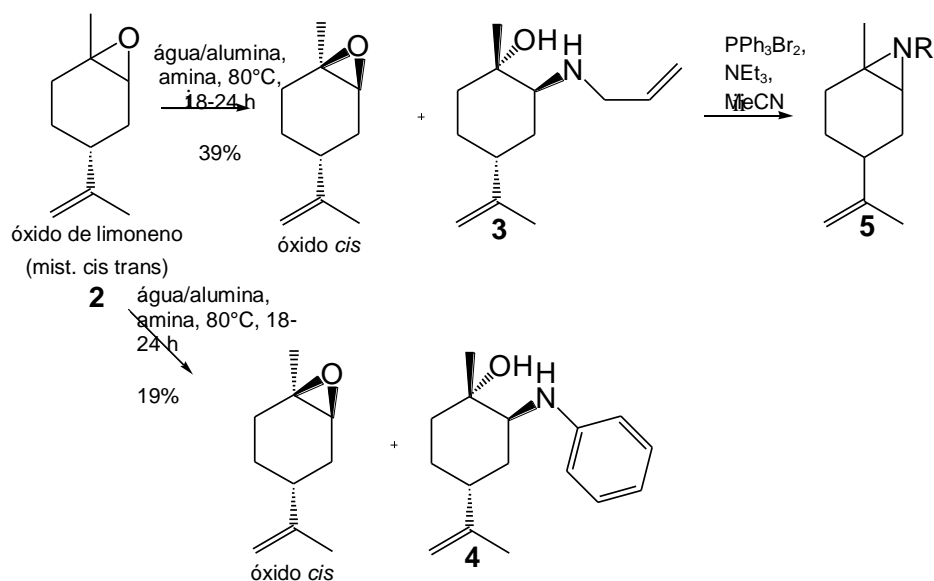
**Figura 1:** Limoneno e seus isômeros  $R$  e  $S$ .

### 1.1.1 Limoneno como material de partida

Na literatura são relatadas diversas utilizações do limoneno **1** como composto-protótipo, ou mesmo, várias atividades farmacológicas desse terpeno e de seus derivados. Apresenta uma vasta aplicação na indústria de química fina, indústria cosmética para confecção de aromas e essências<sup>3</sup> também vem atraindo muita atenção dos químicos medicinais na pesquisa de novos candidatos a fármacos.

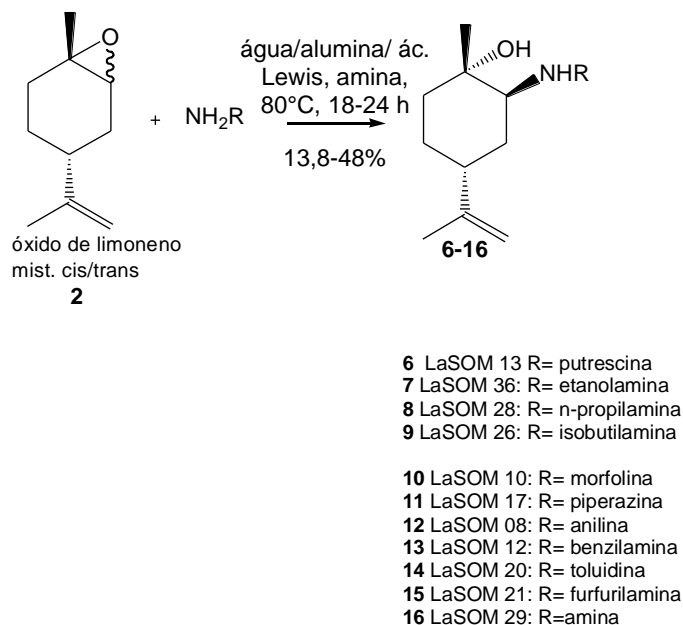
O Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM) trabalha com produtos naturais almejando o desenvolvimento de novas substâncias que apresentem atividades biológicas interessantes, agregando valor aos seus derivados, uma vez que são sintetizados a partir de uma fonte natural barata e abundante em nosso país, como é o caso do limoneno. Visando a síntese de  $\beta$ -aminoálcoois, um grupo funcional com grande importância farmacológica e sintética por ser um precursor da síntese de vários compostos<sup>3</sup>, Limberger sintetizou a partir do óxido de limoneno **2** (comercializado como uma mistura dos isômeros *cis/trans*) em reação de aminólise com alilamina e anilina, dois aminoálcoois **3** e **4** (esquema 1). Nas condições reacionais foi possível obter-se apenas o aminoálcool oriundo da aminólise do epóxido *trans*, permanecendo o óxido *cis* inalterado. A partir do derivado alilaminoálcool em presença de  $PPh_3Br_2$ , sintetizou-se a aziridina **5**. Os produtos inibiram o crescimento da bactéria *Micrococcus luteus* na concentração de 15

mg/mL. O limoneno **1**, testado nas mesmas concentrações, não apresentou atividade.<sup>35</sup>



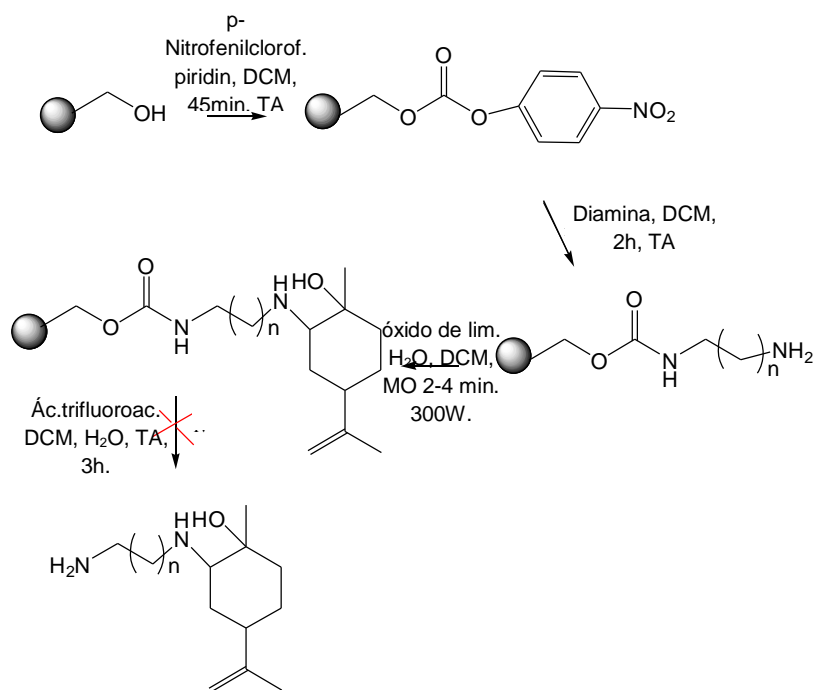
**Esquema 1:** Síntese de derivados do limoneno por Limberger. Condições: i) óxido de limoneno, água destilada/alumina, amina, 80°C, 18-24 horas; ii)  $\text{PPh}_3\text{Br}_2$ ,  $\text{NEt}_3$ , MeCN; iii)  $\text{Co/MeOH}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2/\text{SnCl}_2$ , benzeno, 100°C, 16h.

Posteriormente, Ferrarini<sup>56</sup> expandiu esta família sintetizando 11 aminoálcoois **6-16** a partir de 11 diferentes aminas em reação com o óxido de limoneno **2** (figura 2). Alguns desses aminoálcoois apresentaram atividades marcantes como agentes anti-leishmania numa faixa de 0,408 a 17,2  $\mu\text{M}$ . Destes, dois  $\beta$ -aminoálcoois revelaram-se os mais ativos LaSOM 28 **8** ( $0,408 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) e LaSOM 08 **12** ( $0,71 \pm 0,095 \mu\text{M}$ ), com um deles, o LaSOM 28, apresentando ação cerca de 100 vezes superior ao fármaco de referência usado nos ensaios a pentamidina **20** ( $48,5 \pm 28,7 \mu\text{M}$ ). Frente a esses resultados, a tese envolve o desenvolvimento de nanoestruturas contendo os derivados mais ativos, **LaSOM 08** e **LaSOM 28**.



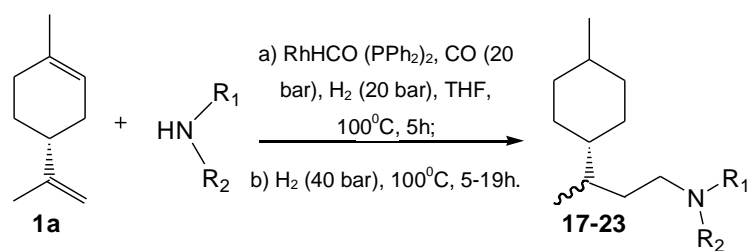
**Figura 2:** Síntese de derivados do limoneno por Ferrarini.

Visto as dificuldades encontradas na purificação de alguns β-aminoálcoois durante a síntese, Canto desenvolveu estudos de aminólise com diaminas em Fase Sólida (SOFS)<sup>57</sup>, um ramo da Síntese Orgânica de interesse crescente.<sup>9</sup> Nela, utiliza-se um polímero inerte (resina) que se liga covalentemente ao produto de partida (acoplamento) gerando o intermediário reacional sem impurezas. Outro fator importante é a facilidade na purificação desse intermediário; com uma simples lavagem está pronto para a próxima etapa. A clivagem, processo de separação do produto e polímero, é a última etapa da síntese. Visto ser uma boa alternativa para contornar a limitação, a síntese foi desenvolvida por SOFS, contudo, após inúmeras tentativas, não foi possível obter o produto clivado da resina. Para que essa etapa de liberação do aminoálcool da resina ocorresse com sucesso foi necessária a utilização da clivagem ácida, assim acreditou-se que todas as alternativas foram destrutivas para a estrutura dos derivados do limoneno (esquema 2).



**Esquema 2:** Síntese de derivados de limoneno por SOFS.

Mais recentemente Cedric Graebin realizou reações de hidroaminometilação da porção isoprenila do limoneno (Esquema 3).<sup>55</sup> Na primeira, utilizou alquilaminas, aminas cíclicas e diaminas gerando 7 derivados **17-23**, com bons rendimentos.



- 17**  $\text{R}_1 = \text{n-propil}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$
- 18**  $\text{R}_1 = \text{i-propil}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$
- 19**  $\text{R}_1 = \text{benzil}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$
- 20**  $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{piperidina}$
- 21**  $\text{R}_1/\text{R}_2 = \text{morfolina}$
- 22**  $\text{R}_1/\text{R}_2 = \text{piperazina}$
- 23**  $\text{R}_1 = \text{fenila}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$

**Esquema 3:** Reações de hidroaminometilação da porção isoprenila do limoneno por Graebin.

Em diversos estudos, o limoneno e seus derivados apresentaram interessantes atividades farmacológicas tais como: atividades antimicrobiana do óxido de limoneno, derivados do limoneno e óleo essencial contendo limoneno,<sup>6-8</sup> atividade antifúngica de análogos sintéticos, do óxido de limoneno e óleo essencial,<sup>8,9</sup> atividade antitumoral do limoneno, do óxido e derivados<sup>10-14</sup> entre outras que serão mencionadas no decorrer deste trabalho.

### 1.1.2 Atividade antimicrobiana e antifúngica

Óleos essenciais de plantas contendo, entre outros, o limoneno, são capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos.<sup>33,34</sup> É importante ressaltar que, uma vez que o limoneno é o componente majoritário dos óleos essenciais de algumas plantas cítricas (podendo chegar à proporção de 96%)<sup>34</sup> não deve-se descartar a possibilidade de que a atividade antimicrobiana desses óleos possa estar relacionada com um provável sinergismo entre os vários terpenos existentes nos óleos. Kim e colaboradores<sup>7</sup> testaram vários terpenos isolados contra microorganismos contaminantes de alimentos e certificaram-se que nas concentrações utilizadas (5 a 20% em 1% de tween 20) o limoneno não inibiu o crescimento de nenhum dos microorganismos,<sup>7</sup> podendo indicar sinergismo entre os compostos.

O óleo essencial das folhas de *Sesuvium portuacastrum* demonstrou, além de atividade antioxidante, atividade antifúngica para *Candida albicans*, atividade antibacteriana para *Acetobacter calcoacetica*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhii*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*.

Arruda e colaboradores<sup>58</sup> avaliaram a atividade do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson e de quatro análogos sintéticos de seu componente majoritário, rotundifolona, sendo um deles o epóxido de limoneno e observaram a presença de atividade contra bactérias gram-positivas, fungos e a ausência de atividade para gram-negativas.<sup>8</sup>

### 1.1.3 Atividade anti-leishmania

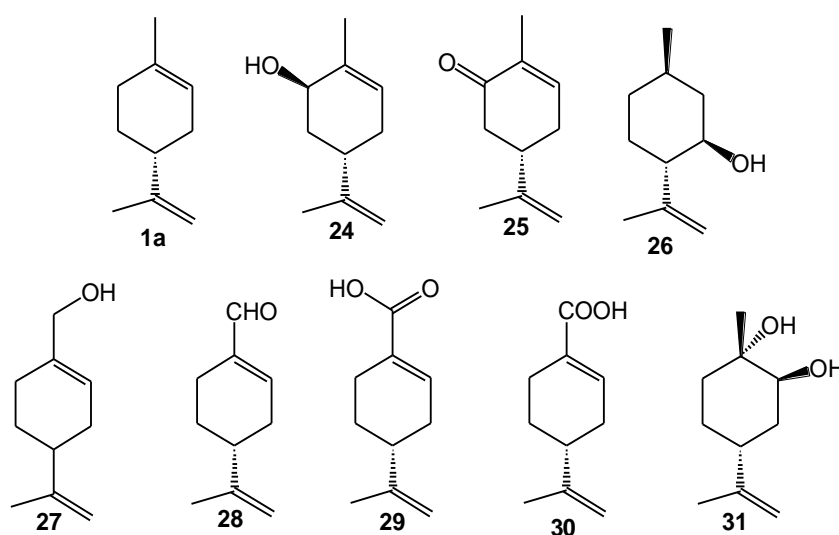
Leishmaniose é um grupo de desordens causado por parasitas do gênero *Leishmania*, um problema grave de saúde pública. As principais organizações governamentais mundiais estão preocupadas devido ao número significativo de casos e mortes em todo o mundo, principalmente em áreas subdesenvolvidas como África, Ásia e América Latina e surgimento em novas áreas<sup>15</sup>. Tem-se observado um crescente interesse em terapias alternativas e no uso de produtos naturais, especialmente os derivados de vegetais.<sup>17</sup> Um estudo realizado *in vitro* por Rosa e colaboradores em 2003 com o óleo essencial das folhas da *Croton cajucara* (rico em linalool), frente à *Leishmania amazonensis* forneceu novas perspectivas sobre o desenvolvimento de fármacos com atividade contra esse protozoário<sup>18</sup>. Esse óleo essencial apresentou potente efeito leishmanicida, já que inibiu o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* em concentrações muito baixas (MIC = 85,0 pg/mL) sem apresentar efeitos citotóxicos em células de mamíferos.

Arruda realizou uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* com parasitas do gênero *Leishmania* e dois terpenos: nerolidol e limoneno. Nesses experimentos, detectou-se a atividade anti-leishmania dos dois compostos, onde o limoneno foi capaz de reduzir as lesões em 60-80% dos animais tratados por via tópica ou intrarretal, além de diminuir a carga parasitária nas lesões. Investigações sobre o mecanismo de ação do limoneno indicam que o mesmo inibe a síntese do mevalonato (um precursor da biossíntese de esteróis como ergosterol, lanosterol e colesterol), através da inibição da enzima  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) sintase ou da enzima HMG-CoA redutase<sup>58</sup>.

O óleo extraído da casca do limão, uma fruta que apresenta o limoneno como seu componente majoritário, mostrou atividade antiparasitária para mais de um parasita como *T. gallinarum* e *H. meleagridi*, e o óleo gálico isolado apresentou amplo espectro de ação para *Leishmania*, *Plasmodium*, *Giardia* e *Tripanossoma*.<sup>19</sup> Com isso, tendo um composto de baixo custo e fácil aquisição o interesse na pesquisa de substâncias com atividade antiparasitária é crescente.

### 1.1.4 Atividade citotóxica e antitumoral

Vários estudos demonstraram que os monoterpênos apresentam atividade antitumoral e sugerem que esses compostos sejam uma nova classe de agentes quimiopreventivos do câncer.<sup>23</sup> O *R*-(-)- limoneno **1a** é o principal componente da casca de frutas cítricas e tem sido identificado como um agente não tóxico com potencial para terapia do câncer.<sup>3,24</sup> Ele serve de precursor para outros monoterpênos monocíclicos oxigenados como o carveol **24**, carvona **25**, mentol **26**, álcool perílico **27** e peril aldeído **28** (figura 3).



**Figura 3:** Monoterpênos monocíclicos oxigenados onde o limoneno serve de precursor.

Esse monoterpêno **1** é extensivamente metabolizado *in vivo*. Em ratos, os dois metabólitos evidentes são o ácido perílico **29** e o ácido dihidroperílico **30**.<sup>23</sup> Humanos produzem esse dois metabólitos além do limoneno 1,2-diol **31**.<sup>12</sup> Ele inibe o desenvolvimento de tumores espontâneos e quimicamente induzidos em glândulas mamárias, fígado, pele, pulmão, estômago<sup>25-27</sup> e pâncreas de roedores,<sup>11</sup> bloqueando o crescimento de células cancerígenas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.<sup>12</sup> O limoneno possui eficácia quimiopreventiva quando administrado a 5% na dieta durante a fase de promoção e progressão do tumor. Seu único efeito adverso constatado é a perda de peso. Além disso, observou-se que a quimioterapia para tumores de mama induzidos por nitrosometiluréia (NMU) em ratos é mais efetiva



quando utilizada juntamente com o inibidor de aromatase 4-hidroxiandrostenediona.<sup>12</sup>

O mecanismo de ação do limoneno **1** para a atividade quimiopreventiva e quimioterapêutica parece envolver alterações no metabolismo do isopreno. O efeito na proteína de isoprenilação é específico para espécies ou tipos de células. Desta maneira, poderia então inibir seletivamente a isoprenilação da proteína *Ras*, assim como a da proteína G *in vivo*, enquanto que não exerce efeito na isoprenilação de muitas outras proteínas. Essa inibição poderia alterar a localização intracelular das proteínas e por isso interromper sua atividade biológica. A sua eficácia na inibição de vários tipos de tumores *in vivo* deve-se ao fato de que o composto inibe a isoprenilação da proteína 21 a 26-kDa , incluindo a proteína *Ras*.<sup>28,29</sup>

O paclitaxel, utilizado no tratamento de câncer, ligado a um polímero de albumina – Abraxane – já se encontra em uso clínico para o tratamento de câncer de mama metastático.<sup>30</sup> O mesmo fármaco, quando encapsulado em nanopartículas de polióxido de etileno e poli-ε-aminoéster (PEO-PbAE) e de PEO e poli-ε-caprolactona, revelou atividade anti-tumoral em células de adenocarcinoma do ovário, o tipo de câncer do ovário mais comum.<sup>31</sup>

A utilização de cisplatina ligada a nanopartículas de ácido poli-láctico e polietileno glicol (CDDP-PLA-PEG-NP) na terapia do câncer de boca foi também objeto de estudo, tendo este sistema sido considerado eficaz.<sup>31</sup> Muitos agentes quimioterapêuticos largamente utilizados têm sido testados em conjugados com ácido poli-glicólico, tendo mostrado resultados promissores. Exemplos destes agentes quimioterapêuticos conjugados com ácido poli-glicólico são, novamente, o paclitaxel e a camptotecina, que se encontram em ensaios clínicos.<sup>32</sup>

#### **1.1.5 Atividade antileishmania versus antitumoral**

Muitos grupos de pesquisa buscam por fármacos multifuncionais, fármacos esses que apresentam mais de uma atividade biológica. Por exemplo, fármacos que apresentam atividade antitumoral e são testados ou utilizados no tratamento de outras doenças.

Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos para leishmaniose, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais do parasita. Entre estes incluem inibidores da síntese de poliaminas (as poliaminas atuam regulando o crescimento e diferenciação celular. Na síntese destas, encontra-se a ação de duas enzimas de fundamental importância, que são a ornitina descarboxilase e S-adenosil-L-metionina descarboxilase). Inibidores do metabolismo de folatos, inibidores da via do óxido nítrico<sup>59</sup> (dentre as vias potenciais estudadas para a ação de fármacos leishmanicidas, existe a via do óxido nítrico). Inibidores da biossíntese de esteroides: os parasitas do gênero *Leishmania* sintetizam esteróides específicos e indispensáveis para o crescimento e viabilidade celular, os quais são do tipo ergostanos (ergosterol).

Para a quimioterapia oncológica<sup>60</sup>, uma variedade de compostos estão sendo utilizados e pesquisados, apresentando diferentes pontos de interferência no mecanismo de ação das diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução. Temos os inibidores da síntese de TPM (substâncias antimetabólicas que inibem os desoxiribonucleotídeos), antagonistas purínicos, inibidores da síntese protéica, inibidores da ribonucleosídeo redutase, entre outros.

O mecanismo de ação antileishmania do limoneno envolve a inibição da síntese do mevalonato (um precursor da biossíntese de esteróis)<sup>58</sup>. Enquanto que sua ação antitumoral parece envolver alterações no metabolismo do isopreno. O efeito na proteína de isoprenilação é específico para espécies ou tipos de células, podendo assim, inibir seletivamente isoprenilação da proteína *Ras* e conseqüentemente alterar a localização intracelular das proteínas e por isso interromper sua atividade biológica.

Medicamentos como diamidinas aromáticas, especialmente a pentamidina, apresentam atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral<sup>61</sup>. A miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer. O fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com

antimoniais, apresentando resultados bastante promissores e atualmente desponta como a melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral apresentando excelentes resultados, ao contrário de outros. O mecanismo de ação da miltefosina é bastante controverso, uma das propostas na qual explica a atividade desse fármaco não está relacionada com uma resposta imune dependente de célula T, visto que este fármaco apresenta atividade antitumoral<sup>62</sup> e leishmanicida em camundongos imunodeficientes.

Divanovick e colaboradores em 2011 comprovaram que um fármaco comercialmente disponível e desenvolvido para terapia do câncer, Ontak (Denileucina diftitox), apresentou atividade de relevância para infecção de *L. Major*. Esse fármaco foi aprovado pelo FDA para o tratamento de linfoma de célula T cutâneo. Nesse estudo verificou-se a eficácia terapêutica do fármaco administrado sozinho nos modelos animais, bem como em associação terapêutica em combinação com terapia antimicrobiana padrão.

Produtos naturais e derivados sintéticos de plantas têm demonstrado extrema importância na busca de compostos multifuncionais, como é o caso do limoneno que apresenta atividade potencial em diversas doenças. Além dele, outros produtos naturais não terpênicos atuam como protótipos usados para originar novos compostos, como 6-Cantionas, uma subclasse dos alcalóides  $\beta$ -carbolina. Atividade antileishmanial de 6-Cantionas, isoladas da planta *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae) foi observado em camundongos Balb/c infectados com *L. amazonenses*. Atividade antitumoral da 1-Metoxi-6-cantionona (isolada da planta *Ailanthus altissima* SWINGLE) foi justificada pelo mecanismo de apoptose em leucemia humana, carcinoma tireoideano e carcinoma hepatocelular (N-alkil-6-oxobenzo-4,5-cantina-2-carboxamida, derivado sintético de 6-Cantionona apresentou atividade antitumoral em sete tipos de células distintas, atividade frente à *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, ou seja, as modificações estruturais desse protótipo melhorou grandiosamente a atividade biológica<sup>63</sup>.

## 1.2 Sistemas de Liberação nanoestruturados

Nos últimos anos, estudos mostraram que uma abordagem eficaz para otimizar a ação farmacológica dos fármacos é associar a molécula ativa com um sistema de liberação submicrométrico. A nanotecnologia tem sido aplicada no desenvolvimento desses novos sistemas de liberação, que muitas vezes são estratégias eficientes para veicular os fármacos ao seu local de ação em aplicações no tratamento de doenças como, leishmaniose e o câncer. Entre esses sistemas, estão nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões.

Esses novos sistemas de liberação têm o potencial de aperfeiçoar o índice terapêutico de diversos fármacos já disponíveis, aumentando a sua eficácia, diminuindo a sua toxicidade e mantendo níveis terapêuticos constantes na faixa desejada por períodos prolongados. Dessa mesma forma, atuam os compostos ativos que ainda não se tornaram fármacos.<sup>45</sup> Além disso, os nanocarreadores podem aumentar a estabilidade do fármaco, permitindo o desenvolvimento de novas entidades químicas potencialmente efetivas que não haviam ultrapassado as fases pré-clínica e clínica por causa de suas propriedades farmacocinética e bioquímica.

A escolha de um sistema de liberação de fármacos depende principalmente da estrutura química do fármaco/composto ativo e do alvo a ser atingido. Os carreadores particulados representam a classe mais variada e têm a habilidade de incorporar fármacos dentro do sistema de liberação, melhorando tanto sua estabilidade quanto sua eficácia.

O sistema de liberação ideal deve permitir o acúmulo de fármaco no sítio alvo, com baixo ou nenhum acúmulo nas células normais. O carreador também deve incorporar a substância ativa sem que ocorra perda ou alteração de sua atividade, pelo contrário, de preferência que potencialize a atividade farmacológica. Se não bastasse isso, devido à grande maioria dos tratamentos serem desenvolvidos com doses repetidas, o sistema também deve ser biodegradável e não apresentar imunogenicidade.

### 1.2.1 Nanocarreadores- nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas podem ser definidas como sistemas coloidais ou como carreadores sólidos de fármacos com diâmetro inferior a 1000 nm e são preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos.<sup>36,37</sup>

As importantes propriedades que um polímero biodegradável deve apresentar são: não causar reação inflamatória ou resposta tóxica quando administrado, apresentar tempo de vida relativamente longo, possuir tempo de degradação de acordo com o processo em que está sendo utilizado, gerar produtos de degradação atóxicos e que sejam biotransformados e eliminados do organismo.<sup>38</sup> Os polímeros sintéticos têm sido mais utilizados na área biológica, uma vez que os naturais apresentam variação na pureza e normalmente requerem reações de ligação cruzada que podem desnaturar os fármacos encapsulados. Os polímeros sintéticos mais utilizados são os poliésteres alifáticos (ex: poli (ácido láctico), PLA e seus copolímeros, poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA). O sucesso desses primeiros polímeros em aplicações farmacêuticas levou ao estudo da poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL),<sup>39</sup> que é um poliéster alifático semicristalino de grande interesse.<sup>40</sup>

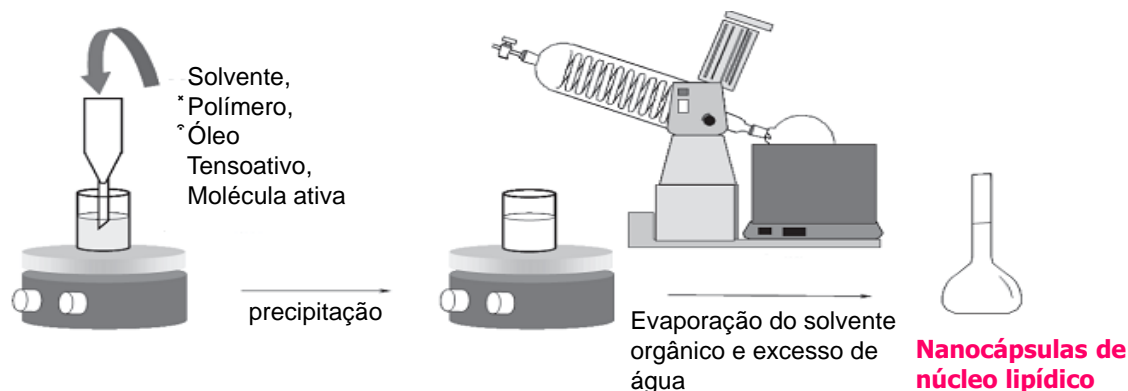
A PCL difere dos demais polímeros sintéticos por apresentar uma degradação mais lenta<sup>39</sup> e por ser mais hidrofóbica do que o PLGA,<sup>41</sup> por exemplo. Além disso, tem a vantagem de apresentar um custo mais baixo do que os demais poliésteres alifáticos. Devido a sua degradação lenta e ausência de toxicidade, a PCL tem sido investigada para uso em sistemas de liberação de fármacos e compostos ativos, além de ser utilizada<sup>40</sup> na preparação de nanopartículas de diversos fármacos lipofílicos como, griseofulvina,<sup>42</sup> espironolactona,<sup>43</sup> entre outros.

Esses sistemas coloidais podem ser obtidos por diversos métodos distintos. Qualquer que seja o processo, eles permitem obter de forma eficiente uma grande variedade de colóides com aplicação terapêutica. Tanto na pesquisa acadêmica quanto na indústria farmacêutica, a condição para o uso *in vivo* de um polímero é a ausência da toxicidade macromolecular como um todo, bem como dos constituintes utilizados durante o processo de desenvolvimento. Para esse trabalho, serão

discutidos os métodos utilizados na preparação das nanoestruturas, nanocápsulas e nanoemulsões. Sendo, o método de deposição interfacial de um polímero pré-formado para o desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico.

O desenvolvimento de nanopartículas coloidais por um polímero pré-formado em fase aquosa contínua requer que as interações água-polímero sejam minimizadas para formar as partículas desejadas. Isso pode ser alcançado utilizando macromoléculas não-hidrossolúveis, como é o caso da PCL, e com o favorecimento de interações das cadeias inter-poliméricas ao invés de interações com a fase dispersante.

Dois métodos principais são utilizados para desenvolver nanopartículas coloidais a partir de uma solução contendo polímero pré-formado. No primeiro processo, essas partículas são formadas com o auxílio da etapa de emulsificação da fase orgânica em meio aquoso, que posteriormente, com a evaporação do solvente orgânico ocorre a precipitação do polímero formando as partículas. O segundo processo, não faz uso da emulsificação para desenvolver as nanopartículas. Fessi e colaboradores desenvolveram em 1989 um método de preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados sem a formação prévia de uma emulsão para obter uma dispersão de partículas coloidais em fase aquosa (figura 4).<sup>44</sup> Essa é uma técnica simples e reprodutível, que vem sendo utilizada por diversos grupos de pesquisa. Nesse método, também chamado de nanoprecipitação, o polímero é dissolvido em um solvente miscível em água (etanol ou acetona) e essa fase é injetada a uma solução aquosa contendo um tensoativo, sob agitação magnética.<sup>37</sup> A deposição do polímero na interface entre a água e o solvente orgânico é causada pela rápida difusão do solvente no não-solvente (água). Assim, o polímero, insolúvel tanto no óleo quanto na água, é dessolvatado na interface dos dois componentes imiscíveis, resultando na formação instantânea da suspensão coloidal<sup>37,46</sup>.



\* Ausente na preparação de nanoemulsão;

° Ausente na preparação de nanoesferas.

**Figura 4:** Desenho esquemático da preparação de nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões pelo método de deslocamento de solvente (adaptado da referência 46).

Após o desenvolvimento, o estudo de caracterização das nanopartículas é uma importante etapa para assegurar as propriedades tecnológicas dos nanocarreadores. Características da composição polimérica das nanopartículas, como potencial de carga superficial, hidrofobicidade e perfil de biodegradação das substâncias adjuvantes e propriedades do fármaco associado, como peso molecular, carga e localização nas nanoestruturas por adsorção ou incorporação, têm grande influência na farmacocinética, em processos de absorção do fármaco, biodistribuição e eliminação.<sup>37</sup> As principais características que devem ser avaliadas são: tamanho e o potencial de carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas, a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação do fármaco encapsulado.<sup>46,47</sup>

### 1.2.2 Nanoemulsões

Nanoemulsões consistem em uma dispersão de dois ou mais líquidos imiscíveis estabilizados por um sistema tensoativo. Ainda, alguns autores as definem como sendo constituídas de pequenas gotículas (envoltas por um sistema tensoativo) dispersas em uma fase contínua na qual são imiscíveis. O tamanho goticular médio das nanoemulsões tem sido definido variando de 20 a 600 nm. O

tamanho e a distribuição das gotículas, por sua vez interferem nas propriedades do sistema, como estabilidade, reologia, cor e aparência.<sup>48</sup>

A nanoemulsão é constituída de uma fase oleosa, uma fase aquosa estabilizadas com tensoativos. O desenvolvimento das nanoemulsões requer um cuidado especial na escolha dos componentes como óleo e tensoativos, pois eles influenciam diretamente no tamanho da gotícula, no índice de polidispersão, viscosidade e tensão interfacial.<sup>49</sup> Os constituintes da fase oleosa normalmente são selecionados com base na solubilidade do composto ativo/fármaco a ser veiculado, na sua estabilidade, bem como na estabilidade da formulação desenvolvida. Dessa forma, a avaliação da solubilidade entre a fase oleosa e o fármaco é a etapa de pré-formulação que deve ser cumprida. Diversos óleos têm sido utilizados na composição de emulsões, como os triglicerídeos de cadeia longa (TCL) e os triglicerídeos de cadeia média (TCM), derivados de fontes vegetais, como óleos de soja, rícino e oliva. A capacidade de solubilização de alguns fármacos nos óleos é afetada pelo tamanho da cadeia hidrocarbonada, bem como o grau de saturação de suas ligações. Dessa forma, muitas vezes misturas de óleos são utilizadas para se alcançar boas solubilização e emulsificação.

Um dos principais fatores relacionados à estabilidade do sistema de liberação está vinculado com a seleção de agentes emulsionantes adequados. Sendo eles, capazes de formar mono ou multicamadas em torno das gotículas oleosas, de forma a reduzir a tensão interfacial e/ou aumentar a repulsão entre as gotículas. Os fosfolipídios mais utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação lipídicos podem ser de origem natural (animal ou vegetal) como as lecitinas, que são biocompatíveis e biodegradáveis ou semissintéticos, como dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e diestearilfosfatidilcolina (DSPC). Apesar dos tensoativos de origem natural serem preferidos aos sintéticos, por apresentarem resultados adequados de emulsificação, agentes emulsionantes auxiliares têm sido empregados para conferir maior estabilidade à emulsão. Tensoativos não iônicos do grupo dos poloxâmeros e polioxietileno-sorbitanos (Tweens) têm se mostrado promissores em combinação com os fosfolipídeos, pois levam à formação de filmes mistos compactos, conferindo maior estabilidade à formulação.



Diversos métodos para preparação de nanoemulsões estão descritos na literatura e envolvem alta ou baixa energia de emulsificação<sup>50</sup>. O método de interesse nesse trabalho utiliza alta energia de emulsificação: a homogeneização a alta pressão. A preparação de nanoemulsões por esse método ocorre em duas etapas, primeiramente as fases aquosa e oleosa são aquecidas separadamente até a fusão dos constituintes e emulsionadas com o auxílio de um agitador tipo rotor estator (Ultra-turrax®) formando assim uma emulsão primária com tamanho de partícula micrométrico. A segunda etapa envolve um equipamento chamado homogeneizador a alta pressão, responsável pela redução progressiva do diâmetro de gotícula até valores submicrométricos, compreendidos entre 100 e 300 nm. Nessa fase, existem dois mecanismos principais, chamados de cavitação e cisalhamento durante o fluxo laminar e turbulento. Inicialmente a dispersão é forçada a passar sob alta pressão e velocidade por um orifício anular estreito. A segunda fase ocorre paralelamente com a primeira: a uma alta velocidade de fluxo, a pressão estática no fluido é alterada. Se esta atingir valores próximos da pressão de vapor, surgirão bolhas cheias de vapor ou gás que aumentarão até que haja a implosão das mesmas. Dessas implosões, resulta uma alta tensão local que provoca a quebra e o rompimento das gotas, gerando a formação de novas gotas com tamanhos menores. Nos homogeneizadores de alta pressão, o tamanho das partículas e as suas distribuições de tamanho classificam-se segundo o número de ciclos, temperatura e pressões usadas durante a homogeneização.

As nanoemulsões são biocompatíveis, biodegradáveis, de fácil produção e um ótimo veículo para fármacos lipofílicos propensos a hidrólise,<sup>51</sup> como é o caso do limoneno. Esse sistema é um importante veículo para a entrega de compostos bioativos hidrofóbicos em uma gama de produtos com atividades distintas. A associação de óleos essenciais em nanoemulsões é muito observada em vários grupos de pesquisa, visando a potencialização da atividade, aumento da estabilidade e/ou redução da toxicidade. Como é o caso do óleo essencial extraído da planta *Curcuma zedoaria*, óleo de açafrão. É uma mistura de diversos compostos voláteis,<sup>52</sup> instáveis em temperatura ambiente e apresentam efeitos colaterais quando administrados. Porém, estudos farmacológicos e clínicos indicaram uma

ampla gama de atividades terapêuticas, como hepato-protetora, anti-oxidante, anti-bacteriana.<sup>52</sup>

Recentemente, a investigação do efeito dos sistemas nanoemulsionados na atividade antimicrobiana foi relatado.<sup>53</sup> As nanoemulsões foram preparadas com diferentes óleos essenciais (carvacrol, limoneno e cinamaldeído) juntamente com o óleo de girassol estabilizadas com lecitina, proteína de ervilha, éster de açúcar e a combinação de tween 20 e monooleato de glicerol. A atividade antimicrobiana foi analisada frente a *Escherichia coli*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse estudo, observou-se que a atividade biológica foi significativamente melhorada com as formulações. O efeito demonstrou ser dependente da formulação da nanoemulsão, baseada em sistemas de entrega. Em particular, a atividade antimicrobiana foi correlacionada com a concentração na fase aquosa do ativo, regidos pela capacidade emulsificante.

Em 2009,<sup>54</sup> nanoemulsões contendo 20% de óleo de citronela preparadas pelo método de homogeneização a alta pressão com diferentes quantidades de tensoativo e glicerol foram estudadas em termos de tamanho, estabilidade, liberação *in vivo* frente a ação repelente de fêmeas de *Aedes aegypti*. Destaca-se que esse óleo natural contém como componentes majoritários além da citronela, o d-limoneno. A concentração ideal escolhida dentre as formulações foi de 2,5% de tensoativo e 100% de glicerol. A presença de glicerol melhorou muito a estabilidade devido sua ação de co-solvência e sua viscosidade. O comportamento de liberação pode ser atribuído ao efeito do tamanho das gotas e a concentração do tensoativo e do glicerol. A presença deles resultou na liberação lenta da citronela, aumentando o tempo de ação frente aos mosquitos.

Por fim, demonstrou-se que o sistema nanoestruturado é uma abordagem eficaz para otimizar a atividade farmacológica de fármacos ou compostos ativos associados, além de reduzir significativamente sua toxicidade. A nanotecnologia tem sido aplicada no desenvolvimento desses novos sistemas de liberação, que muitas vezes são veículos de fármacos/ substâncias ativas para aplicações no tratamento de doenças que apresentam alto índice de mortalidade como o câncer e leishmaniose. Os nanossistemas possibilitam o desenvolvimento de novas classes

químicas potencialmente ativas. Então, a associação do limoneno, um composto de origem natural, de baixo custo, ótimo material de partida para sintetizar derivados, além de apresentar várias atividades farmacológicas, a nanossistemas e avaliação biológica é um trabalho potencial.



**OBJETIVOS**

---



## 2. OBJETIVOS DA TESE

Conforme apresentado anteriormente, trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostram que modificações estruturais introduzidas no limoneno **1**, revelaram atividades farmacológicas dos derivados mais pronunciadas que o próprio terpeno. Para atividade antileishmania, observou-se que quatro derivados aminados foram ativos *in vitro* contra formas promastigotas numa faixa de 0,408 a 17,2  $\mu\text{M}$ , apresentando ação cerca de 100 vezes superior ao fármaco de referência usado nos ensaios, a pentamidina ( $48,5 \pm 28,7 \mu\text{M}$ ). Frente a esses resultados, a tese envolve o desenvolvimento de nanoestruturas contendo os derivados mais ativos, **LaSOM 08** e **LaSOM 28**.

Com isso, os objetivos dessa tese envolvem:

- Sintetizar derivados do limoneno **1** e avaliar a atividade biológica;
- Desenvolver um método analítico simples e rápido por espectropolarimetria para quantificação de limoneno em nanoemulsões;
- Desenvolver sistemas nanotecnológicos contendo limoneno e seus derivados, compostos sintetizados que apresentaram atividade biológica mais pronunciada durante o mestrado, bem como bases semissólidas contendo essas nanoestruturas para leishmania;
- Avaliar a atividade antiproliferativa (*in vitro*) do limoneno livre e nanoencapsulado.





### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.L.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFSC, 821p, 1999.
2. SHAW, P.E. Review of quantitative analyses of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 246-257, 1979.
3. HARCATTLE, R. I.; ROWLANDS, M. G.; BARBER, A.M.; GRIMSHAW, R.M.; MOHAN, M.K.; NUTLEY, B.P.; JARMAN, M. **Biochemistry Pharmacology**, v.57, p. 801-809, 1999.
4. LISBALCHIN, M.; OCHOCKA, R. J.; DEANS, S.; ASZTEMBORSKA, M.; HART, S. Bioactivity of the enantiomers of limonene. **Medical Science Research**, v. 24, p. 309-310, 1996.
5. STANCIULESCU, M.; IKURA, M. Limonene ethers from tire pyrolysis oil. Part 1: Batch experiments. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 75, p. 217-225, 2006.
6. GRAEBIN, C.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. M.; EIFLER-LIMA, V. L. The use of limonene and limonene oxide as building-block for solid phase combinatorial synthesis. In: **The 2<sup>nd</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem**, Rio de Janeiro, v. 44, p. S2- 42, 2004.
7. KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995.
8. ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; da CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p 307-313, 2006.
9. BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.
10. AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.
11. UEDO, N.; TATSUTA, M.; LISHI, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Cancer Letters**, v. 137, p. 131-136, 1999.
12. CROWEL, P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.
13. MORSE, M.A.; TOBUREN, A.L. Inhibition of metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by limonene. **Cancer Letters**, v. 104, p. 211-217, 1996.

14. CHEN, J.; LU, M.; JING, Y.; DONG, Y. The synthesis of L-carvone and limonene derivatives with increased antiproliferative effect and activation of ERK pathway in prostate cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v 14, p 6539-6547, 2006.
15. NWAKA, S., HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 941-955, 2006.
17. RATES, S. M. K. **Plants** as source of drugs. **Toxicon**, v. **39**, p.603-613, 2001.
18. ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.CH.C.L. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1895–1901, 2003.
19. ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? **TRENDS in Parasitology**, v.21, p.462-468, 2005.
20. ESPUELAS, M., LEGRAND, P., LOISEAU, P., BORIES,C., BARRAT,G., IRACHE, J. *In vitro* antileishmanial activity of amphotericin B loaded in Poli( $\epsilon$ -caprolactone)) nanospheres, **Journal of Drug Targeting**. v.10, p. 593 –599, 2002.
21. RODRIGUES, J., CROFT, S., FESSI, H., BORIES,C., DEVISSAGUET,J. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (D ,L -lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected mice , **Tropical Medicine and Parasitology**. v.45, p.223–228, 1994.
22. MOURA, E.P., Estudo histopatológico e imunológico de cães naturalmente infectados com *leishmania (leishmania) chagasi* submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos. Tese de doutorado, Belo Horizonte, 2007.
23. CROWELL, P.L.; LIN, S.; VEDEJS, E; GOULD, M. N. Identification of metabolites of the antitumor gent d-limonene capable of inhibiting protein isoprenylation and cell growth. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 31, p. 205-212, 1992.
24. CROWELL, P. L.; CHANG, R. R.; REN, Z. B.; ELSON, C. E.; GOULD, M. N. Selective inhibition of isoprenylation of 21- to 26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p.17679–17685, 1991.
25. ELEGBEDE, J.A.; MALTZMAN, T.H.; VERMA, A.K.; TANNER, M.A.; ELSON, C.E.; GOULD, M. N. Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene: a re-evaluation. **Carcinogenesis**, v.7, p. 2047-2049, 1986.
26. WATTENBERG, L.W.; COCCIA, J.B. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1 butanone carcinogenesis in mice by d-limonene and citrus fruit oils. **Carcinogenesis**, v.12, p.115-117, 1991.
27. KAWAMORI, T.; TANAKA,T.; HIROSE, Y.; OHNISHI, M.; MORI, H. Inhibitory effects of d-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. **Carcinogenesis**, v.17, p. 369-372, 1996.

28. GELB, M. H.; TAMANOI, F.; YOKOYAMA, K.; GHOMASHCHI, F.; ESSON, K.; GOULD, M. N. The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. **Cancer Letters**, v. 91, p. 169–175, 1995.
29. HOHL, R. J.; LEWIS, K. Differential effects of monoterpenes and lovastatin on RAS processing. **Journal Biological Chemistry**. v.270, p.17508–17512, 1995.
30. SHIN D.M. Nanotherapeutic Delivery Systems, *Cancer Nanotechnology Plan*, Office of Cancer Nanotechnology Research, **Center for Strategic Scientific Initiatives**, 2010.
31. ALI, I. RAHIS-UDDIN, SALIM, K., RATHER, A.M., WANI, A.W., HAQUE, A. Advances in Nano Drugs for Cancer Chemotherapy, **Current Cancer Drug Targets**. vol. 11 (2), p. 135-146, 2011.
32. CHO, K., WANG, X., SHUMING N., ZHUO, G.C., DONG M.S. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, **Clinical Cancer Research**. vol. 14, p. 1310, 2008.
33. DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987.
34. CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 73-79, 1998.
35. LIMBERGER, J. Carbonilação catalítica de alilaminoálcoois: síntese de hidróxigama-lactamas e oxazolidinas bicíclicas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
36. BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631 – 651, 2002.
37. REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drugloaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 2, p. 8 – 21, 2006.
38. NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762 – 798, 2007.
39. SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poli( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1 – 23, 2004.
40. NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 762 – 798, 2007.
41. ESPUELAS, M.S.; LEGRAND, P.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C.; ORECCHIONI, A.M.; DEVISSAGUET, J.P.; YGARTUA, P. Poly( $\epsilon$ -Caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 158, p. 19 – 27, 1997.

42. ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 261–267, 2005.
43. BLOUZA, I.L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124 – 131, 2006.
44. GOVENDER, T.; STOLNIK, S. GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v.57, p.171–185, 1999.
45. ALLEMANN, E., GURNY, R., DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V.39(5), p.173-191, 1993.
46. SCHAFFAZICK S.R., FREITAS L.L., POHLMANN A.R., GUTERRES S.S.: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. v. 26, p.726-737, 2003.
47. HANS, M.L.; LOWMAN, A.M. *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. **Current Opinion in Solid State & Material Science**, v.6, p. 319 – 327, 2002.
48. BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 280, 241-251, 2004.
49. ALMEIDA, J.S., JEZUR, L. FONTANA, M.C., PAESE, K., SILVA, C.B., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BECK, R.C.R. Oil-based nanoparticles containing alternative vegetables oils (grape seed oil and almond kernel oil): preparation and characterization. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.28, p.165,172, 2009.
50. MULLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.54, p.S131–S155, 2002.
51. SANTOS-MAGALHÃES, N.S., PONTES, A., PEREIRA, V.M.W., CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathin penicillin G: nanoemulsion and nanocapsules. **International journal of Pharmaceutics**. v.208, p.71-80, 2000.
52. ZHENG, Y., ZHAO, Y., WANG, C., CHOW, A.H.L., REN, K., GONG, T., ZHANG, Z. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEEDS) for oral delivery of Zadoary essential oil: Formulation and bioviability studies. **International Journal of Pharmaceutics**. v.383, p.170-177, 2010.
53. DONSI, F., FERRARI, G., ANNUNZIATA, M., SESSA, M. Nanoencapsulation of essential oil to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT-Food science and Technology**. v.44, p.1908-1914, 2011.

54. RUKTANONKAI, U., SAKULKU, U., NOCHUNCHUA, O., UAWONGYART, N., PUTTIPIATKHACHORN, S. Characterization and mosquito repellent activity of citronella in nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**. v.372, p.105-111,2009.
55. GRAEBIN, C. Síntese e avaliação farmacológica *in vitro* de amins derivadas do limoneno. **Tese de Doutorado** em Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, 2008.
56. FERRARINI, S.R., GRAEBIN, C.S., LIMBERGER, J., CANTO, R.F.S., DIAS, D.O., ROSA, R.G., MADEIRA, M.F., EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis of limonene and  $\beta$ -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 773, 2008.
57. CANTO, R.F.S. Síntese em fase sólida de derivados diaminados do limoneno com potencial atividade biológica **Trabalho de Conclusão de Curso**, Faculdade de Farmácia/UFRGS, 2007.
58. ARRUDA, D. C. Caracterização da atividade leishmanicida de nerolidol e limoneno e da interferência desses terpenos na biossíntese de isoprenóides. **Tese de Doutorado**- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo-USP, 2007.
59. FONSECA-GEIGEL, L. A via do óxido nítrico em *Leishmania amazonensis*. **Dissertação de Mestrado**. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, 2000.
60. CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Em **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; M<sup>o</sup> Graw Hill: Rio de Janeiro, p. 903-949, 1995.
61. SOARES-BEZERRA, R.S., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40 ( 2), p.139-149, 2004.
62. SAFA, O.; PARTIN, S.; MATHEW, A.M.; BIBBY, M.C. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocoline (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. **Anticancer Research**. v. 17, p. 37-43, 1997.
63. SILVA, C.M.B.L., GARCIA, F.P., RODRIGUES, J.H.S., NAKAMURA, C.V., UEDA-NAKAMURA, T., MEYER, E., RUIZ, A.L.T.G., FOGGIO, M.A., CARVALHO, J.E., COSTA, W.F., SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis, Antitumor, Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Benzo[4,5]canthin-6-ones Bearing the *N*-(Substituted benzylidene)-carbohydrazide and *N*-Alkylcarboxamide Groups at C-2. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v.. 60 (11), p.1372–1379, 2012.





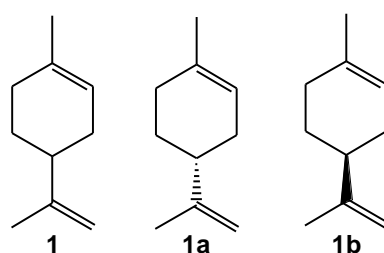




# SÍNTESE DE DERIVADOS AMINADOS DO LIMONENO E AVALIAÇÃO IN VITRO FRENTE À LEISHMANIA AMAZONENSIS.

## 1. INTRODUÇÃO

O limoneno **1** é chamado quimicamente de 4-isopropenil-1-metilcicloexeno ou *p*-menta-1,8-dieno (IUPAC). Por apresentar um carbono assimétrico, pode ser obtido como o isômero *R*(+) **1a** a partir do limão e da laranja e o isômero *S*(-) **1b** do capim-limão (figura 5)<sup>1,2</sup>.



**Figura 5:** Estrutura e isômeros do limoneno

Os estereoisômeros (*R*) e (*S*) do limoneno são encontrados na literatura como versáteis materiais de partida para a síntese de diversos compostos. Também demonstraram uma vasta aplicação na indústria de química fina e indústria cosmética para confecção de aromas e essências<sup>2</sup>.

Visto que o limoneno é encontrado comercialmente como uma mistura de isômeros, é possível utilizar a polarimetria para identificá-los. A polarimetria se baseia na medição da rotação óptica produzida, quando um feixe de luz polarizada passa por uma substância opticamente ativa. A rotação óptica é alterada com as modificações de temperatura, o comprimento de onda da luz incidente (quanto maior, menor o ângulo), a natureza química e a concentração da substância. Para fazer uso dessa metodologia, é necessário ter moléculas opticamente ativas, como é o caso do limoneno. O limoneno é encontrado na natureza de duas formas enantioméricas, (*R*) e (*S*).

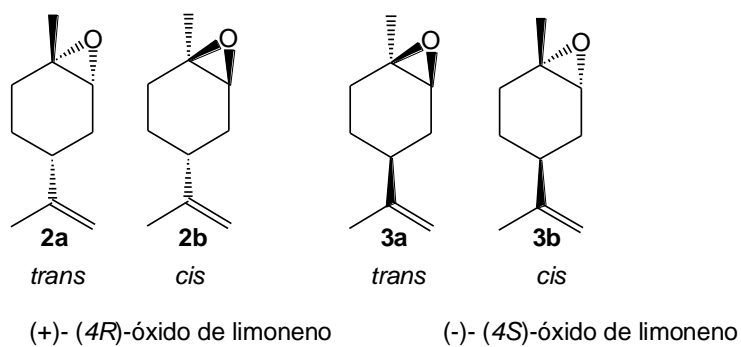
Epóxidos enantiomericamente puros são sintetizados usualmente para a produção de muitos compostos quirais<sup>3,4</sup>. O óxido de limoneno é comercialmente disponível e relativamente barato, sendo encontrado em uma mistura de epóxidos *cis* e *trans* na proporção de aproximadamente 1:1. Conforme a Figura 6, os epóxidos podem ser:

**2a (+)-(4*R*)**: com a porção isoprenila em relação *trans* com a metila 7.

**2b (+)-(4*R*)**: com a porção isoprenila em relação *cis* com a metila 7.

**3a (-)-(4*S*)**: com a porção isoprenila em relação *trans* com a metila 7.

**3b (-)-(4*S*)**: com a porção isoprenila em relação *cis* com a metila 7.



**Figura 6:** Isômeros do óxido do limoneno disponíveis comercialmente.

A abertura do epóxido com amina, a aminólise, é reconhecida como uma importante rota para se obter aminoálcoois com estereoquímica 1,2 *trans*<sup>3,5,6</sup>. Frente a isso, foram desenvolvidas algumas alternativas para reverter as limitações<sup>7</sup> que incluem: a utilização de alumina<sup>8</sup>, amidas metálicas<sup>9</sup>, metais alcóxidos<sup>10</sup>, sais metálicos<sup>11</sup>, sílica sob alta pressão<sup>12</sup>, sob irradiação de microondas com K10<sup>13</sup>, entre outros. Recentemente Ferrarini sintetizou estereoseletivamente diversos  $\beta$ -aminoálcoois com menor tempo reacional e menor quantidade de amina utilizada<sup>14</sup>, quando comparada com a literatura.<sup>5,6</sup> Além disso, as aminólises foram realizadas empregando água como promotor da reação, não havendo a necessidade de utilização de catalisadores danosos ao meio ambiente.

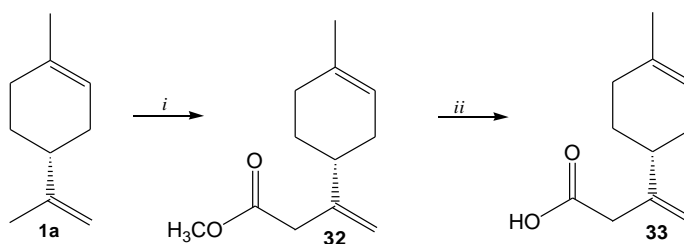
Diversas substâncias de origem naturais biologicamente ativas possuem átomos de nitrogênio em suas estruturas. Essas são empregadas na preparação e

formulação de diversos produtos e bens de consumo, como fármacos, artigos de higiene, insumos agrícolas e materiais de uso doméstico ou industrial. A importância de compostos nitrogenados em síntese vem motivando o desenvolvimento de novas estratégias. Essas estratégias visam introduzir seletivamente grupos funcionalizados, a partir de metodologias simples envolvendo condições reacionais brandas, alta economia atômica, reagentes e produtos pouco ou atóxicos, geração mínima de resíduos e reduzido impacto ambiental.

### 1.1 Estudos anteriores do Grupo de Pesquisa em Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM)

O LaSOM emprega produtos naturais como material de partida na síntese de novos compostos almejando o desenvolvimento de novas moléculas, isto é, substâncias que apresentem atividades biológicas promissoras. Esta estratégia visa agregar valor aos seus derivados, uma vez que são sintetizados a partir de uma fonte natural de baixo custo e abundante no país, como é o caso do limoneno **1**.

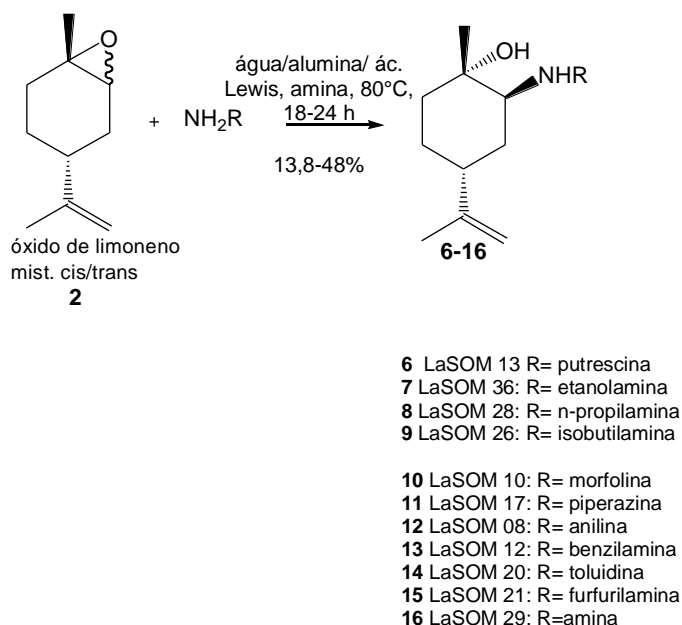
Na tese de doutorado realizada por Graebin<sup>15</sup> foram realizadas modificações na porção isoprenila do limoneno, podendo-se ser citadas as reações de metoxicarbonilação catalítica, utilizando paládio como catalisador. Esta reação foi realizada com o enantiômero **1a** e o éster formado **32** foram obtidos com rendimento de 25%. Este foi hidrolisado para a obtenção de **33** (esquema 1) com 85% de rendimento. Embora a reação tenha ocorrido com sucesso em algumas tentativas, não se apresentou reprodutibilidade.



**Esquema 1:** Reações de metoxicarbonilação catalítica, utilizando paládio como catalisador por Graebin. Condições: *i*) PdCl<sub>2</sub> (PPH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (cat.) PPH<sub>3</sub> *p*-TsOH, CO, metanol, tolueno, 100°C, 24h; *ii*) a) NaOH 3M, T.A., 16h, b) HCl 1M.

Os melhores resultados foram obtidos com a reação de hidroaminometilação da porção isoprenila do limoneno<sup>15</sup>. Para tanto, o limoneno foi hidroaminometilado com algumas aminas alifáticas, alicíclicas, aromáticas e diamina, obtendo-se sete aminas.

Ferrarini em sua dissertação de mestrado<sup>14</sup>, expandiu a família de derivados aminados do limoneno, sintetizando aminoálcoois, a partir do óxido de limoneno **2** sem formação de diol como subproduto.



**Figura 7:** Compostos sintetizados por Ferrarini.

Além da síntese de derivados do limoneno, o trabalho de Ferrarini envolveu a avaliação de atividades biológicas do limoneno e dos compostos gerados: atividade inseticida, acaricida e anti-leishmania. Na literatura, uma gama de estudos envolvem plantas e suas atividades biológicas como, acaricida,<sup>19</sup> repelente,<sup>19-21</sup> inseticida<sup>19,20</sup> e pesticida. Segundo Jaenson<sup>19</sup> a atividade inseticida do limoneno está no controle de ectoparasitas e em plantas sensíveis a insetos e no controle de ácaros e microorganismos. Com isso, foram testadas as atividades acaricidas do limoneno, do óxido do limoneno e dos derivados β-aminoálcoois em ovos e larvas do artrópode da ordem dos ácaros bovino, *Rhipichephalus (Boophilus) microplus*<sup>22</sup> e se observou que as derivatizações foram cruciais para a melhora da atividade acaricida.

Nos testes da avaliação larvicida também se observou que o óxido de limoneno **2** foi um dos compostos menos ativos, significando que as modificações estruturais realizadas foram essenciais para essa atividade. A mortalidade máxima dessas larvas foi observada com a mínima concentração de 2,5 µg/mL, as substâncias com concentrações menores não apresentaram atividade significativa, os compostos com melhor atividade acaricida foram os compostos com substituintes furfurilamina (LaSOM 21) **15** e benzilamina (LaSOM 12) **13**.

Ainda nesse trabalho<sup>23</sup>, avaliou-se a atividade anti-leishmania de alguns β-aminoálcoois sintetizados. Foram desenvolvidos ensaios *in vitro* frente a formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Dentre os sete β-aminoálcoois testados dois deles foram mais ativos que o fármaco de referência, a pentamidina **34** (48,5 ± 28,7 µM) e cinco foram mais ativos que o limoneno **1**. O Limoneno **1** nesse teste se mostrou inativo (876,2 ± 216 µM) demonstrando que este terpeno isolado não é um bom antiparasitário contra formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Os resultados revelaram uma excelente atividade para o LaSOM 08 **12** e LaSOM 28 **8**, sendo o primeiro até 100 vezes mais ativo que a pentamidina **34**.

Graebin também testou as aminas do limoneno **17-23** contra formas promastigotas de *Leishmania (Vianna) braziliensis*. Observou-se nos resultados obtidos com os compostos sintetizados que as modificações realizadas a partir do limoneno agregaram valor a este terpeno, pois apenas um dos derivados apresentou atividade inferior a ele (**21**, IC<sub>50</sub> = 1027 ± 138,6 µM). Igualmente, de uma maneira geral, pode-se afirmar que substituintes amino anilina e propilamina, além da sulfonamida foram mais eficazes que carbonilas e carboxilas, ou seja, esses compostos foram mais ativos que o limoneno e que o fármaco pentamidina.

## 1.2 A Leishmaniose

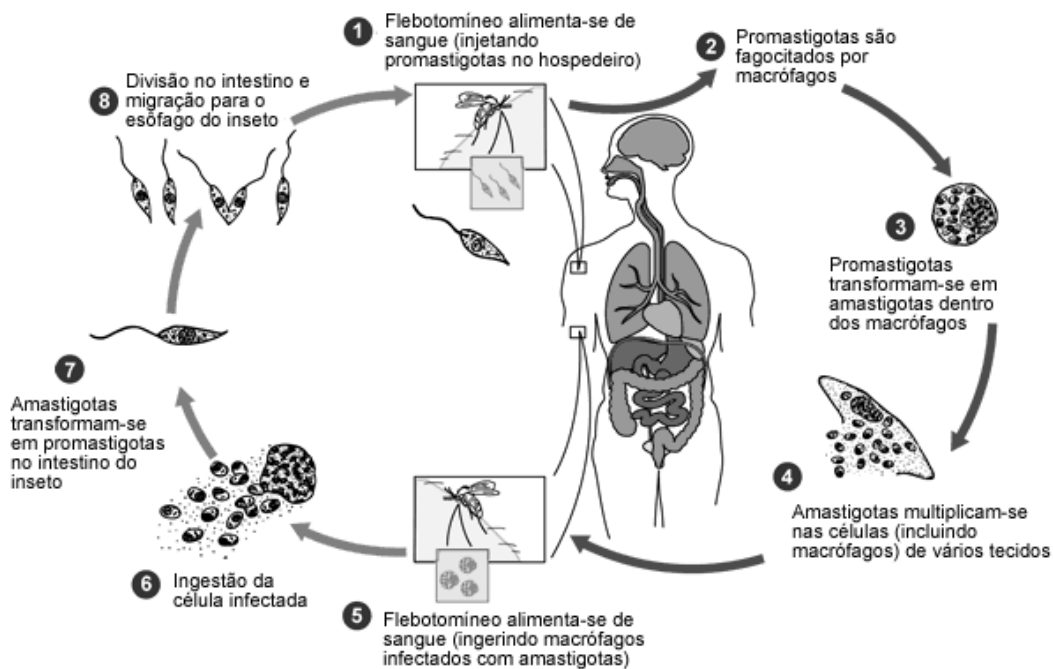
A leishmaniose é considerada uma dos maiores problemas de saúde pública do mundo, afetando cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500.000 novos casos de leishmaniose visceral a cada ano em todo o mundo<sup>15,24</sup>.

A diversidade genética do parasita em combinação com características do sistema imunológico do hospedeiro contribuem muito para a diversidade dos quadros clínicos na leishmaniose. Assim, a infecção pode se manifestar de quatro formas comuns: leishmaniose visceral, endêmica principalmente na Ásia, Europa e América<sup>25</sup>, leishmaniose cutânea, cutânea difusa e mucocutânea<sup>26,27</sup>. As duas últimas formas podem causar lesões permanentes nos pacientes e, se não tratadas, podem evoluir para a forma visceral da doença, a qual é fatal ao paciente pela queda da resposta imune com a morte dos macrófagos infectados.

### 1.2.1 O parasita e o ciclo de transmissão

Os parasitas responsáveis pela leishmaniose são cerca de 20 espécies da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Morfologicamente as principais características dos protozoários da ordem Kinetoplastida são: a presença de um ou dois flagelos oriundos da mesma bolsa lagelar e a presença de uma única mitocôndria contendo o cinetoplasto (organela celular autoreplicável que contém DNA extranuclear e está ligada ao flagelo)<sup>35,42</sup>. Os protozoários do gênero *Leishmania* são dimórficos, apresentando-se nas formas promastigota e amastigota. A forma promastigota apresenta um corpo celular alongado, com aparência fusiforme e um flagelo livre. A forma amastigota apresenta um aspecto oval. Os parasitas nas duas formas reproduzem-se assexuadamente, em divisão binária. O vetor e hospedeiro principal dos protozoários são cerca de 30 espécies de flebotomíneos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomya* ou *Psychodopigus* (Novo Mundo), conhecidos popularmente no Brasil como “mosquito palha” ou “birigui”<sup>35,42</sup>. O ciclo de vida do parasita (Figura 8) se inicia quando os vetores se alimentam de sangue contaminado de um hospedeiro vertebrado, ingerindo formas amastigotas do parasita. Dentro do intestino do vetor esses amastigotas transformam-se na forma promastigota, a qual migra para o esôfago do vetor. Quando o inseto alimenta-se novamente, inocula saliva com promastigotas que passam para a corrente sanguínea do hospedeiro. Os parasitas sobrevivem aos mecanismos de defesa do mesmo e infectam macrófagos ao serem fagocitados. Dentro dos macrófagos ocorre a fusão do vacúolo parasitófago com

lisossomos, formando o fagolisossomo e dentro deste fagolisossomo, o parasita transforma-se em amastigota. Após essa transformação, multiplica-se, rompe a membrana do macrófago e infecta outros macrófagos<sup>35,42</sup>.



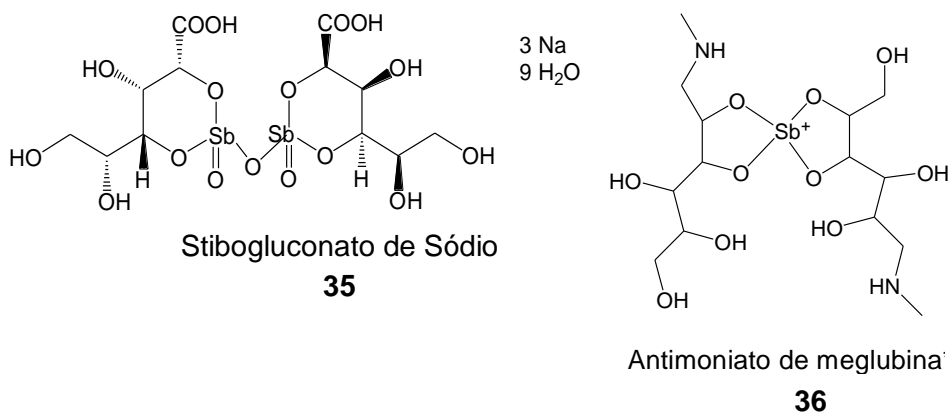
**Figura 8:** Ciclo de vida do parasita responsável pela leishmaniose. Fonte: Center for Disease Control (EUA).

No Brasil essa doença está tradicionalmente relacionada com a invasão do homem em florestas onde ocorre a derrubada de árvores para o plantio, construção de estradas, ferrovias, hidrelétricas e implantação de povoados facilitando o contato humano com os reservatórios e vetores da leishmania<sup>28</sup>.

### 1.2.2 Tratamento

A cura da leishmaniose depende de vários fatores como sistema imune do hospedeiro, a cepa adquirida, a forma clínica da doença e o tratamento utilizado<sup>29</sup>. Os tratamentos de primeira escolha (figura 9) ainda são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ), utilizados a mais de 80 anos e que podem apresentar efeitos adversos, alguns dos quais bastante graves como: arritmias cardíacas,

nefrotoxicidade, pancreatotoxicidade e hepatotoxicidade<sup>24</sup>. Os compostos dessa classe utilizados são stibogluconato de sódio **35** (Pentostam®, GlaxoSmithKline) e antimoniato de meglumina **36** (Glucantime®, Sanofi-Aventis)<sup>29,30</sup>. Ambos são administrados via parenteral, sendo o stibogluconato de sódio via intravenosa (i.v.) e o antimoniato de meglumina via i.v. ou intramuscular<sup>31</sup>.



**Figura 9:** Fármacos leishmanicidas de primeira escolha.

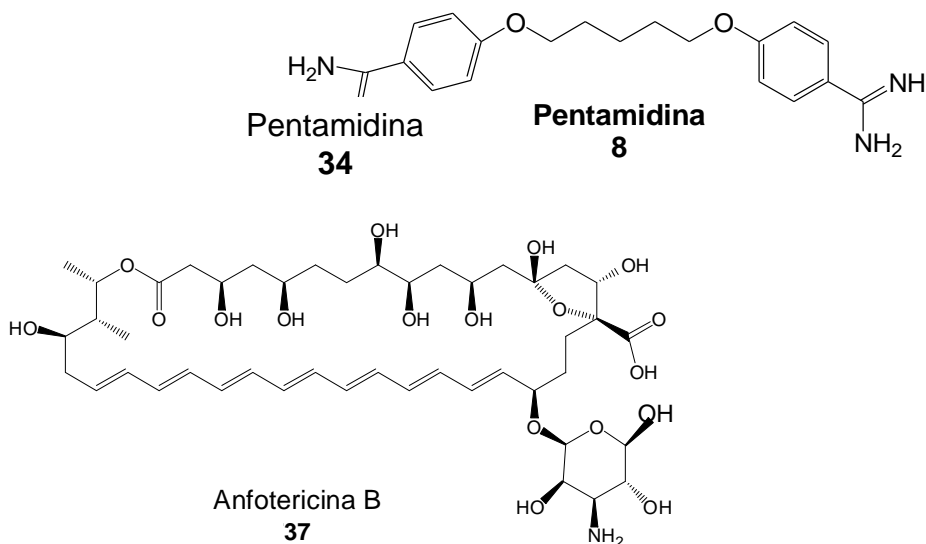
Quando os antimoniais não são efetivos no tratamento dessa doença, utilizam-se fármacos de segunda escolha, como: a pentamidina **34** e anfotericina B **37** (figura 10). Entretanto, seu mecanismo de ação, assim como o dos antimoniais, é incerto.

Acredita-se que a pentamidina **34** atue diretamente no DNA da mitocôndria do parasita, dado corroborado pela observação de que é nesta organela do parasita que ocorre a acumulação do fármaco<sup>35</sup>. É ativa também contra a forma promastigota do parasita. Apesar de sua efetividade os efeitos adversos graves como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e indução de diabetes insulino-dependente ou insulino-independente irreversível, fazem com que a Anfotericina B **37** seja usada preferencialmente<sup>26, 27, 35, 41</sup>.

A anfotericina B **37** é um macrociclo poliênico. A razão para esta ação é que parasitas do gênero *Leishmania* apresentam ergosterol como lipídio de membrana. Por isso, esse composto é capaz de interagir com a membrana do parasita, abrindo



poros na mesma, causando o fluxo livre de íons para dentro e fora da célula, levando à morte do parasita. Entretanto, todos esses fármacos apresentam problemas em termos de vias de administração, duração do tratamento (normalmente 3-4 semanas), alta toxicidade e custo, limitando o uso destes nas áreas endêmicas da doença, o que torna a busca por novos agentes leishmanicidas uma prioridade<sup>29</sup>.



**Figura 10:** Fármacos de segunda escolha utilizados para leishmania.

### 1.2.3 Tratamento da leishmaniose no Brasil

No Brasil, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde<sup>43</sup>, para o tratamento da leishmaniose tegumentar recomenda-se como fármaco de primeira escolha o antimoniato de meglumina **36** na dose de 10-20 mg SbV/dia, aplicado de forma intravenosa ou intramuscular, entre 20-30 dias. O fármaco de segunda escolha é a Anfotericina B **37**, utilizado em pacientes refratários aos antimoniais e de primeira escolha em gestantes, sendo indicada a dose de 1-4 mg/kg/dia até se atingir a dose total administrada de 1-3g. Para o tratamento da leishmaniose visceral recomenda-se como fármaco de primeira escolha o antimoniato de meglumina **36** na mesma dose usada para leishmaniose tegumentar. Assim como na forma tegumentar, anfotericina B **37** é o fármaco de segunda escolha em pacientes

refratários aos antimoniais e de primeira escolha em gestantes, sendo indicada a dose de 1mg/kg/dia, em dias alternados, até atingir-se a dose total de 3g.

#### 1.2.4 Terpenos e derivados candidatos a fármacos anti-leishmania

O reino vegetal é claramente uma fonte potencial de novos agentes antiprotozoários. A atividade de extratos e compostos isolados tem sido atribuída a diferentes grupos químicos, incluindo terpenóides, alcalóides, flavonóides, fenilpropanóis e esteróides<sup>32,33</sup>. Para obter um fármaco de origem vegetal, diferentes estratégias de pesquisa podem ser utilizadas, dentre elas a investigação do uso tradicional, a composição química do composto ativo, a toxicidade da planta ou a combinação dos critérios<sup>34</sup>.

Recentemente, Arruda<sup>35</sup> realizou uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* com parasitas do gênero *Leishmania* e terpenos: nerolidol **38** e limoneno **1** (figura 11). Nesse estudo, foi mostrado que esses terpenos apresentaram atividade contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania in vitro*. Nerolidol **38** foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* com IC<sub>50</sub> em torno de 74 a 85µM. O tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* com nerolidol por via parenteral ou tópica resultou em diminuição no tamanho das lesões somente durante o período de tratamento. O limoneno foi ativo contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* com CI<sub>50</sub> na faixa de 147 a 252µM. Camundongos C57/Bl-6 infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados por via tópica e intra-tecal com limoneno tiveram redução significativa no tamanho das lesões e diminuição da carga parasitária. Porém, o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* com nerolidol por via parenteral ou tópica resultou em diminuição no tamanho das lesões somente durante o período de tratamento.



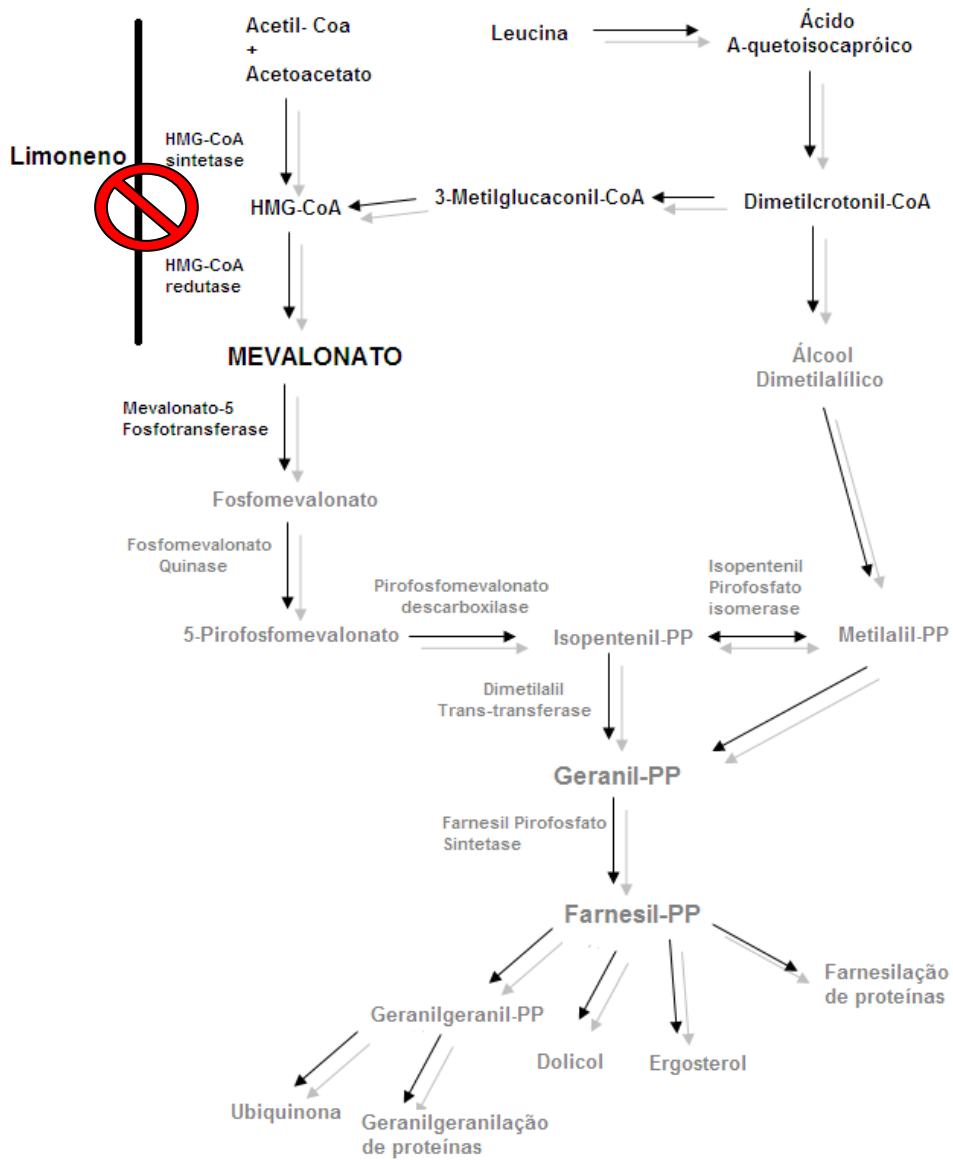
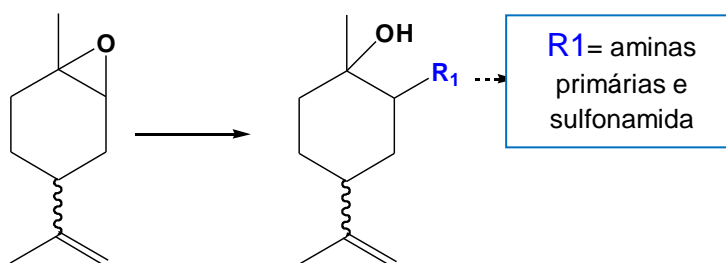


Figura 8: Mecanismo de ação do limoneno 1 para a atividade antileishmania.<sup>35</sup>

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos desse capítulo é prosseguir com os trabalhos iniciados por Ferrarini em seu Mestrado e sintetizar derivados do limoneno **1**, visando a potencialização da atividade biológica. Para isso, busca-se sintetizar  $\beta$ -aminoálcoois com configuração (*R*) e (*S*), e derivados tosilados (Esquema 2) e, posteriormente, prosseguir com a avaliação da atividade desses compostos frente a cepas de *Leishmania amazonensis*, cepas essas, ainda não testadas com esses derivados. E, a partir destes resultados, realizar uma possível correlação entre a estrutura dos mesmos e a atividade farmacológica observada.



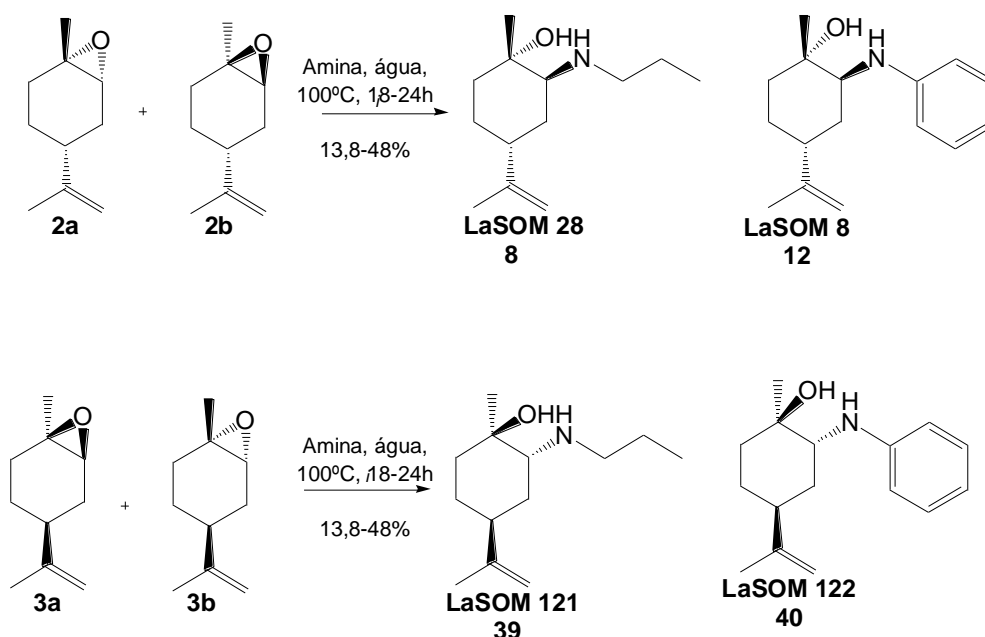
**Esquema 2**



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese de $\beta$ -aminoálcoois

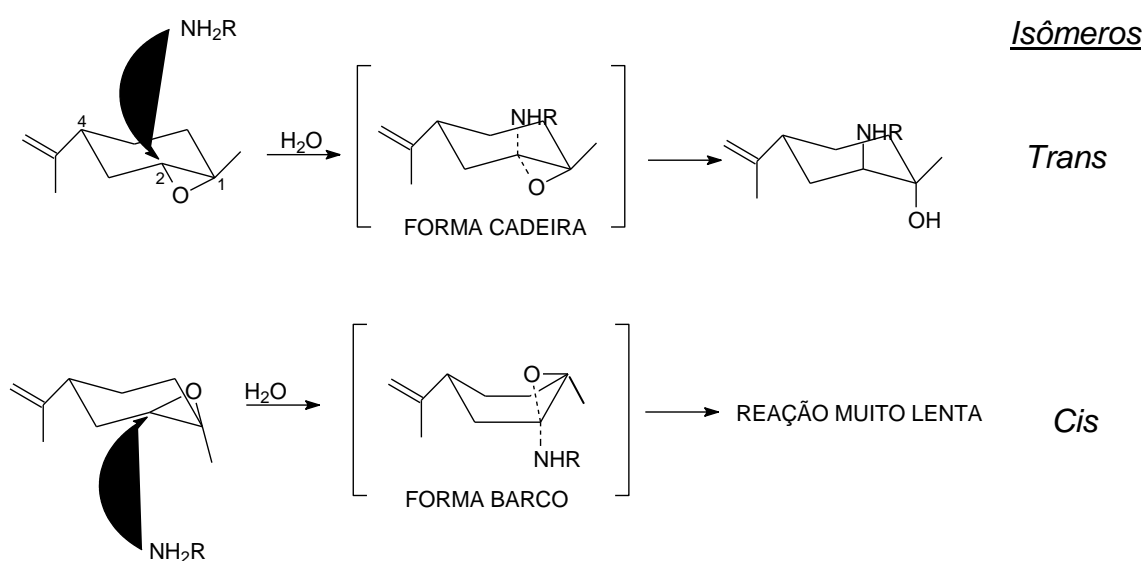
Para a síntese de  $\beta$ -aminoálcoois partiu-se do (+)-(4*R*)-óxido de limoneno **2a** e **2b** e (-)-(4*S*)-óxido de limoneno **3a** e **3b** para obtenção de diastereoisômeros com configurações diferenciadas a fim de investigar possíveis diferenças na atividade biológica, conforme será abordado posteriormente (esquema 3). Nesta figura pode ser observado que os aminoálcoois sintetizados são codificados genericamente como LaSOM, e este é o código de todos os aminoálcoois obtidos.



**Esquema 3:** Esquema geral de aminólise a partir de óxido de limoneno. i) óxido de limoneno, amina, água, 100°C, 18-24h.

A síntese de  $\beta$ -aminoálcoois foi baseada nos trabalhos desenvolvidos por Chrismann<sup>3</sup> e por Singaran<sup>38</sup>, os quais demonstraram eficácia na utilização de água como promotor reacional na abertura diastereosseletiva do óxido de limoneno *trans* com aminas secundárias. Assim como o descrito na literatura<sup>3,38</sup>, observou-se seletividade para o isômero *trans* do óxido de limoneno. Esta seletividade manteve-se, mesmo com a utilização de aminas primárias, já que Singaram descreve esta reação apenas para aminas secundárias. A seletividade destas reações pode ser

explicada pelas diferenças conformacionais entre os diastereoisômeros *cis* e *trans* (figura 13). Devido às restrições estéricas, o grupamento isopropenila “prefere” a orientação equatorial tanto no isômero *cis* quanto no isômero *trans*. Para o isômero *trans* ocorre a abertura do epóxido através de um mecanismo “SN<sub>2</sub> like” por aminas nucleofílicas no C-2 menos impedido, *via* um estado de transição termodinamicamente estável tipo cadeira. Por outro lado, para que ocorresse o mesmo ataque no C-2 do isômero *cis*, este deveria passar por um estado de transição energeticamente desfavorável tipo bote. Com as condições utilizadas, o isômero *cis* é recuperado intacto ao final da reação, obtendo-se um rendimento máximo de 50%.



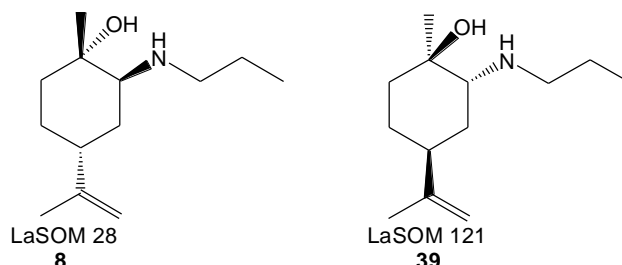
**Figura 9:** Representação da diasterosseletividade para o isômero *trans* do óxido de limoneno na aminólise por aminas primárias.

### 3.1.1 Aminólise do óxido de limoneno com amina alifática.

Nesse trabalho foram desenvolvidas aberturas de epóxidos utilizando a anilina e a propilamina, sob refluxo em banho de óleo e mesmo protocolo para ambos os isômeros (*R*) e (*S*) do óxido de limoneno. Não se observou diferença significativa nos rendimentos reacionais entre eles e nem no aspecto físico, que se



manteve na forma oleosa e viscosa. Os produtos dessas reações são os aminoálcoois **8** (LaSOM 28) e **39** (LaSOM 120) com rendimentos excelentes de 48 e 43%, respectivamente (figura 14).

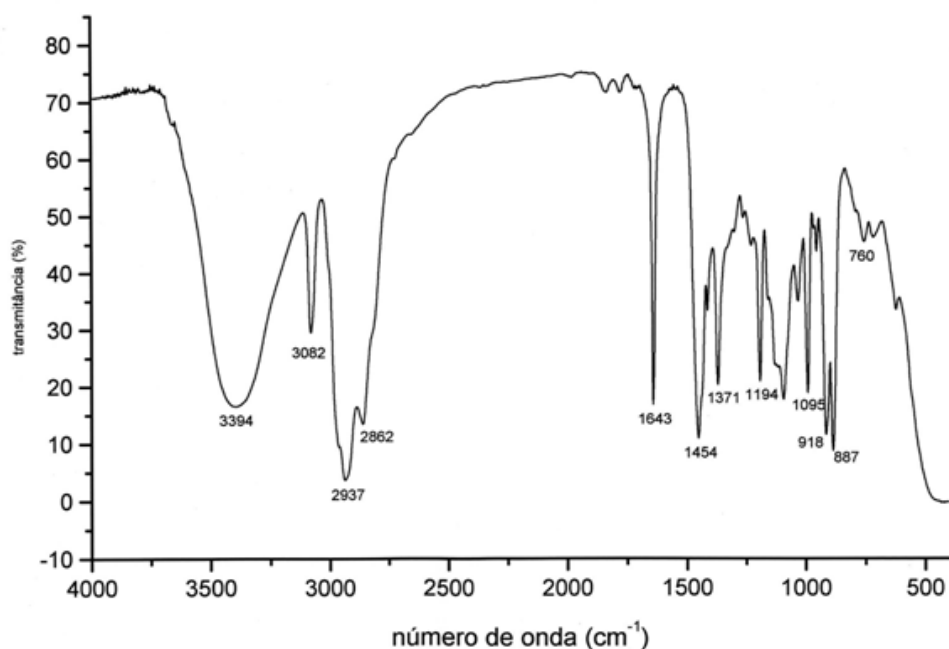


**Figura 10:** Estruturas químicas do **LaSOM 28** e **LaSOM 120**

O acompanhamento destas reações foi realizado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-MS) mostrando um rendimento de 48%, o que coloca esse resultado como um dos melhores já relatados com esse terpeno.

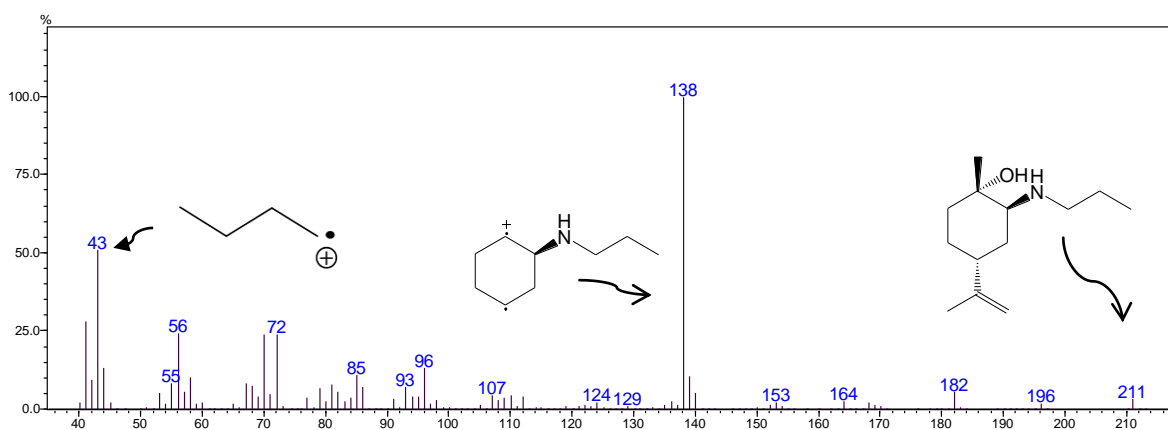
### **Caracterização de 2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol – LaSOM 28**

Na Figura 15 é apresentado o espectro na região do infravermelho do LaSOM 28. Destaca-se a banda alargada referente ao estiramento da ligação O-H em  $3.394\text{ cm}^{-1}$ , e a banda que indica o estiramento da ligação C-N observada em  $1.095\text{ cm}^{-1}$ , ambas ausentes no produto de partida, indicando a formação do aminoálcool.



**Figura 11:** Espectro de absorção na região do infravermelho do **LaSOM 28**, realizado em filme líquido, com 16 varreduras e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

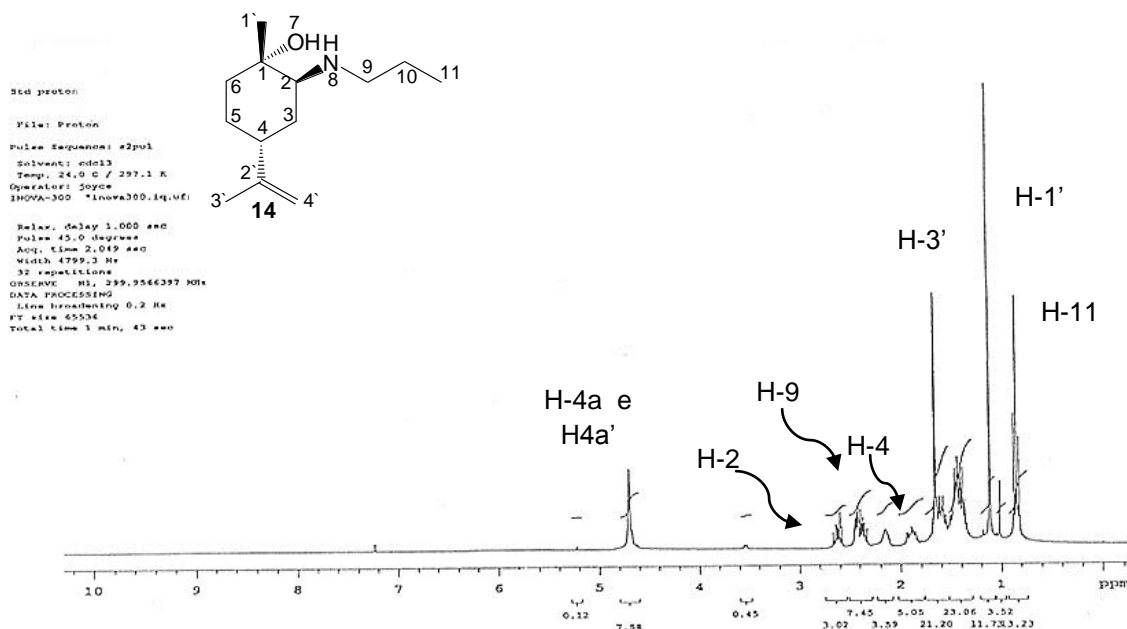
Na Figura 16 observa-se o espectro de massas do mesmo aminoálcool. Destacam-se os picos em 211 u.m.a. (4,8%), que é referente ao íon molecular; 164 u.m.a. (3,50%), que pode representar a perda do grupamento isopropenila e 138 u.m.a., que é o pico majoritário (100%).



**Figura 12:** Espectro de massas do **LaSOM 28**.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do LaSOM 28 é apresentado na Figura 17. São importantes para a verificação da formação do produto desejado os sinais adicionais em 2,4 ppm

(CH<sub>2</sub>-9), 1,4 ppm (CH<sub>2</sub>-10) e 0,8 ppm (CH<sub>3</sub>-11) referentes à propilamina. O aparecimento do pico alargado do hidrogênio ligado ao nitrogênio em 2,18 ppm (H-8).



**Figura 13:** Espectro de <sup>1</sup>H RMN do LaSOM 28.

O espectro de <sup>13</sup>C APT desse aminoálcool (figura 18) mostra que todos os picos estão de acordo com o deslocamento calculado para esta molécula e de acordo com os estudos de Ferrarini<sup>14</sup> e Limberger<sup>44</sup>. Observa-se que em relação aos carbonos C-2 e C-1 houve modificação do deslocamento em função do nitrogênio próximo, além disso, passa de um epóxido para aminoálcool. Os carbonos referentes à propilamina em 50 ppm (C-9), 23,4 ppm (C-10) e em 21,5 ppm (C-11) estão presentes, confirmando o produto reacional. O átomo de carbono em  $\delta = 72$  ppm por ele estar bastante desblindado, provavelmente represente o único carbono quaternário ligado à hidroxila (C-1'). O carbono primário C-2, ligado ao nitrogênio, está representado em  $\delta = 62$  ppm, esse átomo faz com que este carbono esteja bastante desblindado.

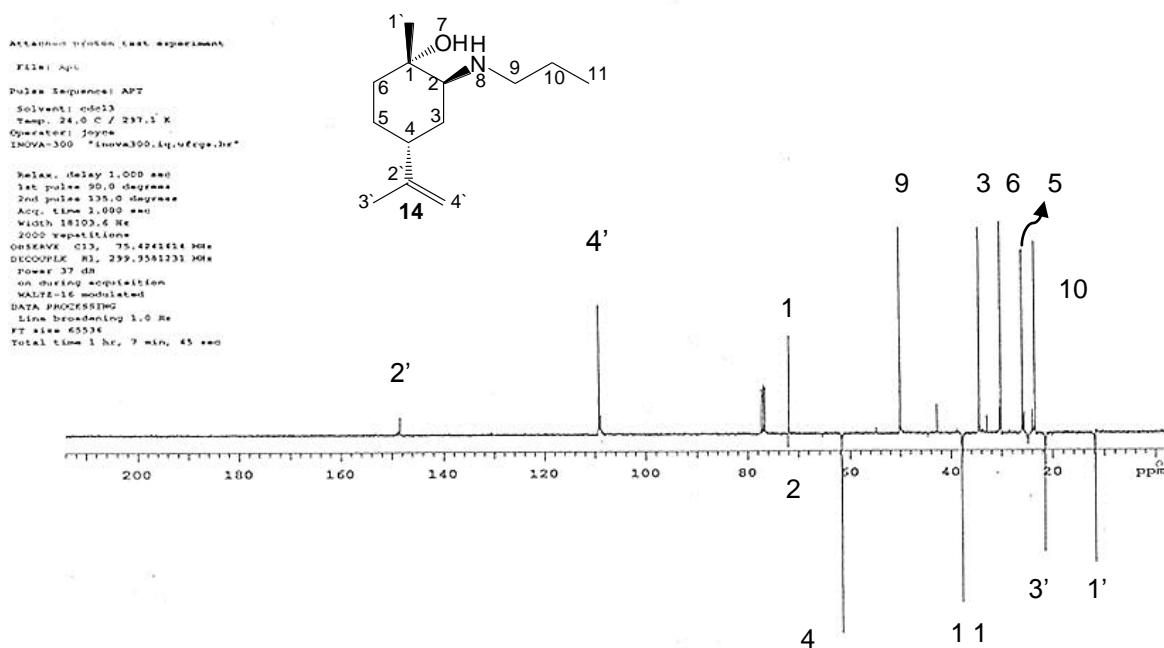


Figura 14: Espectro de  $C^{13}$  APT de LaSOM 28.

### 3.1.2 Aminólise do óxido de limoneno com amina aromática.

Foi observado que a formação dos aminoálcoois aromáticos LaSOM 08 **12** e LaSOM 122 **40** (figura 19) foi menos efetiva quando comparada com os aminoálcoois alifáticos **8** e **39**. Trata-se de um resultado esperado, pois se sabe que, em função de seu caráter aromático, anilina é considerada menos nucleofílica que as alquilaminas típicas. A aminólise dos compostos **12** e **40** foi otimizada com tempo máximo de 18h com rendimento de 13,8%, visto o início de reatividade do isômero *cis* do óxido de limoneno em tempo subsequente.

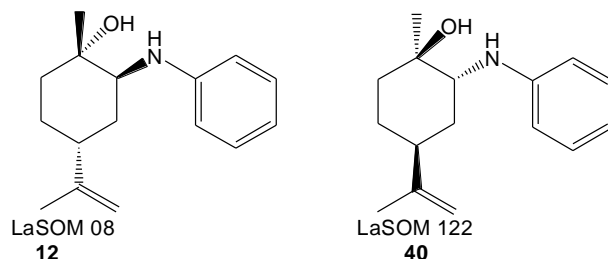
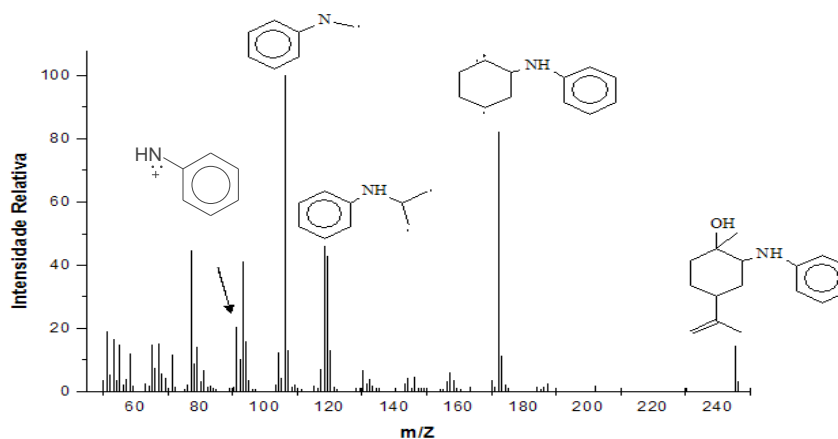


Figura 15: Estruturas químicas do LaSOM 08 e LaSOM 122.

## Caracterização de 2-(anilino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol –LaSOM 8.

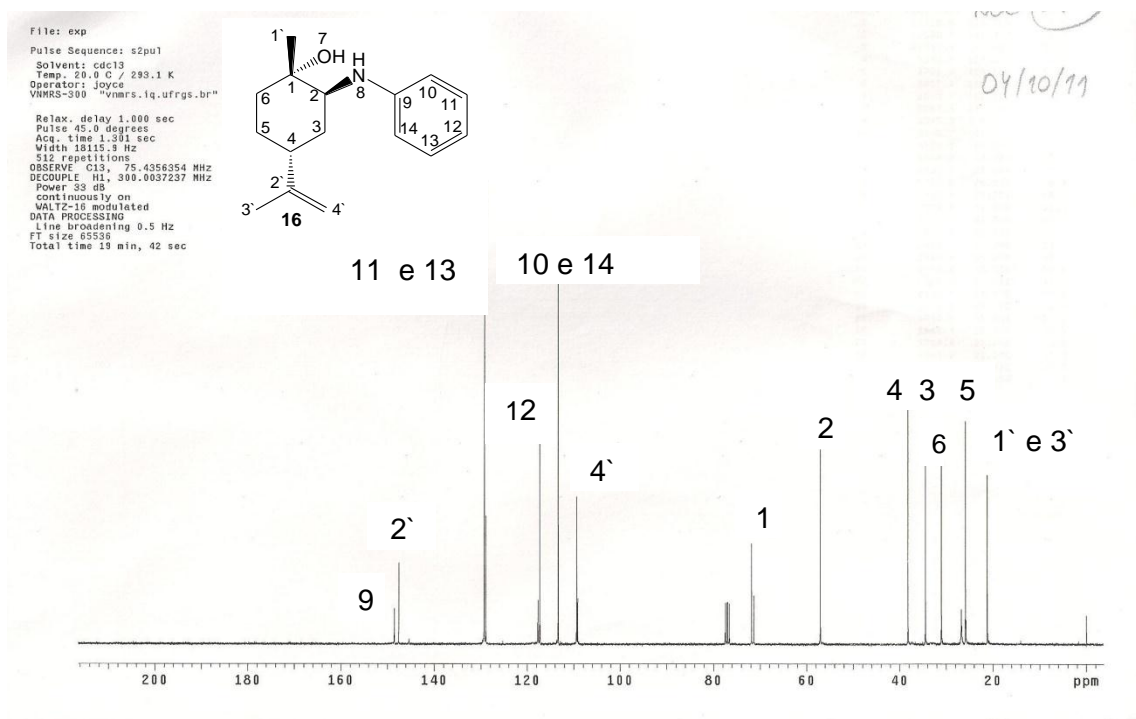
Na Figura 20 é apresentado o espectro de massas de LaSOM 8. São relevantes para caracterização do produto em questão os picos em 245,5 u.m.a (14,4%), referente ao íon molecular; 173 u.m.a. (82,1%), referente à perda de metila, hidroxila e isopropenila; 119 u.m.a. (42,6 %) e 118 (45,6%), referentes a fragmentos em que houve rompimento do anel cicloexano; 106,3 u.m.a que representa o fragmento com maior estabilidade (100%) e 93 u.m.a (30,1%) referente à anilina. Detalhes mais precisos sobre a estrutura de cada fragmento são demonstrados no espectro abaixo.



**Figura 16:** Espectro de massas do **LaSOM 8**, com a representação da estrutura de alguns fragmentos.

A figura abaixo representa o  $^1\text{H}$  RMN do aminoálcool **8** (LaSOM 08), onde pode-se observar, novamente, o sucesso reacional. Nesse momento serão discutidas as análises do LaSOM 08. Em  $\delta = 6,6$  e  $7,1$  ppm observa-se a presença do anel aromático representando parte da estrutura da anilina. O sinal alargado do hidrogênio ligado ao nitrogênio é observado em  $2,4$  ppm. Os sinais do hidrogênio do CH cíclico (H-2) ligado a NH em  $\delta = 3,49$  ppm. A metila exocíclica (H-1') ligada ao anel do terpeno é encontrada como um singlete em  $\delta = 1,2$  ppm.

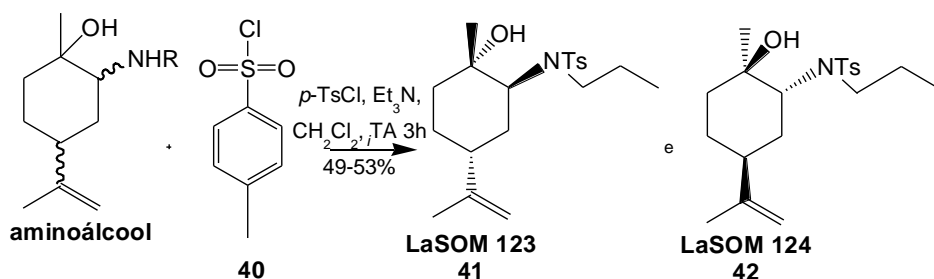




**Figura 17:**  $^{13}\text{C}$  RMN do **LaSOM 8** com atribuição em cada pico relacionada ao respectivo átomo de carbono.

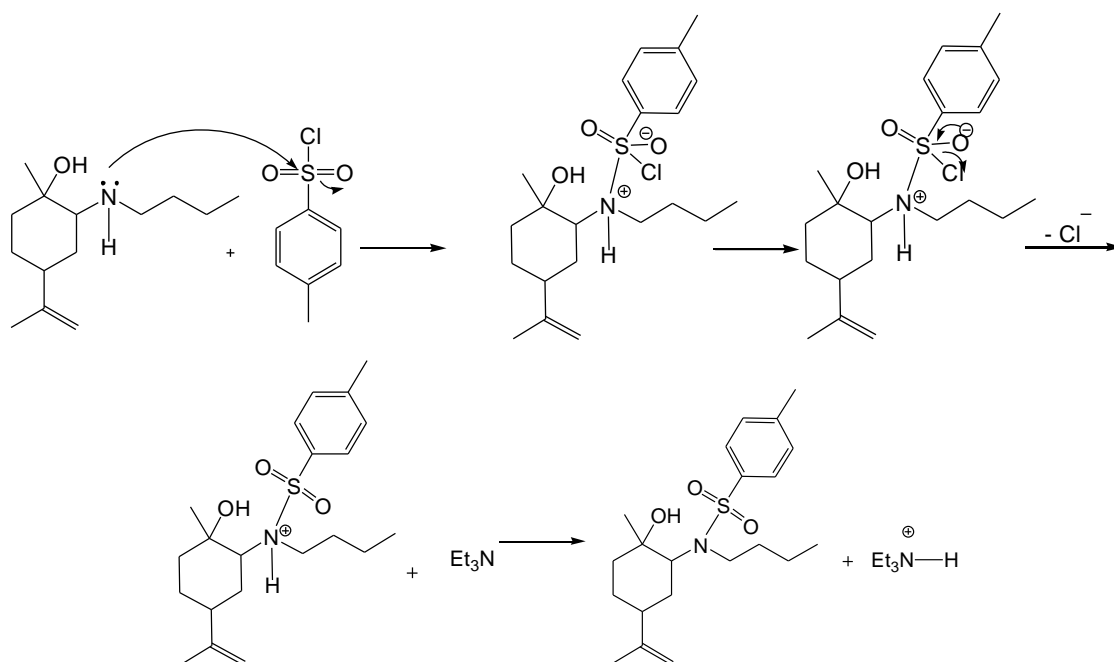
### 3.1.3 Síntese de derivados tosilados a partir dos aminoálcoois.

As *N*-tosilações de **8** (LaSOM 28) e **39** (LaSOM 121) ocorreram com sucesso (esquema 4), obtendo-se os tosilados **42** (LaSOM 123) e **43** (LaSOM 124) com rendimentos entre 49-53%. Ambos diastereoisômeros dos aminoálcoois contendo *n*-propilamina foram tosilados para investigar a ocorrência de possíveis diferenças na atividade biológica entre eles. O grupamento tosila é reconhecidamente um grupo farmacofórico presente em diversos antibacterianos e antiparasitários, sendo que a literatura relata a atividade anti-leishmania *in vitro* de sulfonamidas<sup>39,40</sup>, além de conferir modificações na polaridade dos compostos.



**Esquema 4:** Síntese de derivados tosilados a partir dos aminoálcoois.

O mecanismo reacional proposto nessa reação é uma substituição nucleofílica (esquema 5).

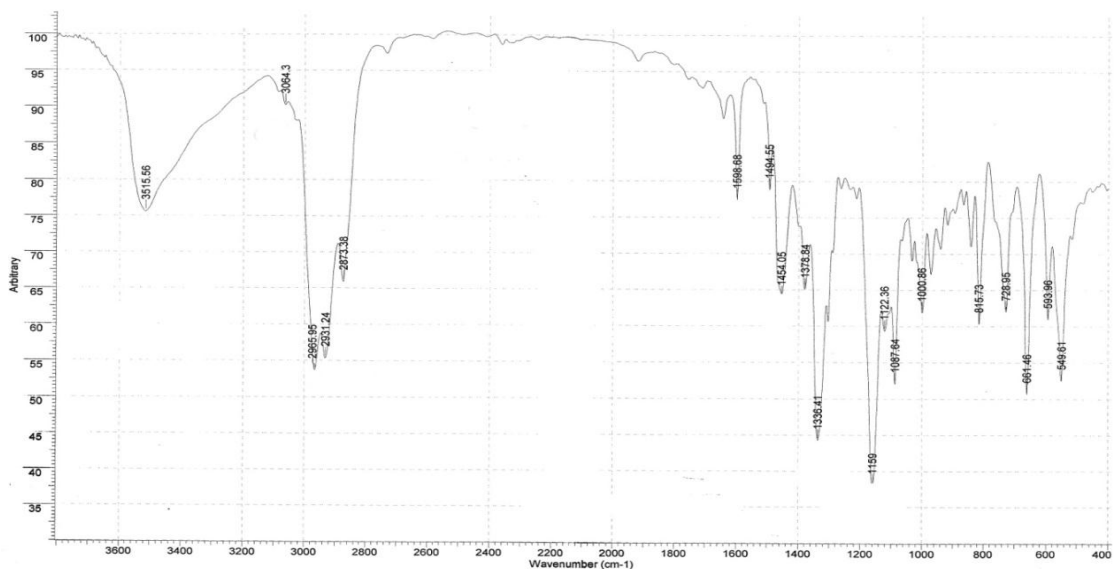


**Esquema 5:** Mecanismo reacional proposto para a tosilção.

### Caracterização de *N*-propil-*N*-(2-hidroxi-5-isopropenil-2-metilciclohexil)4-metilbenzeno-1-sulfonamida – LaSOM 123

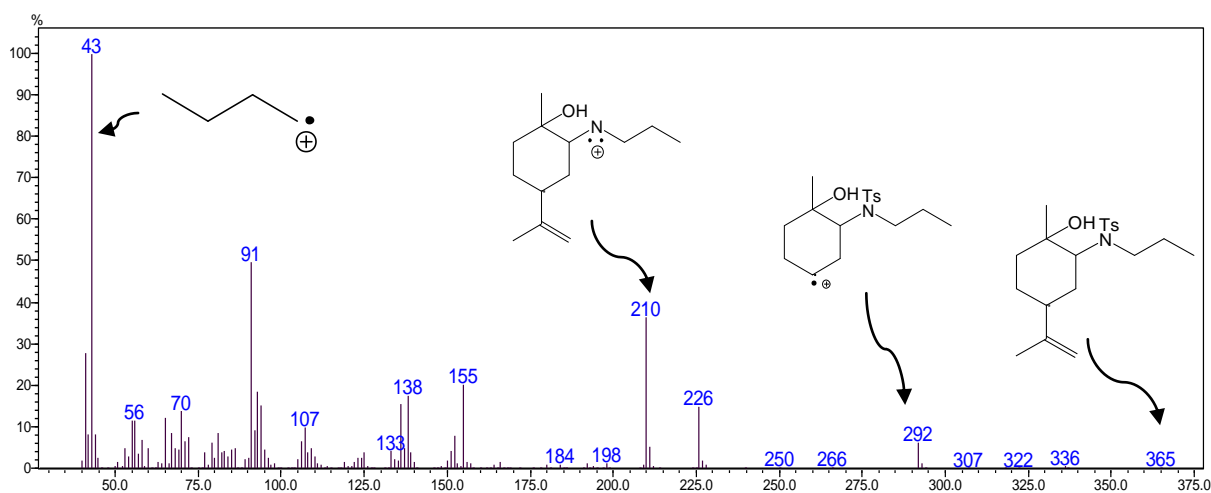
A análise do infravermelho do produto (figura abaixo) mostra em  $3.515\text{ cm}^{-1}$  a banda correspondente ao OH. Em  $3064\text{ cm}^{-1}$  observa-se a deformação axial de C-H de aromático. Em  $1454$  e  $1378\text{ cm}^{-1}$  encontram-se bandas correspondentes ao estiramento C=C aromático. Em  $1336\text{ cm}^{-1}$  observa-se o estiramento S=O assimétrico (forte) e em  $1159\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento simétrico (forte) de S=O.





**Figura 18:** Espectro de absorção na região do infravermelho do **LaSOM 123**.

O espectro de massas do LaSOM 123 está representado na figura 24. Destacam-se as seguintes fragmentações: 365 u.m.a. (0,67%) referente ao íon molecular; 292 u.m.a (8,4%), referente à perda da porção exocíclica contendo o grupamento isopropenila; 210 u.m.a (39,78%) referente à perda do grupamento *p*-toluenosulfonila; 155 u.m.a. referente à perda do grupamento aminoálcool e 43 u.m.a que é o pico base (100%).



**Figura 19:** Espectro de massas do produto **41**, com a representação da estrutura de alguns fragmentos.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do LaSOM 123 está apresentado na figura 25. Observa-se em 7,3 e 7,5 observamos dois dubletos correspondente a 4H, representando o anel aromático com substituição na posição *para*. Além disso, o aparecimento do singlete em 2,4 representando os hidrogênios da metila (H-7'') ligada ao anel aromático fazendo parte do grupamento sulfonamida. Outro dado que demonstra a formação do produto são os efeitos que o grupamento *p*-toluenossulfonila apresenta sobre os hidrogênios vizinhos ao Nitrogênio. Observa-se no espectro que houve um deslocamento químico considerável, o pico referente a H4 deslocou de 2,0 ppm para 3,2 ppm, além do H2, que passou de 2,6 ppm para 3,6 ppm. Se não bastasse isso, nota-se em 4,5 ppm e 4,7 ppm dois singletos dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio olefínicos (H10a e H10b), esses hidrogênios são desblindados pelo efeito anisotrópico dos elétrons  $\pi$  da ligação dupla, além de não serem equivalentes magneticamente, como é observado no espectro do produto de partida. Acredita-se que isso ocorra também pela compressão estérica e pela eletronegatividade do grupamento *p*-toluenossulfonila.

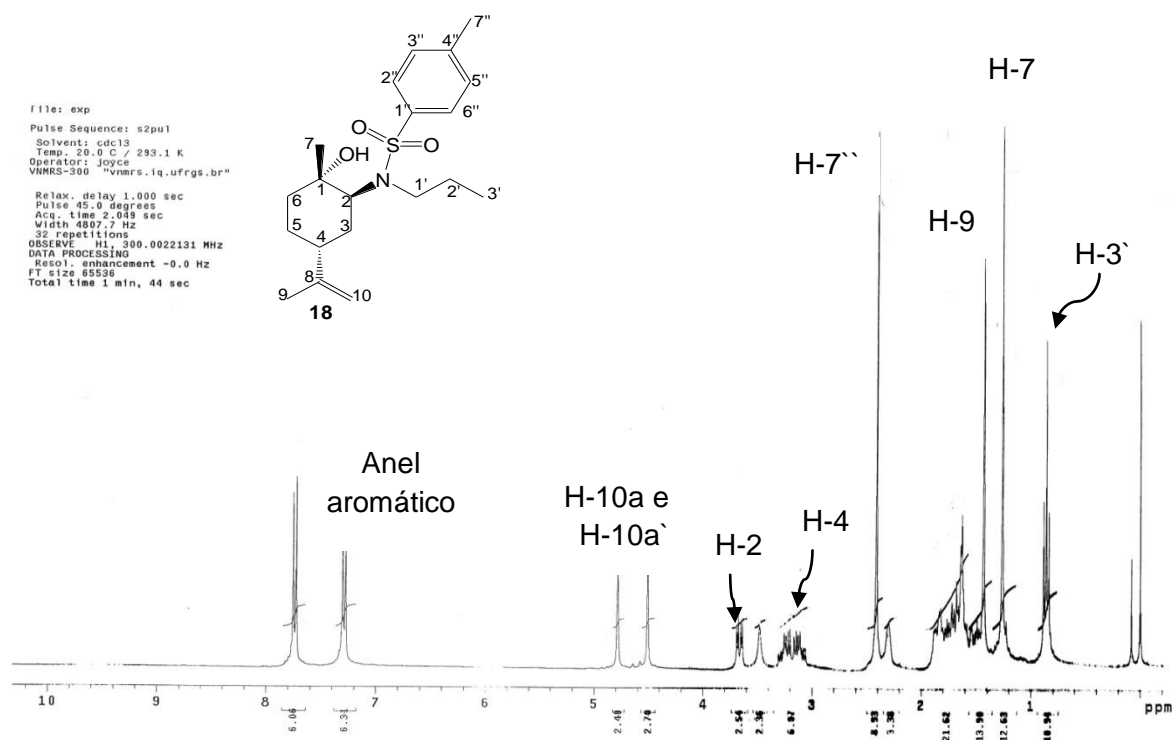
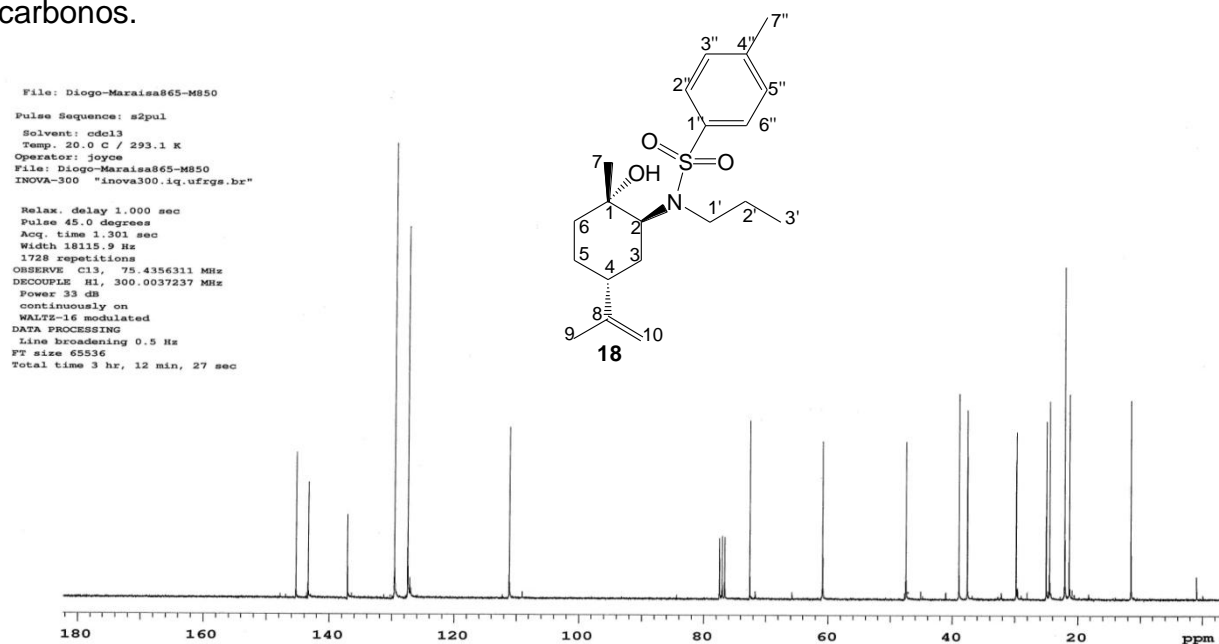


Figura 20: Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do produto 41

O  $^{13}\text{C}$  RMN do produto acima mostra os sinais referentes a todos os carbonos do produto em questão. Na figura 26 estão atribuídos os números referentes aos carbonos.

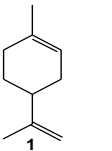
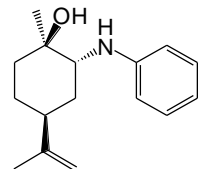
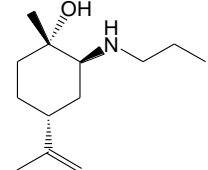
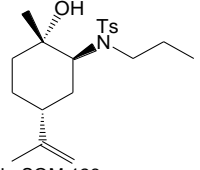
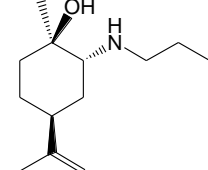
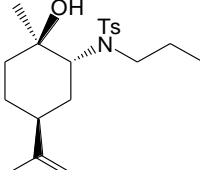
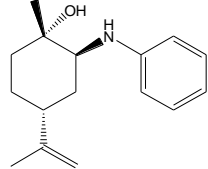


**Figura 21:**  $^{13}\text{C}$  RMN do LaSOM 123, com atribuição em cada pico relacionada ao respectivo átomo de carbono.

### 3.2 Atividade anti-leishmania

Os ensaios foram realizados sob a coordenação da Professora Silvia R. B. Uliana, do Laboratório de Parasitologia no Instituto de Ciências Biomédicas da USP-São Paulo. Dentre os testes utilizados para essa finalidade, optou-se por fazer o microteste MTT já que o grupo de pesquisa da USP já havia demonstrado com Nascimento<sup>28</sup> uma comparação entre a eficiência desse microteste e a contagem celular como métodos de avaliação de viabilidade celular. Concluiu-se que o microteste MTT modificado se mostrou eficaz na avaliação da sensibilidade *in vitro* de promastigotas de *Leishmania* em 24 horas de tratamento. Os produtos sintetizados nessa tese tiveram sua atividade anti-leishmania testada *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Os resultados de  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$  calculados com o programa Origin 7.5 estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividade anti-leishmania de compostos sintetizados e do limoneno 1 (LaSOM 11)

Compostos Sintetizados	IC <sub>50</sub> (μM)*	IC <sub>90</sub> (μM)*	Compostos Sintetizados	IC <sub>50</sub> (μM)*	IC <sub>90</sub> (μM)*
 LaSOM 11 <b>1</b>	299,2 ± 2,5	821	 LaSOM 122 <b>40</b>	232,6 ± 4,49	688,7
 LaSOM 28 <b>8</b>	> 1012	> 1012	 LaSOM 123 <b>41</b>	82,1 ± 9,47	168,5
 LaSOM 121 <b>39</b>	> 1012	> 1012	 LaSOM 124 <b>42</b>	90,1 ± 19,1	160,3
 LaSOM 08 <b>12</b>	269,21 ± 15,4	459,4			

\*Os valores de IC<sub>50</sub> estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos com *L. amazonenses* por 24h.

Os resultados expressos mostram que à exceção dos derivados **8** e **39** todos os compostos foram mais ativos que o limoneno, apresentando valores de IC<sub>50</sub> que variaram de 82,1 ± 9,47 a 269,21 ± 15,4 μM e IC<sub>90</sub> entre 168,5 a 688,7 μM. Observa-se, a partir dos resultados obtidos, que não houve diferença significativa através, de análise de variância ANOVA, no potencial de atividade entre os isômeros. Também se pode verificar que os derivados contendo como substituinte o grupamento

sulfonamida foram mais eficazes que os aminados. É possível observar que as modificações estruturais realizadas nos compostos causaram diferenças na atividade anti-leishmania *in vitro* dos mesmos. Embora não seja possível estabelecer uma regra geral, devido ao pequeno número de compostos testados, pode-se traçar um paralelo entre eles.

Os substituintes introduzidos no limoneno são tanto de natureza aromática quanto alifática. Isto foi planejado, objetivando-se detectar possíveis influências na atividade em função do caráter hidrofóbico dos derivados. Nota-se que o aumento do volume espacial do substituinte em torno do átomo de nitrogênio parece ser responsável pelas alterações na atividade dos derivados. Isso é observado quando comparamos LaSOM 28 **8** e LaSOM 121 **39** aos demais derivados do limoneno, tosilados ou não. Também, comparando-se os derivados de *n*-propilamina ( $IC_{50} > 1012$ ), com os derivados da anilina LaSOM 8 e LaSOM 122 **40** ( $IC_{50} 269,21 \pm 15,4$  e  $232,6 \pm 4,49$ ) nota-se uma diferença significativa na atividade desses compostos. Isso mostra que a lipofilicidade parece ter influência na atividade detectada.

Os resultados dos ensaios permitem constatar que os derivados mais ativos são sulfonamidas LaSOM 123 **41** ( $IC_{50} 82,1 \pm 9,47$ ;  $IC_{90} 168,5$ ) e LaSOM 124 **42** ( $IC_{50} 90,1 \pm 19,1$ ;  $IC_{90} 160,3$ ). Verifica-se que introdução dos grupamentos sulfonamida e hidroxila resultaram em benefícios quando comparados aos demais derivados testados e com o precursor **1** ( $IC_{50} 299,2 \pm 2,5$ ;  $IC_{90} 821$ ).



## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais

Os óxidos de limoneno (*R*) e (*S*) foram utilizados após interação com alumina ativada para retirada de peróxidos. As aminas, quando necessário, foram destiladas para manter a pureza e mantidas sob KOH. Em relação aos gases, o argônio (White Martins, 99,999%) foi passado por 3 *traps* contendo catalisador BASF R3-11, KOH e peneira molecular de 3Å ativada. O monóxido de carbono (AGA, 99,5%) e o hidrogênio (White Martins, 99,999%) foram utilizados sem nenhum tratamento prévio. A solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 20% foi preparada para cada teste.

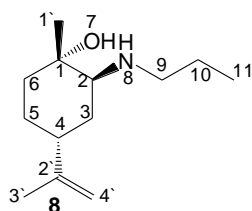
Os solventes utilizados neste trabalho foram previamente purificados conforme PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. Purification of Laboratory Chemicals, 3 Ed. New York: Pergamon Press, 1988, 391 p.

### 4.2 Protocolos sintéticos

#### 4.2.1 Procedimento geral para síntese de $\beta$ -aminoálcoois

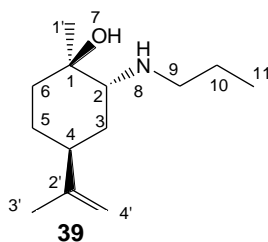
Em uma ampola de vidro, foram adicionados de óxido de limoneno **2** ou **3** (1mL, 6,10 mmol), água destilada (0,3 mL ) e propilamina (0,84mL, 10,21mmol) ou anilina (0,5mL, 6,2mmol). O bruto reacional foi imerso em banho de óleo à 100°C por 18 ou 24 horas, sob intensa agitação. O aminoálcool obtido foi purificado por destilação horizontal e cromatografia em coluna (usando como eluentes: hexano e acetato de etila). Os produtos foram analisados por CG-MS, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN.

#### LaSOM 28 (**8**): 2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



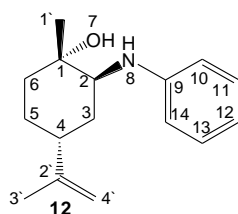
Tempo de aminólise: 24 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG\_FID): 48% e o rendimento reacional obtido foi de 43,2%.  $[\alpha]_D^{20} = + 40$  (c=1.1, Etanol).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  0,9 (3H, t,  $J=7,4$  Hz, H-11), 1,2 (3H, s, H-1'), 1,5 (4H, m, H-5-6), 1,7 (3H, s, H-3'), 1,98 (2H, m, H-4), 2,45 (1H, m, H-9), 2,6 (4H, m, H-2), 4,8 (2H, s, H-4').  $^{13}\text{C RMN}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  11,7 (C-1' e C-3'), 21,5 (C-11); 23,4 (C-10), 25,5 (C-5), 30,2 (C-6), 34,4 (C-3), 37,9 (C-4), 50,0, (C-9); 61,7 (C-2), 71,9 (C-1), 109,2 (C-4'), 148,4 (C-2').

### LaSOM 121 (39): 2-(propilamino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



Tempo de aminólise: 24 horas. A purificação foi feita por destilação fracionada. Rendimento (CG\_FID): 44% e o rendimento reacional obtido foi de 39,9%.  $[\alpha]_D^{20} = - 49$  (c=1.17, Etanol)  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  0,88 (3H, t,  $J=7,38$  Hz, H-11), 1,18 (3H, s, H-1'), 1,7 (4H, m, H-5-6), 1,7 (3H, s, H-3'), 1,91 (2H, m, H-4), 2,4 (1H, m, H-9), 2,6 (2H, m, H-2), 4,7 (2H, s, H-4').  $^{13}\text{C RMN}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  12,0 (C-1' e C-3'), 21,5 (C-11); 23,4 (C-10), 25,9 (C-5), 30,2 (C-6), 34,5 (C-3), 37,9 (C-4), 50,0 (C-9); 61,7 (C-2), 72,0 (C-1), 109,3 (C-4'), 148,3 (C-2').

### LaSOM 8 (12): 2-(anilino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol

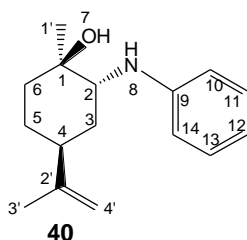


Essa aminólise teve o tempo reacional reduzido para 18h. A purificação foi feita por destilação fracionada. O rendimento (CG-FID) foi de 17% e o rendimento reacional obtido foi 13,8%.  $[\alpha]_D^{20} = + 52$  (c=1,14 Etanol).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,



ppm): 1,2 (3H, s, H-1'), 1,65 (4H, m, H-5-6); 1,7 (3H, s, H-3'), 1,95 (2H, m, H-3), 2,0 (1H, m H-4); 3,49 (1H, t, H-2); 4,7 (2H, s, H-4'); 6,65 (6H, m, H-10, 12, e 14); 7.1 (2H, sex, H-11 e 13).  $^{13}\text{C RMN}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  21,3 (C-1' e C-3'), 26,1 (C-5), 31,3 (C-6), 34,4 (C-3), 38,9 (C-4), 57,6 (C-2), 72,4 (C-1), 110,0 (C-4'), 112,6 (C-10-14), 116,9 (C-12), 118,8 (C-11e C-13), 147,6 (C-2'); 148,8 (C-9).

### LaSOM 122 (40): 2-(anilino)-4-isopropenil-1-metilcicloexanol



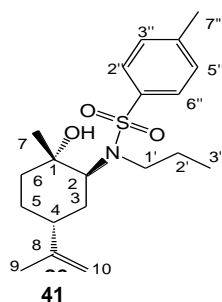
Essa aminólise teve o tempo reacional reduzido para 18h. A purificação foi feita por destilação fracionada. O rendimento (CG-FID) foi de 21% e o rendimento reacional obtido foi 16,2%.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -42$  ( $c=1,02$  Etanol).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 1,2 (3H, s, H-1'), 1,64 (4H, m, H-5-6); 1,69 (3H, s, H-3'), 1,95 (2H, t, H-3), 2,0 (1H, m H-4); 3,49 (1H, t, H-2); 4,7 (2H, s, H-9); 6,68 (3H, m, H-10, 12, e 14); 7,1 (2H, sex, H-11 e 13).  $^{13}\text{C RMN}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  21,39 (C-1' e C-3'), 26,0 (C-5), 31,2 (C-6), 34,0 (C-3), 38,8 (C-4), 57,5 (C-2), 72,2 (C-1), 110,1 (C-4'), 112,4 (C-10-14), 116,5 (C-12), 118,6 (C-11 e C-13), 147,26 (C-2'); 148,2 (C-9).

#### 4.2.2 Procedimento geral para síntese de derivados tosilados.

Em um balão de duas bocas com agitador magnético sob atmosfera inerte com argônio, foram colocados 3 ml de diclorometano, 0,47 mmol do aminoálcool (LaSOM 28 **8** ou LaSOM 121 **39**) e trietilamina (0,47 mmol, 2 equiv.). O balão foi colocado em um banho de gelo e adicionado cloreto de *p*-toluenosulfonila (0,47 mmol, 1 equiv.) lentamente, num um intervalo de tempo de 10 minutos. Trinta minutos após o início da adição o banho de gelo foi retirado e o balão continuou sob agitação vigorosa durante mais 2:30 horas a temperatura ambiente. Após esse

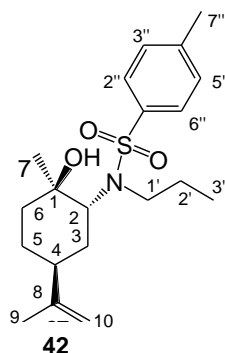
tempo o solvente foi removido em evaporador rotatório, o resíduo foi retomado com acetato de etila e extraído com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e filtrada. O solvente foi removido em evaporador rotatório e o resíduo bruto foi purificado com cromatografia em coluna com eluente 1:1 hexano e acetato de etila.

**LaSOM 123 (41): *N*-propil-*N*-(2-hidroxi-5-isopropenil-2-metilciclohexil)4-metilbenzeno-1-sulfonamida**



Essa reação foi desenvolvida num tempo total de 3 h. A purificação foi feita com cromatografia em coluna (usando como eluentes: hexano e acetato de etila). O rendimento (CG-FID) foi de 55% e o rendimento reacional obtido foi 53,2%.  $[\alpha]_D^{20} = +25$  (c=1,06 Etanol).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  0,86 (3H, t,  $J=7,2\text{Hz}$ , H-3'), 1,26 (3H, s, H-7), 1,43 (3H, s, H9), 1,6 (4H, m, H5-6), 1,7 (4H,m, H3 e H2'), 1,83 (1H, m, H4), 2,41 (3H, s, H7''), 3,2 (2H,m, H4), 3,6 (1H,q,  $J=7,2\text{Hz}$  e  $J=4,2\text{Hz}$ , H2), 4,5 (1H,s, H10a), 4,78 (1H,s, H10b), 7,3 (2H, m, H3''+ H5''), 7,75 (2H, d, H2'' + H6'').  $^{13}\text{C RMN}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  11,4 (C-3'), 21,3 (C-7 e C-9), 22,0 (C-7''), 24,4 (C-2'), 24,9 (C-5), 29,7 (C-6), 37,5 (C-3), 38,9 (C-4), 47,4 (C-1'), 60,8 (C-2), 72,5 (C-1), 111,0 (C-10), 127,4 (C-2'' e C-6''), 129,9 (C-3'' e C-5''), 137,0 (C-1''), 143,3 (C-4''), 145,2 (C-8).

**LaSOM 124 (42): *N*-propil-*N*-(2-hidroxi-5-isopropenil-2-metilciclohexil)4-metilbenzeno-1-sulfonamida**



Essa reação foi desenvolvida num tempo total de 3 h. A purificação foi feita com cromatografia em coluna (usando como eluentes: hexano e acetato de etila). O rendimento (CG-FID) foi de 50% e o rendimento reacional obtido foi 49,5%.  $[\alpha]_D^{20} = -29$  (c=1,12 Etanol).  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  0,89 (3H, t,  $J=7,2\text{Hz}$ , H-3'), 1,2 (3H, s, H-7), 1,4 (3H, s, H9), 1,44 (2H, m, H3), 1,59 (4H,m, H 2' e H3), 1,7 (4H, m, H5-6), 1,73 (1H, m, H9), 2,48 (3H, s, H7''), 3,2 (2H,m, H4), 3,6 (1H,q,  $J= 7,2\text{Hz}$  e  $J= 4,2\text{Hz}$ , H2), 4,5 (1H,s, H10a), 4,73 (1H,s, H10b), 7,2 (2H, m, H3''+ H5'')7,66 (2H, d, H2'' + H6'').  $^{13}\text{C RMN}$  (75,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$  11,4 (C-3'), 21,3 (C-7 e C-9), 22,0 (C-7''), 24,4 (C-2'), 24,9 (C-5), 29,7 (C-6), 37,5 (C-3), 38,9 (C-4), 47,4 (C-1'), 60,8 (C-2), 72,5 (C-1), 111,0 (C-10), 127,4 (C-2'' e C-6''), 129,9 (C-3'' e C-5''), 137,0 (C-1''), 143,3 (C-4''), 145,2 (C-8).

### 4.3 Avaliação da atividade biológica dos compostos contra formas promastigotas de *Leishmania sp.*

Para avaliação da sensibilidade de isolados de *Leishmania* dos compostos (limoneno e seus derivados), foram utilizadas as formas promastigotas de isolados obtidos dos pacientes e das cepas referência de *L. amazonensis* MHOM/BR/1973/M2269.

#### 4.3.1 Microteste de MTT com limoneno e derivados sintetizados

O teste de MTT foi modificado a partir do método descrito por Moreira em 1996<sup>36</sup>. Os parasitas foram mantidos *in vitro* em meio Schneider's *Drosophila medium* (pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 26 °C em estufa

biológica, sendo utilizados somente até a quinta passagem para garantir a infectividade dos parasitas nos ensaios. Promastigotas em fase logarítmica tardia (3 a 4 dias de cultura) foram coletados por centrifugação a  $1000 \times g/10$  min e ressuspensos em meio 199 para concentração de  $2 \times 10^7/mL$ . Em uma placa de 96 poços foi distribuído em triplicata  $150\mu L$  da suspensão contendo  $3 \times 10^6$  parasitas. Concentrações crescentes dos compostos foram adicionadas (5, 15, 45, 135, 405 e  $1012 \mu M$ ) e a placa foi incubada a  $25^\circ C$  por 24h ou 48h. Após o período de incubação foi acrescentado  $30\mu L$  da solução de MTT  $5mg/mL$ . A suspensão foi incubada por 2h. A reação foi interrompida adicionando-se  $50\mu L$  da solução de SDS 20% e homogeneizando-se o conteúdo a cada poço. A leitura foi realizada em leitor de ELISA medindo-se a densidade óptica (DO) a 595 nm, usando como referência 690 nm. A mitocôndria do parasito vivo converte o MTT em um produto corado denominado formazan, que pode ser medido espectrofotometricamente<sup>37</sup>. Os experimentos com cada isolado foi feito em triplicata.

#### **4.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada através de análise de variância ANOVA. Os resultados são considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5% ( $p < 0,05$  e intervalo de confiança de 95%). Para as análises dos dados de  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  (concentração da droga que inibe 50 e 90% da viabilidade celular) foi utilizado o programa Origin 7.5.

## 5 CONCLUSÕES

O óxido de limoneno se mostrou um ótimo material de partida para a geração de  $\beta$ -aminoálcoois e derivados tosilados. As reações efetuadas com métodos convencionais se mostraram reprodutíveis e com rendimentos bons a excelentes. Foi possível então, usando o limoneno **1** como produto de partida, sintetizar através de protocolos simples e escalonáveis, uma família de aminas derivadas do terpeno.

Através do ensaio da atividade anti-leishmania observou-se que das moléculas testadas, a grande maioria apresentou valores de  $IC_{50}$  inferior ao do limoneno (protótipo). Foi observado também que não houve diferença significativa na atividade biológica entre os derivados dos diferentes diastereoisômeros (*R*) e (*S*) do óxido de limoneno.

Além disso, as modificações introduzidas no limoneno conduziram a compostos com atividade anti-leishmania promissora, pelo menos contra as formas promastigotas, comprovando a hipótese de que substituintes sulfonamida podem levar a compostos biologicamente ativos. Também, observa-se que o volume e a natureza hidrofóbica do derivado parece ser importante na atividade dos compostos.

Finalmente, de acordo com a literatura, é provável que os compostos apresentem essa atividade através da inibição da biossíntese de esteróis do parasita. O mecanismo propriamente dito não é conhecido, sendo necessários mais estudos farmacológicos para elucidá-lo. Outros ensaios devem ser realizados contra formas amastigotas de leishmania, bem como *in vivo*, a fim de que estes compostos possam ser modulados objetivando sua transformação em candidatos a fármacos contra leishmania.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SHAW, P.E. Review of quantitative analyses of citrus essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 27, p. 246-257, 1979.
2. HARCASTLE, R. I.; ROWLANDS, M. G.; BARBER, A.M.; GRIMSHAW, R.M.; MOHAN, M.K.; NUTLEY, B.P.; JARMAN, M. **Biochemistry Pharmacology**. v.57, p. 801-809, 1999.
3. CHRISMAN, W.; CAMARA, J. N.; MARCELLINI, K.; SINGARAM, B.; GORALSKI, C. T.; HASHA, D. L.; RUDOLF, P. R.; NICHOLSON, L. W.; BORODYCHUK, K. K. A simple and convenient synthesis of  $\beta$ -amino alcohols chiral auxiliaries based on limonene oxide. **Tetrahedron Letters**. v. 42, p. 5805, 2001.
4. PLACZEK, A. T.; DONELSON, J. L.; TRIVEDI, R.; GIBBS, R. A.; DE, S. K. Scandium triflate as an efficient and useful catalyst for the synthesis of  $\beta$ -amino alcohols by regioselective ring opening of epoxides with amines under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 9029, 2005.
5. ISHIDA, S.; SUZUKI, S.; HAYANO, T.; FURUNO, H.; INANAGA, J. Heterogeneous catalysis of novel polymeric rare earth complexes under solvent-free conditions: Zero-emission synthesis of  $\beta$ -amino alcohols. **Journal of Alloys and Compounds**. v 408–412, p 441–443, 2006.
6. KURESHY, R. I.; SINGH, S.; KHAN, N. H.; ABDI, S. H. R.; SURESH, E.; JASRA, R.V. Efficient method for ring opening of epoxides with amines by NaY zeolite under solvent-free conditions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 264, p. 162–169, 2007.
7. FUKAMIYA, N.; OKI, M.; OKANO, M.; ARANTANI, T. A Synthesis of beta-bisabolene by the manganese (III) acetate reaction. **Chemistry & Industry**. v.3, p.96, 1981.
8. POSNER, G.H.; ROGERS, D. Z. Organic Reactions at Alumina Surfaces.Mild and Selective Opening of Epoxides by Alcohols, Thiols, Benzeneselenol, Amines,and Acetic Acid. **Journal of the American Chemical Society**. v. 99 p. 8208- 8214, 1977.
9. YAMAMOTO, Y.; ASAO, N.; MEGURO, M.; TSUKADA, N.; NEMOTO, H.; SADAYORI, N.; WILSON, J.G.; NAKAMURA, H. Regio- and Stereo-selective Ring Opening of Epoxides with Amide Cuprate Reagents. **Journal of the Chemical Society-Chemistry Communications**. v. 15, p 1201-1203, 1993.

10. SAGAWA, S.; ABE, H.; HASE, Y.; INABA, T. Catalytic Asymmetric Aminolysis of 3,5,8-Trioxabicyclo[5.1.0]octane Providing an Optically Pure 2-Amino-1,3,4-butanetriol equivalent. **Journal of Organic Chemistry**. v. 64, p. 4962-4965, 1999.
11. CHINI, M.; CROTTI, P.; MACCHIA, F. Metal salts as new catalysts for mild and efficient aminolysis of oxiranes. **Tetrahedron Letters**. v. 31, p. 4661-4664, 1990.
12. KOTSUKI, H.; HAYASHIDA, K.; SHIMANOUCI, T.; NISHIZAWA, H. High-Pressure Organic Chemistry. High-Pressure-Promoted, Silica Gel-Catalyzed Reaction of Epoxides with Nitrogen Heterocycles. **Journal of Organic Chemistry**. v. 61, p 984-990, 1996.
13. MOJTAHEDI, M. M.; SAIDI, M. R.; BOLOURTCHIAN, M. Microwave-assisted Aminolysis of Epoxides Under Solvent-free Conditions Catalyzed by Montmorillonite Clay. **Journal of Chemical Research**. p. 128-129, (S) 1999.
14. FERRARINI, S.R. Síntese de  $\beta$ -aminoálcoois derivados do limoneno e avaliação biológica in vitro. 2008. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS.
15. GRAEBIN, C. Síntese e avaliação farmacológica *in vitro* de aminas derivadas do limoneno. **Tese de Doutorado** em Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, 2008.
16. GRAEBIN, C.; EIFLER-LIMA, V.L.; ROSA, R.G. One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation). **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1066-1070, 2008.
17. CHOOCHOTE, W.; CHAITHONG, U.; KAMSUK, K.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P.; TUETUN, B.; CHAMPAKAEW, D.; PITASAWAT, B. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**. v.78, p. 359-364, 2007.
18. BELANGER, A.; DEXTRACE, L.; ISNARDI, M.J.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P.; COLLIN, G. Chemical composition of essential oil and headspace of the Quebec 'myrique baumier' wax myrtle (*Myrica gale* L.). Influence of the extraction process. **Journal of Essential Oil Research**. v.9, p. 657-662, 1997.
19. JAENSON, T.G.T.; PÅLSSON K.; BORG-KARLSON A.K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. **Medical and Veterinay Etomology**. v.19: p. 345-352, 2005.



20. STUART, A.E. Paralysis culicoides impunctatus after exposure to oil of *Myrica gale*. **Proceedings of the Royal College of Physicians**. v.20, p.463-466, 1990.
21. IBRAHIM, M.A.; KAINULAINEN, P.; AFLATUNI, A.; TIILIKKALA, K.; HOLOPAINEN, J.K. Insecticidal, repellent, antimicrobial, and phytotoxicity of essential oil: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural Food Science Finland**. v.10, p.243-259, 2001.
22. FERRARINI, S; DUARTE, M; DA ROSA, R; ROLIM, V; EIFLERLIMA, V; VON POSER, G; RIBEIRO, V. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and  $\beta$ -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, p. 1-1, 2008.
23. FERRARINI, S.R. ; GRAEBIN, C.S. ; LIMBERGER, J.; CANTO, R.F.S. ; DIAS, D.O. ; ROSA, R.G. DA; MADEIRA, M.F.; EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis of limonene and  $\beta$ -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, p. 773, 2008.
24. NAKAMURA, C.V., TIUMAN, T. S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of infections diseases**. *In press*.
25. CORRÊA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI, D.P.; LIMA, V.M.F. Evolution of transformation growth factor  $\beta$ 1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**. v.143, p.267-274, 2007.
26. CROFT, S. L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitology**. v. 19, p. 502-508, 2003.
27. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. **The Lancet**, v. 366, p. 9496, 1561, 2005.
28. NASCIMENTO, R.C.Z. Determinação da sensibilidade de isolados de *Leishmania* a antimoniato de meglumina, anfotericina B e tamoxifeno. **Dissertação de Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biomédicas- USP**, 2009.
29. GRAEBIN, C.; UCHOA, F.D.; BERNARDES, L.S.C.; CAMPO, V.L.; CARVALHO, I.; EIFLER-LIMA, V.L. Antiprotozoal Agents: an Overview. **Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 345-366, 2009.

30. REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
31. SINGH, S.,SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v.10 (6), 307-315, 2004.
32. IWU MM, JACKSON JE, SCHUSTER BG. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology Today** p.65-68, 1994.
33. ROCHA, LG, ALMEIDA JR, MACE^ DO RO, BARBOSA-FILHO JM. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**. v.12, p-514-535, 2005.
34. RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v.39, p.603-6013, 2001.
35. ARRUDA, D. C. Caracterização da atividade leishmanicida de nerolidol e limoneno e da interferência desses terpenos na biossíntese de isoprenóides. **Tese de Doutorado**- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo-USP, 2007.
36. MOREIRA, M. E. C.; DEL PORTILLO, H. A.; MILDER, R. V.; BALANCO, J. M. F.; BARCINSKI, M. A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of Cellular Physiology**. v. 167, p. 305-313, 1996.
- 37 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.
- 38 SINGARAM, B.; STEINER, D.; IVISON, L.; GORALSKI, C.T.; APPEL, R.B.;GOJKOVICK, J.R. A facile and efficient method for the kinetic separation of commercially available *cis*- and *trans*-limonene epoxide. **Tetrahedron Asymmetry**. v. 13, p. 2359-2363, 2002.
- 39 BHATTACHARYA, G.; HERMAN, H.; DELFÍN, D.; SALEM, M. M.; BARSZCZ, T.; MOLLET, M.; RICCIO, G.; BRUN, R.; WERBOVETZ, K. A. Synthesis and antitubulin activity of N1- and N4-substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against african trypanosomes and leishmania. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47, p. 1823-1832, 2004.
- 40 SILVA, L. E.; JOUSSEF, A. C.; PACHECO, L. K.; SILVA, D. G.; STEINDEL, M.; REBELO, R. A. Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 15, p. 7553-7560, 2007.

41 OLLIARO, P. L.; GUERIN, P. J.; GERSTL, S.; HAASKJOLD, A. A.; ROTTINGEN, J-A.; SUNDAR, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. **Lancet Infectious Diseases**. v. 5, p. 763-774, 2005.

42 AEDO, J. R. N. G. Atividade do álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.

43 MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora MS, 2003.

44. LIMBERGER, J. Carbonilação catalítica de alilaminoálcoois: síntese de hidróxigama-lactamas e oxazolidinas bicíclicas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.





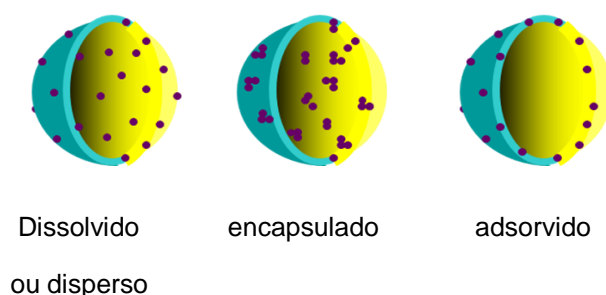


# DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO DERIVADOS AMINADOS DO LIMONENO PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os sistemas carreadores, destacam-se os sistemas nanométricos coloidais ou nanopartículas poliméricas. Dentre os sistemas carreadores, temos as nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões, que são organizações moleculares distintas. Isso conduz a arquiteturas específicas para cada tipo, influenciando o comportamento *in vivo* e, conseqüentemente, a aplicabilidade de cada sistema.

Nanocápsulas e nanoemulsões são os dois tipos de nanossistemas de maior interesse nesse trabalho. As nanocápsulas são sistemas reservatórios envoltos por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo lipofílico. O fármaco pode estar disperso ou dissolvido no núcleo lipofílico e/ou adsorvido a parede polimérica (Figura 31). Já as nanoemulsões são emulsões submicrométricas, nas quais uma dispersão líquido-líquido é estabilizada por agregados de tensoativo<sup>1,2,3</sup>



**Figura 22:** Modelos de mecanismo de encapsulação de nanocápsulas. Adaptado de Guterres, 2007<sup>1</sup>.

Nas três últimas décadas foi feito um grande investimento no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para o tratamento de doenças, como câncer e doenças negligenciadas como a leishmaniose, doença discutida no segundo capítulo dessa tese. Esses sistemas funcionam como estratégias eficientes para transportar o fármaco a seu local de ação através da

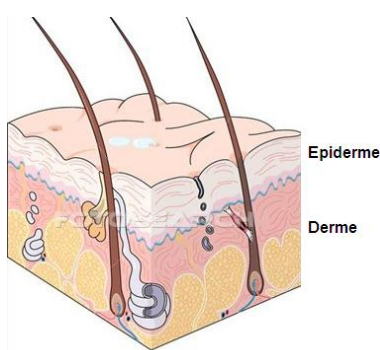
escolha de um carreador e da rota adequada. A escolha do sistema depende principalmente do seu alvo e da estrutura química do ativo a ser transportado.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A pele íntegra

Tendo como principais funções a proteção contra agentes externos, a regulação térmica, a defesa orgânica, o controle do fluxo sanguíneo, a proteção contra agentes externos. A pele é o maior órgão do corpo e também atua como receptora de estímulos sensoriais. É formada por duas camadas, epiderme e derme (figura abaixo) e logo abaixo da derme, um tecido de sustentação formado por tecido adiposo chamado de hipoderme (figura 32)<sup>4,5</sup>.



**Figura 23:** Estrutura esquemática das camadas da pele. fonte: [www.fotosearch.com.br/ilustracao.html](http://www.fotosearch.com.br/ilustracao.html)

A função barreira da pele íntegra é atribuída principalmente ao estrato córneo, Ele atua como uma proteção física e química prevenindo a perda transepitelial de água e mantendo os níveis de hidratação adequados<sup>6</sup>. O estrato córneo é formado de corneócitos circundados por lipídios formando uma estrutura rígida e compacta<sup>7</sup>. Essa barreira formada é essencialmente lipofílica. Por essa razão, moléculas lipofílicas são aceitas mais facilmente pelo estrato córneo. Idealmente, um fármaco deve possuir ambas solubilidades em lipídios e em água. Se ele for muito hidrofílico não será capaz de penetrar por essa camada e se for muito lipofílico tenderá a permanecer no estrato córneo<sup>8</sup>.

### 2.2 A pele lesionada pela leishmaniose cutânea

A leishmaniose assume diferentes formas clínicas, classicamente divididas em: forma tegumentar, que atinge a pele, linfonodo e mucosa. E a forma visceral que ocorre comprometimento do fígado, baço e medula óssea, podendo levar à morte se o indivíduo não for tratado<sup>9,10</sup>. Os mecanismos que determinam as

diferenças na migração do parasita para as vísceras ou para a pele, dependendo da espécie, ainda permanecem desconhecidos. Uma explicação para a diferença no tropismo poderia ser a temperatura, pois na infecção de macrófagos com as espécies que causam leishmaniose visceral, os parasitas crescem a 37°C e na infecção de macrófagos com as espécies que causam leishmaniose tegumentar a temperatura utilizada para o crescimento intracelular dos parasitas é 34°C<sup>11,12</sup>.

A leishmaniose cutânea é uma doença no qual a função da pele é comprometida. As manifestações clínicas se iniciam com pequenas pápulas eritematosas que aumentam vagarosamente de tamanho, transformando-se em nódulos e posteriormente em lesões (figura 33). A anormalidade da pele causada pela patologia não é apenas um fenômeno secundário, mas crítico que pode acarretar alterações inflamatórias de maior gravidade. Quando a superfície externa da pele (extrato córneo) é danificada, uma série de eventos inflamatórios se iniciam. O período de incubação da leishmaniose cutânea varia conforme a espécie dessa doença, estando entre duas semanas a três anos<sup>13</sup>.



**Figura 24:** Pele lesionada. Fonte: N.C. HEPBURN, 2000<sup>10</sup>

Tratar topicamente essa doença é muito interessante, pois os pacientes na maioria das vezes vivem em áreas distantes, com poucos cuidados médicos e medicamentos injetáveis são difíceis de serem obtidos, mantidos e administrados. Além disso, sabe-se que diferentes veículos ou formulações para administração tópica pode potencializar a absorção e a concentração do ativo.

## **2.3 Sistemas de liberação nanoestruturados**

Diversas pesquisas vêm demonstrando o grande potencial da nanotecnologia farmacêutica no tratamento, prevenção e diagnóstico de inúmeras patologias, dentre elas o câncer e doenças parasitárias. Nesse contexto, técnicas inovadoras também estão sendo aplicadas na obtenção de novas formas farmacêuticas de liberação controlada de fármacos capazes de potencializar a ação de agentes ativos<sup>14</sup>. Esses carreadores coloidais de fármacos, como as nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, têm atraído um crescente interesse nos últimos 20 anos como veículos principalmente de fármacos lipofílicos<sup>15,16</sup>. As propriedades que os materiais exibem podem ser únicas e é consequência do seu pequeno tamanho e grande área superficial<sup>17</sup>.

Como estratégia de formulação, a nanoencapsulação propicia uma série de vantagens, várias delas de interesse à terapêutica<sup>1</sup>. A incorporação de substâncias em nanocarreadores pode modular e/ou controlar seus perfis de entrega (imediate ou sustentada)<sup>18,19</sup>. Outros benefícios decorrentes da nanoencapsulação são: o aumento da estabilidade de moléculas lábeis e a melhoria das características oclusivas de formulações (efeito hidratante) devido ao tamanho nanométrico dos sistemas<sup>20,21</sup>.

### **2.3.1 Nanopartículas poliméricas e sua atividade antileishmania.**

As nanopartículas poliméricas apresentam grande importância na área farmacêutica em virtude de serem sistemas coloidais que possuem interessantes propriedades físico-químicas, tais como o tamanho reduzido, ampla área superficial, carga superficial, que as tornam eficientes sistemas para aplicação na liberação controlada de fármacos.

As nanopartículas são constituídas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Os nanosistemas constituídos por polímeros biodegradáveis têm atraído maior atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento.<sup>15</sup> As

nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais, carreadores de fármacos, que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm<sup>22,23</sup>. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a organização estrutural e composição. As nanocápsulas são sistemas reservatórios, constituídos por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são sistemas matriciais formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido<sup>15</sup>.

Um dos primeiros trabalhos envolvendo a nanotecnologia e leishmania foi publicado em 1994. Avaliou-se o potencial de nanocápsulas de ácido poli-láctico (PLA) contendo primaquina *in vivo*, no tratamento com camundongos infectados. Essas nanopartículas foram três vezes mais ativa, reduzindo significativamente a carga parasitária em relação ao fármaco livre. Além disso, estudos com as nanocápsulas sem o ativo demonstrou ausência de atividade biológica. Demonstrando a importância da matriz polimérica na eficácia da nanocápsula<sup>24</sup>.

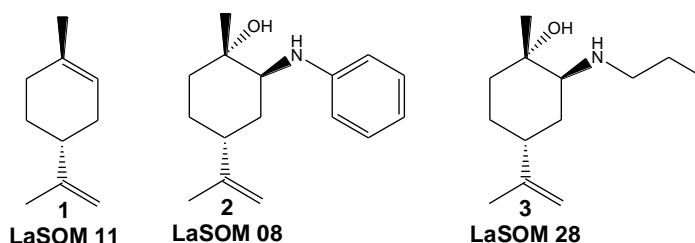
Já, sistemas nanoparticulados baseados em polímeros biodegradáveis como a Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) foram desenvolvidos para melhorar a atividade anti-leishmania e reduzir a toxicidade da anfotericina (AmB). As nanoesferas com AmB foram até três vezes mais eficazes na redução da carga parasitária de camundongos quando comparada a AmB livre. Nesse estudo, observou-se importantes alterações fisiológicas, como a ausência de TNF-alfa e inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos quando utilizou-se nanoesferas. Sendo que se sabe que a atividade leishmanicida de macrófagos depende da produção de radicais livres como O<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub>, em resposta ao interferon gama (IFN-gama)<sup>25</sup>.

A nanotecnologia também foi aplicada para avaliar a atividade anti-leishmania com agentes de origem natural. O 2,6-di-hidroxi-4- metoxichalcona (DMC), obtido da planta *Piper aduncun* foi encapsulado em nanopartículas de PLA e avaliada atividade *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* a nanocápsula contendo DMC se mostrou mais eficaz. E *in vivo*, na concentração de 200µg foi capaz de reduzir 90% da carga parasitária, enquanto que o DMC livre em concentração de 400 µg não apresentou atividade<sup>26</sup>.

Recentemente Ludwig e colaboradores desenvolveram nanopartículas de PLGA contendo  $\beta$ -easina, uma saponina de origem natural presente na semente de castanha-da-índia. As NPs foram preparadas pelo método de emulsificação (A/O/A) e evaporação do solvente. A atividade anti-leishmania *ex vivo* frente a *L. infantum* demonstrou seletividade para formas amastigotas e promastigotas sendo atóxicas.

## 2.4 Estudo anterior do grupo de pesquisa

Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido estudos que visam buscar novos derivados do núcleo limoneno com atividade antiparasitária, especificamente atividade anti-leishmania, discutido no capítulo 1 desse trabalho. Ferrarini e colaboradores em 2008<sup>27</sup> sintetizaram estereoseletivamente diversos  $\beta$ -aminoálcoois e avaliaram suas atividades contra parasitas isolados. Nesse trabalho observou-se que a ação inibitória contra promastigotas foi maior do que o padrão (pentamidina) sendo que dois dentre os compostos sintetizados apresentaram atividade 100 vezes maior. Compostos esses (figura 34) que estão sendo utilizados para o desenvolvimento das nanopartículas.



**Figura 25:** Limoneno e derivados aminados utilizados para a preparação de nanoestruturas

Dessa forma esse capítulo versa sobre o desenvolvimento tecnológico de nanocápsulas contendo limoneno e derivados (LaSOM 08 e LaSOM 28), além de um composto chamado chalcona, com uma parceria com UFRJ. As nanocápsulas foram escolhidas como vetores para administração de compostos e potencializadores da

atividade. Também como abordagem inovadora dessa tese encontra-se o desenvolvimento de veículo semissólido, na qual as nanoestruturas são incorporadas para aplicação tópica para leishmaniose. Paralelamente, ensaios *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos com essas formulações frente a *Leishmania amazonensis*.

### **3 HIPÓTESE DO TRABALHO E OBJETIVOS**

Considerando o exposto, o presente trabalho tem como objetivo a obtenção e caracterização físico-química de nanocápsulas poliméricas contendo limoneno, seus derivados aminados (LaSOM 08 e LaSOM 28) e chalcona (CH8) (obtida da UFRJ).

#### **A hipótese do trabalho desse capítulo**

Verificar a possibilidade de aumentar a concentração de limoneno e de CH8, individualmente, nas formulações e verificar a possibilidade de co-encapsulamento. Adicionalmente, outra hipótese é verificar a possibilidade de ter nanoformulações de derivados aminoálcoois do limoneno tecnologicamente viáveis com perfil de distribuição monomodal, nanoscópico e com características físicoquímicas satisfatórias para incorporação em formas farmacêuticas.





## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

- ❖ Substâncias ativas: *Limoneno*, aminoálcoois sintetizados: (1S,2S,4R)-2-(anilino)-4-isopropenil-1-metilciclohexanol **2**, (1S,2S,4S)-2 propilamino)-4-isopropepil-1-metilciclohexanol **3** e chalcona (CH8), obtida após uma parceria com a prof. Bartira Bergman-UFRJ.
- ❖ Polímero biodegradável: Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)  $\overline{M}_w = 65000 \text{ g.mol}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, França).
- ❖ Tensoativos: lipofílico: Span 60<sup>®</sup> (Monoestearato de sorbitano) (Sigma-Aldrich, Brasil) e hidrofílico: Tween 80<sup>®</sup> (Polissorbato 80) (Delaware, Brasil).
- ❖ Fase oleosa: Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Brasquim, Brasil).
- ❖ Semissólidos: Carbopol ULTREZ, trietanolamina

### 4.2 Aparelhos e Equipamentos

- ❖ Evaporador rotatório (Büchi - Alemanha);
- ❖ Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac<sup>®</sup> - Alemanha);
- ❖ Potenciômetro Denver<sup>®</sup> Instrument VB-10 (Nova Iorque);
- ❖ Agitador Certomat MV (Vitaris – Alemanha);
- ❖ Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Laboratório K213- Instituto de Química- UFRGS):
  - Injetor S-200 (Perkin-Elmer – Estados Unidos);
  - Detector UV-VIS S-200 (Perkin-Elmer – Estados Unidos);
  - Bomba S-200 (Perkin-Elmer – Estados Unidos);
- ❖ Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas eficiência (Central Analítica- Instituto de Química- UFRGS):
  - CG Agilent modelo 6890;
  - MS Agilent modelo 5973;

- Injetor automático modelo 7683;
- ❖ Difractometria de laser (Mastersizer 2000®, Malvern, UK)
- ❖ Espectrômetro de correlação de fótons - Zetasizer nanoseries - modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments – Reino Unido);
- ❖ NanoSight LM10 & NTA 2.0 Analytical Software, NanoSight Ltd.
- ❖ Banho Termostatizado (Ika - Brasil);
- ❖ Banho de ultrassom TransSonic T460 (Elma - Brasil );
- ❖ Turbiscan LAb (Formulaction - França);
- ❖ Viscosímetro vibracional (MODELO AED-SV 10 Série)
- ❖ Cromatografia gasosa (CG-MS, Shimadzu QP 2010- Estados Unidos).

### **4.3 Solventes e outros materiais**

- ❖ Acetonitrila grau CLAE (Tédia, Brasil);
- ❖ Acetona (Nuclear e Quimex, Brasil);
- ❖ Água destilada;
- ❖ Álcool etílico absoluto;
- ❖ Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q® - Millipore, EUA);
- ❖ Membrana 0,45 µm (Millipore, EUA);
- ❖ Pré-coluna LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, Alemanha); Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, Alemanha);

## **4.4 Métodos**

### **4.4.1 Síntese dos β-aminoálcoois**

A síntese dos derivados do limoneno, chamada de aminólise, foi descrita minuciosamente no capítulo 1 desse trabalho. Em uma ampola de vidro, foram adicionados 1mL (6,10 mmols) de óxido de limoneno **1**, 0,3 mL (3eq) de água destilada e amina. O bruto reacional foi imerso em banho de óleo entre 18 a 24 horas à 100°C, sob intensa agitação. Os aminoálcoois foram purificados por cromatografia em coluna e destilação horizontal. Os produtos foram analisados por CG-MS, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN e IV.

## **4.4.2 Etapa de pré-formulação**

### **4.4.2.1 Teste de inchamento de polímero**

Os filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e Eudragit RS<sup>®</sup> foram obtidos através da dissolução completa de 650mg do polímero em 30 mL de acetona num béquer de 60mL. Na seqüência procedeu-se a evaporação total do solvente orgânico à temperatura ambiente, dentro da capela de exaustão. Com o filme polimérico obtido, cortou-se pequenos pedaços pesando em torno de 100mg. Esses pequenos filmes foram colocados em frascos âmbar que continham o limoneno **1**, o LaSOM 08 **2** ou o LaSOM 28 **3**. Foram fechados e protegidos da luz. Os filmes foram retirados dos óleos, secos suavemente com papel absorvente e pesados em balança analítica nos tempos 0, 15 e 30 dias.

### **4.4.3 Preparação das suspensões de nanocápsulas**

Além das suspensões de nanocápsulas contendo limoneno, LaSOM 08 e LaSOM 28, foram desenvolvidas suspensões de nanocápsulas em uma parceria com a prof. Bartira Bergman-UFRJ. Foi fornecida pela parceria, um composto ativo sintetizado chamado de chalcona, o qual será referido como CH8. Para a preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas foi utilizado o método descrito previamente<sup>28</sup> baseado na deposição interfacial de polímero pré-formado<sup>29</sup> (FESSI et al., 1988 *apud* GOVENDER,1999). Inicialmente obteve-se suspensões de nanocápsulas através da preparação da fase orgânica, dissolvendo o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (100 mg), monoestearato de sorbitano (40 mg), a substância ativa (0,5 mg/mL, com exceção da chalcona (0,05-0,5 mg/mL) e do limoneno 25 mg/mL) e o TCM (120 mg) em 25 mL de acetona em banho-maria à 37°C. Na suspensão de nanocápsulas de limoneno foram adicionados na fase orgânica 25mg de sândalo e almíscar para atuarem como âncora molecular. Separadamente, na fase aquosa, dissolveu-se o polissorbato 80 (90 mg) em 53 mL de água Milli Q<sup>®</sup>, à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a fase orgânica foi vertida lentamente com o auxílio do funil sob agitação moderada. Após 10 minutos procedeu-se à evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório sob

pressão reduzida e concentração da suspensão para aproximadamente 9 mL para ajuste do volume final de 10 mL em balão volumétrico. As formulações foram preparadas em triplicata e apresentaram concentração final teórica de 0,5 mg/mL. As suspensões foram armazenadas em frasco fechado de vidro âmbar. Foram preparadas, para fins comparativos, suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) sem conter ativos. Nessa formulação a quantidade de TCM utilizada foi de 160 mg.

Posteriormente formulações contendo limoneno, LaSOM 08, LaSOM 28, CH8, co-encapsulados limoneno+CH8 e LaSOM 08+CH8 foram desenvolvidas com a mesma metodologia citada anteriormente, porém com o dobro da fração volumétrica. Todo o processo realizado envolvendo CH8 empregou-se vidraria âmbar visto que esse composto é fotossensível.

#### **4.4.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas**

As nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao seu teor de ativo, diâmetro médio da nanopartículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, pH, viscosidade e morfologia. As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 30 dias. Os experimentos foram realizados em triplicatas de lotes.

##### **4.4.4.1 Determinação do tamanho da partícula por difratometria de laser**

As formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro médio de esfera equivalente ( $d_{4.3}$ ) e distribuição de tamanho de partícula (*Span*) por difração de laser empregando o equipamento Malvern Mastersizer 2000®. As análises foram obtidas a 25°C com um pequeno volume da amostra para detectar a presença de micropartículas, em aproximadamente 100 mL de água destilada como meio dispersante.

Os valores de *Span* são calculados matematicamente (equação 1), e é um parâmetro importante para avaliar a distribuição dos diâmetros característicos da amostra denotados como  $d_{0,1}$ ,  $d_{0,9}$  e  $d_{0,5}$ .

$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde  $d_{0,1}$  é o diâmetro cumulativo em volume de 10% da fase dispersa da nanoestrutura analisada. Do mesmo modo,  $d_{0,9}$  é o diâmetro cumulativo em volume de 90% da população total. Finalmente  $d_{0,5}$  é o parâmetro que divide a distribuição percentual de volume obtida exatamente na metade, ou seja, 50% do volume total das nanoestruturas da fase dispersa encontra-se abaixo do valor de  $d_{50}$  e 50% encontra-se acima dele.

#### **4.4.4.2 Determinação do tamanho da partícula por espectroscopia de correlação de fótons.**

O diâmetro cumulante médio (*Z-average*) e o índice de polidispersão (PDI), resultantes da aplicação do método dos cumulantes, foram medidos num ângulo de detecção de 173° (25°C), por análise de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer® NanoZS modelo ZEN 3600, Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C. As nanocápsulas em suspensão foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultrapura e filtrada através de membrana 0,45 µm e analisadas através de média de 3 repetições.

#### **4.4.4.3 Análise de rastreamento de nanopartículas**

A determinação do diâmetro por rastreamento do movimento das partículas (NTA) foi realizada empregando-se o equipamento NanoSight LM10, equipado com câmara porta-amostra acoplada a laser de 640 nm. As formulações foram diluídas em água ultrapura 10.000 vezes (v:v). A amostra diluída foi inserida na câmara com auxílio de uma seringa de vidro e analisada. As imagens de vídeo do movimento browniano das partículas individuais são identificadas e rastreadas em tempo real

através de câmera CCD pelo Software Analytical 2,0 NTA. O sistema de dimensionamento da partícula é baseado na dispersão de luz, onde o software identifica e rastreia todas as partículas visíveis e cada centro de espalhamento de luz são vistos como uma partícula individual durante as filmagens e então, relacionadas ao raio hidrodinâmico.

#### **4.4.4.4 Análise do pH e viscosidade**

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro (Denver<sup>®</sup> Instrument VB-10, Nova Iorque) previamente calibrado com padrões pH 4,0 e 7,0 diretamente nas suspensões coloidais. Os resultados representam a média de três determinações.

#### **4.4.4.5 Potencial zeta**

O potencial zeta foi determinado após diluição das nanocápsulas de 500 vezes em solução de NaCl 10mM.L<sup>-1</sup> previamente filtrada através de membrana 0,45 µm e as medidas foram efetuadas em triplicata analisando a amostra pela sua mobilidade eletroforética.

#### **4.4.4.6 Estabilidade físico-química**

Para estudar a estabilidade das formulações foram monitorados diâmetro, pH e teor total dos ativos presentes nas suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 15 e 30 dias. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e do calor.

As formulações também foram avaliadas através do método de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan Lab, Formulation Co. França). Nesse equipamento, a amostra (20 mL) foi submetida à verificação por um feixe de luz na região do infravermelho (850 nm) a 25°C por 1 hora. A aquisição dos dados foi repetida a cada 5 minutos, totalizando 13 varreduras. Dois sensores ópticos detectam a luz

transmitida através da amostra e a luz retroespalhada pela amostra<sup>30</sup>. O perfil obtido durante a análise para detectar fenômenos de migração de nanoestruturas e a tendência de desestabilização do sistema se baseia na variação nos sinais obtidos a partir da luz retroespalhada ou transmitida.

#### **4.4.4.7 Avaliação morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).**

A morfologia das amostras foram analisadas em MET JEOL operacional no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS em 120 kV. As suspensões foram diluídas em água MilliQ® na proporção de 1:10 (v:v) e depositadas diretamente sobre os *grids* de carbono formando um filme. A solução de contraste negativa utilizada foi acetato de uranila 2%. Após 24h no dessecador as amostras foram analisadas.

#### **4.4.5 Doseamento dos ativos nas suspensões coloidais**

A quantificação do limoneno e da chalcona foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV, Perkin Elmer®) e o doseamento dos derivados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS Agilent modelo 6890).

##### **4.4.5.1 Doseamento do limoneno nas suspensões coloidais (taxa de recuperação)<sup>31</sup>.**

As suspensões coloidais foram tratadas com acetonitrila para ocasionar a dissolução parcial do polímero, liberação e dissolução do ativo contido no interior das nanocápsulas. A quantificação do limoneno foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV, Perkin Elmer®) por uma metodologia desenvolvida nessa tese.

A validação analítica foi, então, realizada por cromatografia de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, equipado com detector ultravioleta a 213 nm. O sistema consiste numa coluna de aço inoxidável LiChrosorb 100 RP-18 (5 µm, 250x 4 mm), uma pré-coluna com fase estacionária LiChrosorb RP-18 (5 µm). A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetonitrila:água (90:10 v/v) e o fluxo utilizado foi de 0,7 mL/min. O doseamento das formulações foi realizado em triplicata.

O método foi validado segundo Harmonization of Technical Requirements of Registratio of Pharmaceutical for Humane Use<sup>32</sup> e Resolução n<sup>o</sup> 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>33</sup>. A metodologia foi validada em termos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

A curva de calibração foi preparada por análise, em CLAE, a partir de soluções de concentrações crescentes dos compostos em acetonitrila. A solução-mãe foi preparada a partir de 125 mg de ativo diluídos em 25 mL de acetonitrila. A partir da solução-mãe foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 5 a 75 µg/mL.

#### **4.4.5.2 Doseamento da chalcona nas suspensões coloidais (taxa de recuperação)<sup>31</sup>.**

O doseamento da CH8 nas formulações foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após dissolução das nanocápsulas em acetonitrila e subsequente filtração (0,45 µm). O sistema consistiu de uma bomba e um autoinjeter Perkin-Elmer® S200 Perkin-Elmer e uma coluna Merck® LiChrospher 100 RP-18. A quantificação de CH8 nanoencapsulada foi determinada, empregando-se uma fase móvel contendo acetonitrila:água (90:10 v/v), fluxo de 0,8 ml/min e detecção em 337 nm. O tempo de retenção do pico foi de cerca de 5 min. O doseamento das formulações foi realizado em triplicata.

O método foi validado segundo Harmonization of Technical Requirements of Registration of Pharmaceutical for Humane Use<sup>32</sup> e Resolução n<sup>o</sup> 899 da Agência



Nacional de Vigilância Sanitária<sup>33</sup>. A metodologia validada envolveu fatores como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação.

#### **4.4.5.3 Doseamento dos derivados de limoneno nas suspensões coloidais (taxa de recuperação)<sup>31</sup>.**

As suspensões coloidais foram tratadas com metanol em banho de gelo para a precipitação do polímero. Na sequência, esse material num ependorf foi levado ao vórtex por 2 minutos e centrifugado por 15 minutos à 10.000 rpm para a separação efetiva do polímero com os demais constituintes da formulação. Utilizou-se o eugenol como padrão interno na concentração de 2,5 µg/mL.

A quantificação dos LaSOMs nanoencapsulados foi efetuada em cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS) Agilent e a aquisição dos dados foi feita através do software Agilent MSD Chem Station. No cromatógrafo empregou-se um injetor tipo splitless e uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária quimicamente ligada de poli (5% de difenil e 95% dimetilsiloxano) com 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme.

Inicialmente desenvolveram-se análises de varredura (modo *scan*) para identificação, avaliação da amostra na sua totalidade, e determinação do íon que apresentasse alta ou maior intensidade (íon base) para cada composto de interesse. Para isso, diversas programações de temperatura foram testadas a fim de obter a melhor resolução possível na análise. Para as determinações, amostras foram acondicionadas em vial e inseridas no equipamento com o injetor automático Agilent modelo 7683. A rampa de aquecimento do forno do cromatógrafo foi de 90 a 250<sup>o</sup>C, iniciou em 90<sup>o</sup>C permanecendo nessa temperatura por 1 minuto, seguida da taxa de aquecimento de 10<sup>o</sup>C/min e permanência de 10 minutos. O volume de injeção da amostra foi de 1 µl com fluxo de gás hélio de 1 ml/min.

O doseamento do LaSOM 08 e LaSOM 28 nesse equipamento foi desenvolvido no modo SIM (selected ion monitoring) utilizando um detector seletivo

de massas nas mesmas condições cromatográficas já citadas. A análise no modo SIM propicia maior seletividade e sensibilidade do sistema GC-MS, dessa forma, foram monitorados os íons 164, 172 e 138 (m/z) característicos do eugenol, LaSOM 08 e LaSOM 28, respectivamente.

As curvas de calibração foram feitas utilizando os compostos isoladas e o padrão interno. Determinou-se assim, o fator de resposta para os produtos em função do padrão interno. A análise quantitativa foi baseada nas correlações entre as áreas do padrão interno e dos LaSOMs.

#### 4.4.5.4 Determinação das taxas de associação<sup>31</sup>

A concentração de ativo associado às nanocápsulas foi desenvolvida por CLAE, levando em consideração a diferença entre a concentração total de limoneno na suspensão coloidal e a concentração presente na fase aquosa da suspensão. A determinação do ativo livre, presente na fase aquosa da suspensão, foi determinada através do método de ultrafiltração-centrifugação das suspensões. Para isso fez-se uso de membranas Microcon<sup>®</sup>, Millipore 10.000 Da, durante 15 minutos a 5000 rpm, obtendo-se 40µl de ultrafiltrado, no qual o ativo foi quantificado de acordo com o método analítico já descrito.

Assim, o teor de fármaco é a concentração total do mesmo na formulação. Uma vez que a quantidade experimental de ativo e a concentração de fármaco dissolvido na fase contínua foram determinadas, a eficiência de encapsulamento (EE) pode ser calculada usando a equação abaixo:

$$\% EE = \frac{C_t - C_f}{C_t} \times 100 \quad \text{Eq (2)}$$

Onde:

C<sub>t</sub> é a concentração total do fármaco na formulação e C<sub>f</sub> é a concentração do fármaco dissolvido em a fase contínua.

#### **4.4.6 Preparação das bases semissólidas contendo nanocápsulas**

Para a incorporação dos hidrogéis, utilizou-se 20 ml de formulação de nanocápsulas desenvolvidas de acordo com o método descrito acima (item 4.4.3), adicionou-as em 0,100 g de carbômero (Carbopol® Ultrez, lote 0100E48898). Após homogeneização, o pH foi ajustado a 6,5 com trietanolamina. O hidrogel formado foi mantido sob agitação manual por 1 min e acondicionado em frascos protegidos da luz. Para fins de comparação, preparou-se um hidrogel contendo 20 ml de água destilada e 0,100 g de carbômero (Carbopol® Ultrez, lote 0100E48898), preparado de acordo com método descrito acima.

#### **4.4.7 Caracterização dos hidrogéis contendo nanocápsulas**

As bases semissólidas foram caracterizadas quanto ao pH, diâmetro médio das nanoestruturas e comportamento reológico.

##### **4.4.7.1 Determinação do diâmetro após a incorporação das suspensões de nanocápsulas nas bases semissólidas.**

A determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho das partículas contidas nos veículos sólidos foram avaliadas por difração de laser empregando o equipamento Malvern Mastersizer 2000®. As amostras foram diluídas em 10 mL de água ultrapura e as soluções adicionadas no dispositivo do equipamento contendo água destilada como a fase dispersante.

Além disso, a avaliação do diâmetro e da polidispersão dessas amostras foram realizadas através do espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® NanoZS). As amostras dos hidrogéis foram diluídas 500 vezes (m:v) em água ultrapura previamente filtrada através da membrana 0,45 µm. As soluções obtidas foram filtradas em membrana 1,2 µm para eliminar partículas com diâmetro superior que poderiam interferir na análise. Amostra de HG foi tratada conforme descrito anteriormente e submetidas à análise de diâmetro para determinar se as formulações não interferem nas medidas de diâmetro. Os resultados foram obtidos através da média de três repetições.

#### 4.4.7.2 Determinações de pH

Para determinar o pH, os hidrogéis foram diluídos a 10% (m/v) em água ultrapura obtendo-se soluções. As medidas de pH foram desenvolvidas em potenciômetro calibrado com soluções-tampão 4,0 e 7,0. As determinações foram obtidas em triplicata.

#### 4.4.7.3 Análise reológica das bases semissólidas contendo as suspensões de nanocápsulas.

Esses parâmetros foram determinados em viscosímetro rotacional Brookfield LVDV-II+ Pro, empregando *spindle* SC4-25 e adaptador SSA. Para as avaliações as amostras foram acondicionadas em dispositivo Brookfield acoplado ao banho de água termostaticado circulante a 24,9 °C.

As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas respeitando os valores de limite de torque (entre 10 e 100%). Sessenta segundos após ajustar a velocidade de rotação foram efetuadas as leituras da viscosidade, tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento. Os valores foram obtidos pelo software do equipamento (Rheocalc®) e gráficos construídos com a representação gráfica da taxa de cisalhamento em função da tensão de cisalhamento. A análise foi realizada a 24,9 ± 3 °C. Reogramas foram analisados para o melhor ajuste usando modelos de Bingham, Casson e Ostwald (tabela 5), a fim de determinar o comportamento reológico, índices de consistência e plasticidade do formulações.

**Tabela 2:** Diferentes modelos matemáticos que descrevem fluidos não newtonianos<sup>34</sup>.

<b>Modelo</b>	<b>Equação</b>	<b>Comportamento</b>
<b>Bingham</b>	$\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma}$	Fluxo plástico perfeito
<b>Casson</b>	$\tau^{0,5} = \tau_0^{0,5} + \eta^{0,5} \dot{\gamma}^{0,5}$	Fluxo plástico
<b>Ostwald</b>	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	Fluxo pseudoplástico ( $n < 1$ )
<b>Herschel-Bulkley</b>	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$	Fluxo pseudoplástico Com valor de cedência

onde  $\tau$  é a tensão de cisalhamento,  $\tau_0$  o limite de elasticidade aparente,  $\eta$  a viscosidade,  $n$  o índice de fluxo,  $k$  o índice de consistência e  $\dot{\gamma}$  a velocidade de cisalhamento.

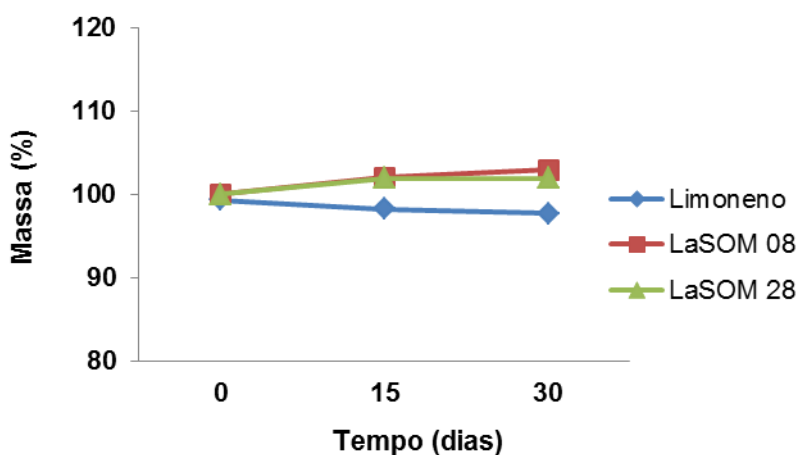


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Etapa de pré-formulação

#### 5.1.1 Teste de inchamento do polímero

O teste de inchamento do polímero foi desenvolvido com uma metodologia simples e confiável para avaliar a adequação das matérias-primas (polímeros e óleos) na obtenção de suspensão de nanocápsulas. Ou seja, se os polímeros poli( $\epsilon$ -caprolactona) e Eudragit<sup>®</sup> RS 100 selecionados para as formulações de nanocápsulas seriam afetados pelos constituintes do núcleo da nanocápsula. A determinação do teste de inchamento do polímero com os componentes lipídicos do núcleo da formulação foi proposta por GUTERRES em 2000<sup>35</sup>. Como se pode observar no gráfico abaixo, a variação do peso do polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) em contato com os compostos variou muito pouco, menos de 5%, confirmando assim a viabilidade da sua utilização como revestimento sólido das nanocápsulas.

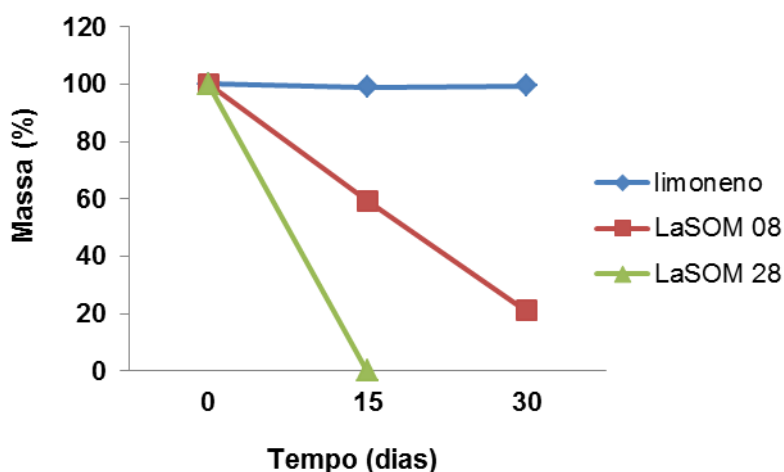


**Figura 26:** Modificações na massa do filme polimérico de poli( $\epsilon$ -caprolactona) após imersão no limoneno e seus derivados por 30 dias.

Nos primeiros dias de estudo, os filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) imersos com LaSOM 08 e LaSOM 28 sofreram um pequeno incremento (5,37%), porém não significativo (figura 35). Acredita-se que seja devido à quantidade residual de óleo aderido ao filme que não pôde ser totalmente retirado com papel absorvente. A partir de 15 dias, não houve variação na massa do filme polimérico indicando a

possibilidade de ser utilizado esse polímero para a formação da parede polimérica das nanocápsulas.

Contudo, com as análises desenvolvidas utilizando o polímero Eudragit® RS 100, puderam-se observar resultados muito diferentes. Na figura 36, está demonstrado que esse filme polimérico em 15 dias de imersão com o LaSOM 08 perdeu 41,43% da sua massa e se não bastasse isso, aos 30 dias de estudo existiam apenas 21,3% de filme polimérico imersos no óleo. Implicando que o polímero é afetado pelo LaSOM 08 ocorrendo uma dissolução do mesmo não sendo, portanto, indicado para a formulação dessa nanocápsula. Os dados que se referem a variação da massa do filme polimérico de Eudragit® RS 100 imersos no LaSOM 28, demonstrou que o polímero foi totalmente dissolvido em 15 dias inviabilizando seu uso como parede polimérica das nanocápsulas.



**Figura 27:** Modificações na massa do filme polimérico de Eudragit® RS 100 após imersão no limoneno e seus derivados por 30 dias.

Sabe-se que o Eudragit® RS 100 apresenta na sua estrutura química grupos funcionais como ésteres e amins terciárias, enquanto que os compostos sintetizados (LaSOMs) contém funções: álcoois e amins secundárias (alifáticas e aromáticas). Acredita-se que essa solubilização seja resultado de uma reação química de ésteres (Eudragit® RS 100) com amins secundárias (LaSOM 08 e 28) ocorrendo uma substituição nucleofílica no grupo acila. Normalmente a formação de amidas pela acilação de amins com ésteres ocorrem sob aquecimento por



algumas horas, porém esses materiais permaneceram a temperatura ambiente por vários dias o que pode ter sido uma reação mais lenta. Isso está de encontro com o resultado, visto que o filme polimérico imerso no óleo LaSOM 08 solubilizou mais lentamente quando comparado com o resultado obtido com a imersão em LaSOM 28. Lembra-se que anilina é considerada menos nucleofílica que as alquilaminas típicas e o deslocamento do par eletrônico do nitrogênio para o anel aromático justifica o motivo pelo qual as aminas aromáticas são bases mais fracas que as aminas alifáticas. Corroborando com isso, observa-se que o limoneno não modifica a massa do filme polimérico de EUDRAGIT® RS 100 em 30 dias de estudo e também, lembramos que ele não apresenta grupos aminado na sua estrutura.

## **5.2 Validação do método de quantificação por CLAE**

A necessidade de demonstrar a qualidade do doseamento de compostos está cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem gerar resultados errôneos e prejuízos irreparáveis, sejam eles financeiros ou biológicos. Para garantir que o novo método analítico gere informações interpretáveis e confiáveis da amostra, deve-se proceder o processo de validação. Validação tem por objetivo demonstrar que o método analítico desenvolvido pode ser aplicado para a finalidade pretendida. A quantificação do limoneno foi realizada por CLAE-UV.

O método analítico validado para o composto **1** foi considerado linear na faixa de 5 a 75 µg/mL ( $r=0,9992$ ). Um método analítico linear indica que o aumento da concentração do analito é diretamente proporcional com os resultados obtidos experimentalmente dentro de um intervalo definido<sup>33</sup>. O método se mostrou específico (uma vez que não foram observados picos no mesmo tempo de retenção no cromatograma da nanocápsula branca).

A precisão intra-dia demonstra a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo analista e mesma instrumentação em um curto espaço de tempo, já a precisão inter-dia avalia a concordância dos resultados obtidos em dias diferentes. As análises de exatidão indica a proximidade dos resultados obtidos em comparação com o verdadeiro. Análises de precisão e exatidão demonstraram desvio padrão

relativo abaixo de 2% e o percentual de recuperação variou entre  $97,4 \pm 1,34$  a  $103,7 \pm 0,22$ .

O resultado do doseamento de teor de limoneno nas formulações, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, correspondeu a  $0,488 \pm 0,7$  mg/mL, demonstrando que houve uma retenção significativa do limoneno na nanoestrutura, passando de 2 para 20%, com a adição do sândalo e almíscar, A seguir serão discutidos os possíveis fatores que influenciaram nesse resultado.

### **5.3 Validação do método de quantificação por CG-MS**

A cromatografia gasosa foi a primeira técnica a ser interfaceada com o detector de massas, visto a facilidade do manuseio do efluente gasoso no cromatógrafo. É uma ferramenta muito útil na identificação de compostos de origem vegetal graças à disponibilidade de bibliotecas espectrais, com detector de massas operando sob condições de impacto. A quantificação é possível com o uso de padrão interno, que compensa a variação na resposta instrumental de elétrons. No desenvolvimento desses doseamentos, fez-se uso do eugenol como padrão interno (PI). O método de padronização interna consiste na preparação das soluções-padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona uma quantidade pré-determinada e constante de um composto conhecido. Esse terpeno foi selecionado, visto que não apresentou sobreposição de picos no espectro e nem influência na detecção ou separação dos compostos de interesse. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra.<sup>46,47</sup>

A faixa linear desenvolvida nesse método analítico foi de 1 a 30  $\mu\text{g/mL}$  contendo 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de eugenol em cada ponto. Após análises dessas soluções construiu-se curvas de calibração relacionando a razão das áreas (áreas das concentrações variadas dos LaSOMs/ áreas do PI em concentração constante). Através desse cálculo matemático, obteve-se no cromatograma a concentração da substância nas amostras. Porém, observou-se que além do teor, importantes

parâmetros analíticos como exatidão e precisão apresentaram resultados incoerentes com os dados obtidos até o momento. Então, as fontes de erro foram investigadas e concluiu-se que estava havendo efeito da matriz durante as análises dos LaSOMs. Esse efeito é também chamado de “aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz”, foi utilizada em diversos trabalhos para explicar os resultados errôneos de taxas de recuperação, precisão e exatidão<sup>48,49</sup>. Dessa forma, optou-se por construir a curva-padrão utilizando o método de superposição da matriz, que é uma das formas de minimizar esse efeito<sup>50</sup>. Esse método consiste na adição dos ativos a serem doseados em diferentes concentrações à uma matriz semelhante à da amostra, isenta da substância, a construção do gráfico relaciona as áreas obtidas com a padronização interna. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz interfere na pré-concentração, separação ou detecção da substância de interesse.

O efeito de matriz é mais pronunciado em análises de amostras complexas como nanoestruturas. Os problemas gerados pelos componentes endógenos da matriz nas respostas do detector não dependem apenas das características dos compostos, mas também das próprias condições cromatográficas, particularmente no injetor, na coluna cromatográfica e no detector do CG<sup>51</sup>.

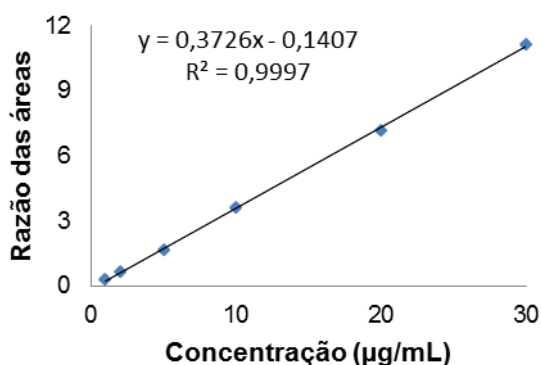
No injetor, a amostra é exposta a alta temperatura e com tempo de residência suficiente para que sítios ativos do insertor (*liner*) do injetor adsorvam ou induzam à degradação térmica de alguns analitos, antes de serem transferidos para a coluna<sup>51</sup>. Dessa forma quando são preparadas soluções-padrão em solvente puro e injetadas, elas podem ficar retidas nos sítios ativos do insertor e conseqüentemente a proporção de amostra que é transferida para a coluna e quantificada é menor. O aumento da temperatura no injetor pode reduzir esse efeito.

Segundo Poole, as conexões entre o injetor e a coluna e entre a coluna e o detector podem promover o efeito da matriz. Isso é observado após algumas semanas de uso do equipamento, em razão das sucessivas injeções e conseqüentemente da contaminação do sistema cromatográfico. Além disso, de forma geral, as colunas cromatográficas com maior diâmetro interno apresentam resultados discutíveis em relação às de menor diâmetro<sup>52</sup>.

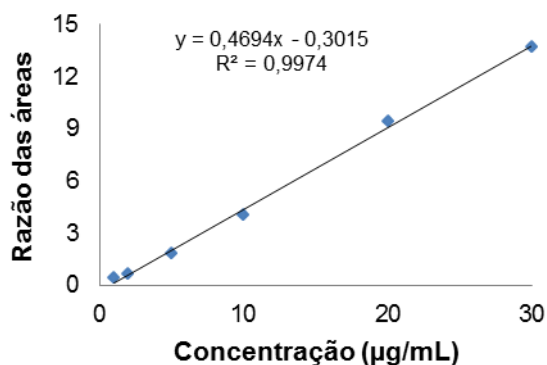
A figura 37 mostra as curvas-padrões para quantificação do LaSOM 08 e LaSOM 28 a partir de nanocápsulas poliméricas. As curvas de calibração apresentaram os coeficientes de correlação superiores a 0,99, que é o valor mínimo preconizado pelos códigos oficiais<sup>32,33</sup>. Foi verificado através da construção das curvas de calibração que os valores de LD e LQ encontrados para os compostos permaneceram em torno de foram respectivamente 0,2 e 0,7 µg/mL.

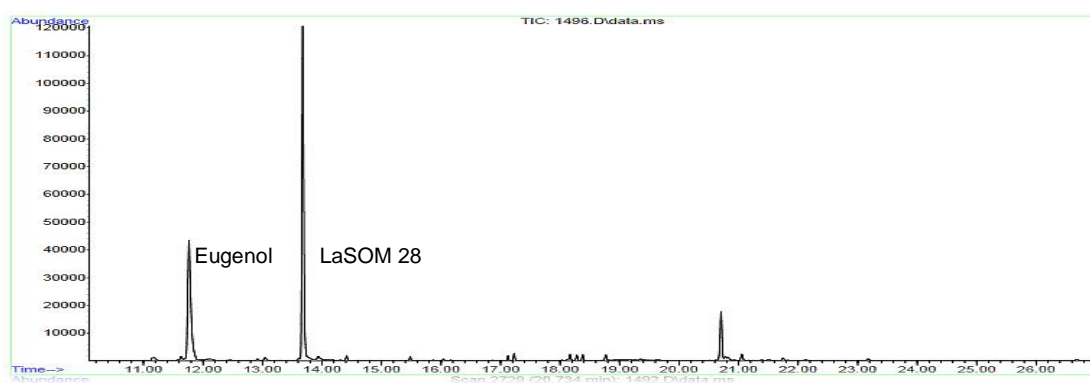
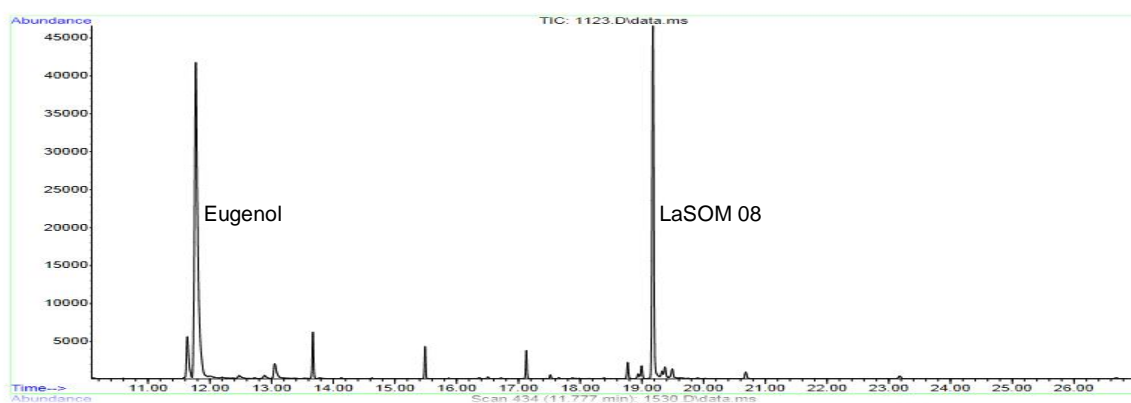
Pode-se observar também nessa figura, os cromatogramas dos perfis do padrão interno e dos analitos demonstrando seletividade da análise, ou seja, não houve interferência de espécies garantindo que o pico de resposta tenha sido exclusivamente dos compostos de interesse. Se a seletividade não fosse assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas. O eugenol, como padrão interno, não reagiu com as substâncias ou outro componente da matriz, não faz parte da amostra e, quando cromatografado, ficou separado de todas as demais substâncias presentes na amostra, características essas, necessárias para determinar um bom padrão interno.

A)



B)





**Figura 28:** a) Curvas-padrões para a quantificação de derivados de limoneno em nanocápsulas poliméricas. A) LaSOM 08; B) LaSOM 28. b) Cromatogramas com os perfis dos picos durante a validação.

A precisão do método foi determinada à nível de precisão intermediária e repetibilidade (tabela 6). As variações dos DPR das análises com LaSOM 08 e LaSOM 28 foram menores que 2% em todos os dias de experimento, sendo inferior ao limite máximo de 5% estabelecido pelos códigos oficiais<sup>32,33</sup>.

**Tabela 3:** Avaliação das precisões inter e intra-dia do método analítico para o doseamento dos derivados de limoneno em nanocápsulas. concentração teórica de 10 µg/ml.

Precisão	LaSOM 08		LaSOM 28	
	Conc. Exp. (µg/mL)	DPR (%)	Conc. Exp. (µg/mL)	DPR (%)
Intra-dia (n=6)	9,73 ± 0,04	0,5	102 ± 0,05	1,22
Inter-dia Dia 1 (n=3)	9,93 ± 0,01	0,3	102 ± 0,01	0,35
Dia 2 (n=3)	10,28 ± 0,3	0,7	98 ± 0,03	0,33

No que diz respeito à exatidão (tabela 7), o método permitiu a recuperação de limoneno entre 97 e 101 % demonstrando um método exato, segundo os preceitos da ICH. O teor encontrado de LaSOM 08 na nanocápsulas polimérica foi de 100,2 %, enquanto que teor de LaSOM 28 encontrado foi de 98,9 %.

**Tabela 4:** Avaliação da exatidão do método analítico para o doseamento dos derivados de limoneno em nanocápsulas.

Conc. Teórica (µg/mL)	LaSOM 08		LaSOM 28	
	Conc. Exp. (µg/mL)	Exatidão (%)	Conc. Exp. (µg/mL)	Exatidão (%)
2	1,9 ± 0,3	95,0	2,03 ± 0,8	101,2
10	9,9 ± 0,2	99,3	9,81 ± 0,3	98,2
30	30,3 ± 0,4	101,1	29,18 ± 0,4	97,3

#### 5.4 Estratégias para encapsulação de limoneno

O método analítico em CLAE com o limoneno demonstrou que estava havendo uma grande perda do ativo durante a preparação, possivelmente por arraste de vapor no momento da evaporação do solvente. Visto isso, foram desenvolvidas suspensões de nanocápsulas com dois diferentes solventes orgânicos, acetona e associação da mesma com álcool etílico absoluto, para avaliar uma possível diferença de arraste do terpeno. Observou-se que quando utilizou-se acetona a perda do terpeno foi maior quando comparado a associação, isso pode ser devido a diferença de polaridade dos solventes orgânicos, ou seja, a interação entre o limoneno e a acetona é maior do que com o etanol. Por isso que a acetona é o principal solvente utilizado na extração de óleos vegetais por destilação.

Paralelamente, buscou-se soluções para o problema em questão com a possibilidade de utilizar âncoras moleculares como o almíscar e sândalo (fixadores de perfume) com o objetivo de reter o limoneno no interior das nanocápsulas. Baseado nisso, desenvolveu-se nanocápsulas com adição desses compostos (almíscar e sândalo), concomitantemente ou não. O resultado foi muito importante, obtendo-se um aumento na retenção do terpeno na nanoestrutura de 2 % para aproximadamente 20 %, ou seja, com essa estratégia aumentou-se em 10 vezes a concentração de limoneno na nanocápsula.

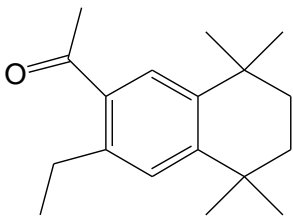
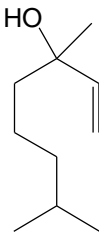
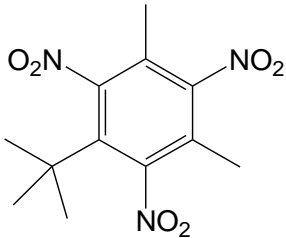
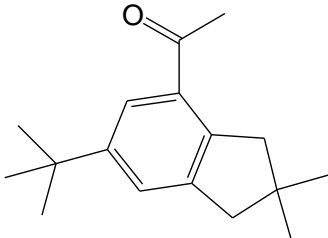
Para investigar como esses compostos diminuem a taxa de evaporação do limoneno, desenvolveu-se análises em cromatografia gasosa. Essas análises têm por objetivo identificar os constituintes das âncoras moleculares e, além disso, se houvesse uma possível interação covalente entre eles poderíamos observar a presença de complexos estáveis.

A identificação dos constituintes das âncoras moleculares demonstrou que os compostos mais abundantes demonstrados na tabela 15 são: etanonas também denominados Musk (6,7-dietil-1,2,3,4-tetrahidro-1,1,4,4-tetrametil naftaleno) etanona, 2,4,6-trinitro-5-tertbutil xileno), cariofilenos e linalool.

Esses compostos apresentam na sua estrutura grupos doadores ou receptores de prótons que podem estar interagindo entre si e reduzindo a

volatilização do limoneno. Na tabela abaixo, observa-se os compostos e suas características estruturais.

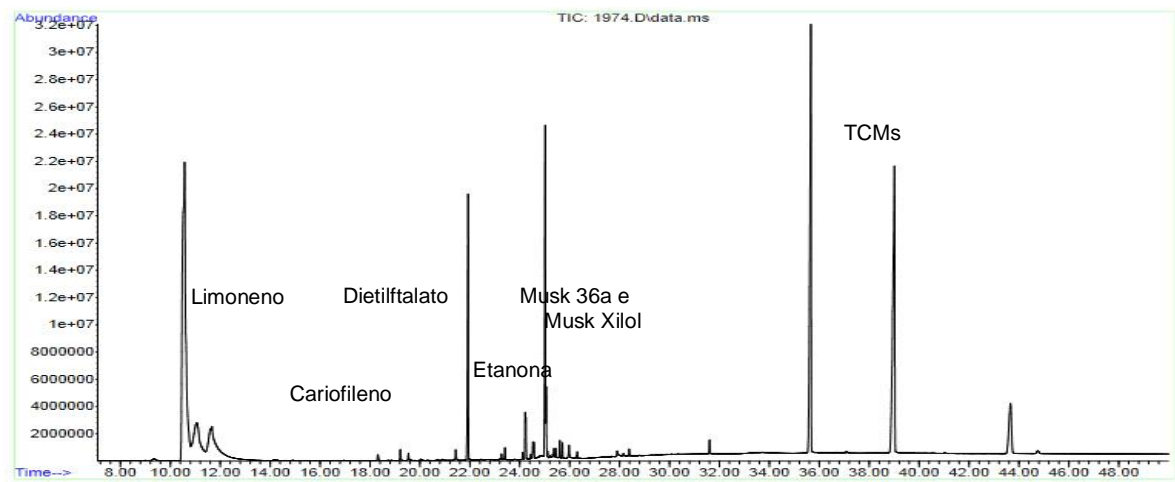
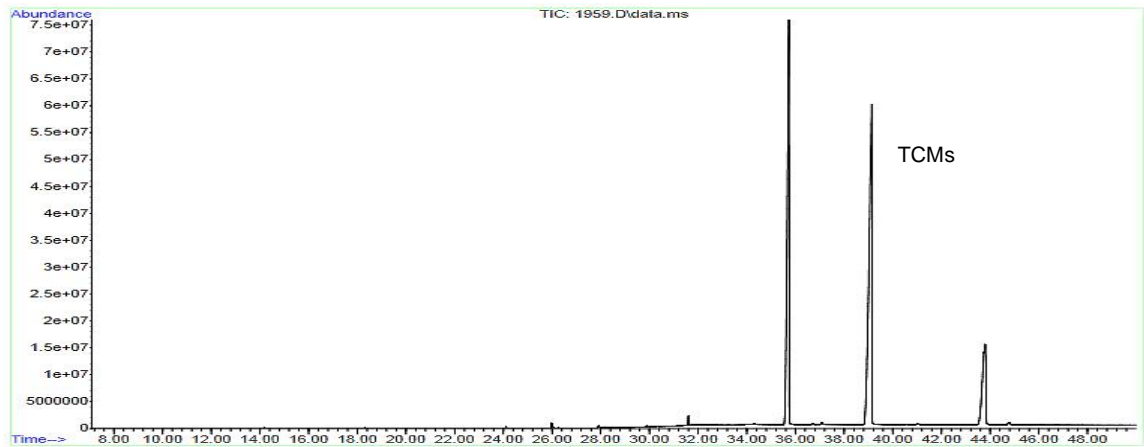
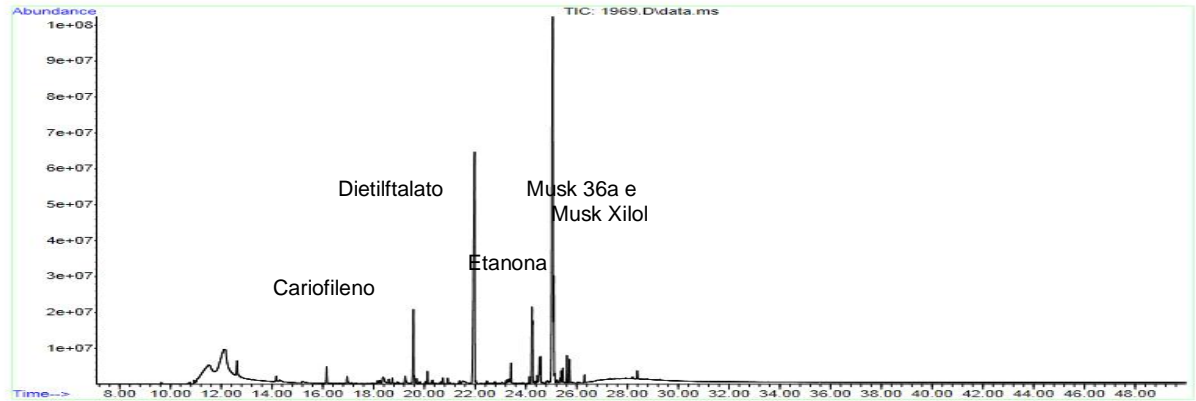
**Tabela 5:** Compostos majoritários presentes nos “fixadores de perfume”.

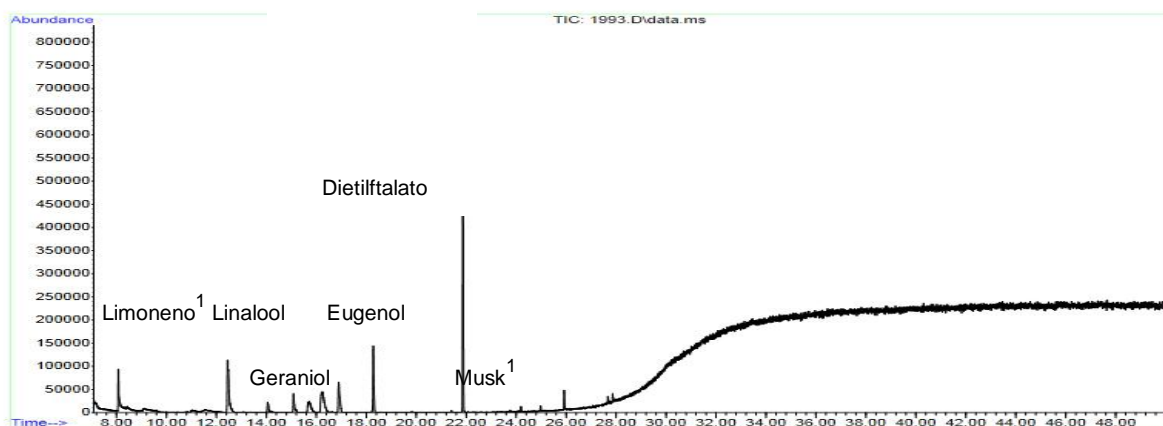
Nome	Estrutura	Nome	estrutura
<b>Musk 36</b>		<b>Linalool</b>	
<b>Musk Xilol</b>		<b>Cariofileno</b>	

Observou-se nos resultados dos cromatógrafos a ausência de complexos, indicando que uma interação covalente é pouco provável, mas isso não exclui a possibilidade de haver uma interação não covalente, ou seja, interação física ou pontes de hidrogênio formando um complexo entre eles. A figura 15 representa as análises qualitativas com os cromatógrafos dos fixadores do limoneno, almíscar e sândalo, destacam-se os principais constituintes desses compostos: cariofileno, etanonas (musks), também foi observado nesses cromatogramas dietilftalato (plastificante), um frequente contaminante presente nos septos dos vials (figura 38). O cromatograma da LNC-Blank demonstrou a presença de TCMs (triglicerídios de ácido caprílico, triglicerídeo monocaprílico e triglicerídeos de ácido cáprico). Cromatogramas da LNCLim confirmaram a presença de limoneno, cariofileno, etanonas (musks) e TCMs como constituintes majoritários. Análises do líquido recolhido no balão coletor do evaporador rotatório durante a preparação da suspensão de nanocápsulas demonstrou a presença de linalool, geraniol, além de musk e limoneno em pequenas concentrações. Pode-se observar eugenol que é um



contaminante do sistema, mesmo ele sendo limpo incansavelmente e dietilftalato presente nos septos dos vials.





¹limoneno e musk em pequenas concentrações.

**Figura 29:** Cromatogramas gasosos dos componentes da formulação

## 5.5 Desenvolvimento das nanocápsulas

A técnica de nanoprecipitação do polímero pré-formado não requer a formação anterior de uma emulsão para obter uma dispersão de partículas coloidais na fase aquosa. Ela se baseia na emulsificação espontânea de uma solução de polímero em um solvente semi-polar como acetona. Essa solução é adicionada, sob agitação moderada em um meio aquoso contendo um estabilizante e as partículas são formadas instantaneamente por rápida difusão do solvente na água. O método utilizado nesse trabalho para o desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas está baseado na proposição de JÄGER em 2009<sup>28</sup>.

As nanocápsulas de núcleo lipídico com fração volumétrica simples que contêm os compostos: limoneno (LaSOM 11), chalcona (CH8) e co-encapsulados limoneno+chalcona foram cognominadas a partir desse momento como LNC-Lim, LNC-CH8 e LNC-LICH respectivamente, sendo que a sigla das formulações que contêm CH8 são seguidas de um valor representante da concentração de CH8 em µg/mL, a concentração de limoneno é mantida em todas as formulações. A nanocápsula de núcleo lipídico sem qualquer um dos ativos foi cognominada LNC-blank. As suspensões de nanocápsulas formadas com fração volumétrica dobrada sem ativos, contendo limoneno, LaSOM 08, LaSOM 28, chalcona (CH8) e co-encapsulados limoneno+chalcona e LaSOM 08+chalcona foram denominadas de LNC-Blank<sub>2x</sub>, LNC-Lim<sub>2x</sub>, LNC-L08<sub>2x</sub>, LNC-L28<sub>2x</sub>, LNC-CH8<sub>2x</sub>, LNC-LICH<sub>2x</sub>, LNC-L08CH<sub>2x</sub>.

## **5.6 Caracterização das suspensões de nanocápsulas**

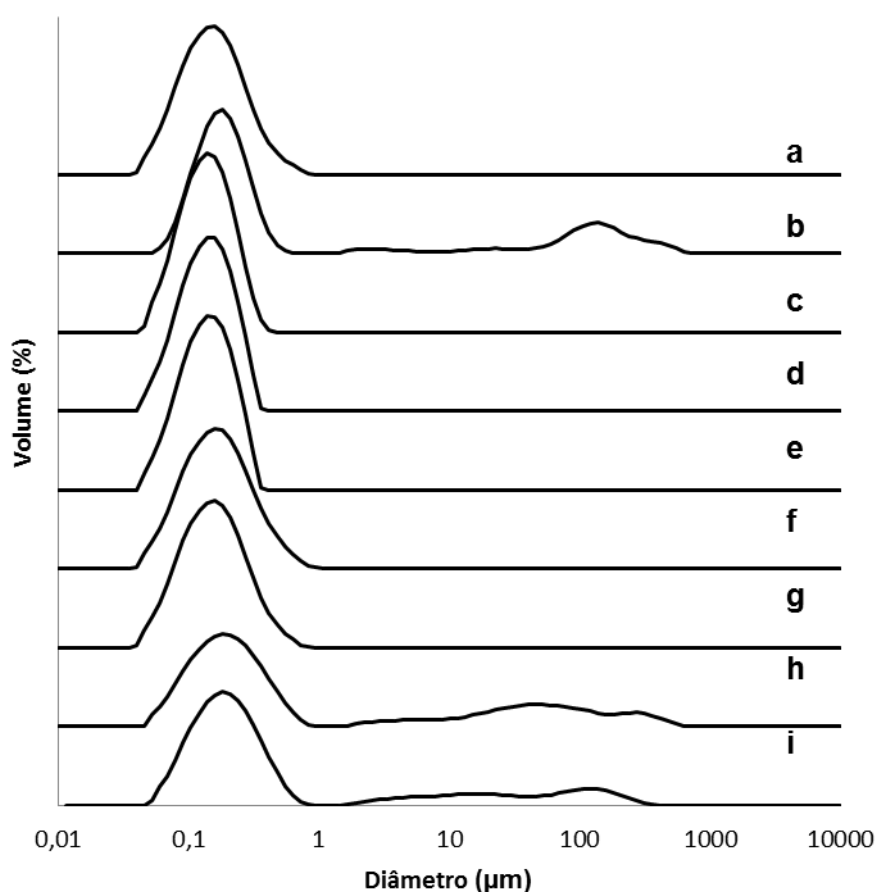
Sob análise macroscópica, após a preparação, as suspensões de nanocápsulas resultaram em formulações com aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente. As suspensões apresentaram reflexo azulado, resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão. O aspecto visual das suspensões de nanocápsulas foi semelhante ao descrito na literatura para diferentes sistemas de nanocápsulas preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado<sup>36,37</sup>.

Inicialmente serão discutidos os resultados das nanocápsulas contendo limoneno e CH8, posteriormente discutir-se-ão os resultados das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas com os derivados do limoneno.

### **5.6.1 Suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo limoneno, ou CH8, ou limoneno e CH8.**

#### **5.6.1.1 Distribuição de tamanho de partícula**

Nos estudos de caracterização das nanoestruturas, análises feitas por difratometria de laser demonstraram que as formulações contendo limoneno e limoneno+CH8 até a concentração de 0,3 mg/mL apresentaram distribuição de tamanho monomodal e nanométrica nos três lotes, sem a presença simultânea de micropartículas. Esses resultados indicam que as nanocápsulas apresentam-se homogêneas quanto à distribuição do tamanho, assim como observado pelo baixo valor de *Span* (figura 39).



**Figura 30:** Distribuição do tamanho de partícula das formulações. A) LNC-LIM, B) LNC-CH<sub>500</sub>, C) LNC-LICH<sub>50</sub>, D) LNC-LICH<sub>75</sub>, E) LNC-LICH<sub>100</sub>, F) LNC-LICH<sub>150</sub>, G) LNC-LICH<sub>300</sub>, H) LNC-LICH<sub>400</sub>, E I) LNC-LICH<sub>500</sub>, por difração de laser (meio dispersante: água).

Porém havia necessidade de que a suspensão de nanocápsulas contendo CH8 contivesse no mínimo 0,5 mg/mL para apresentar aplicabilidade nos ensaios farmacológicos antileishmania. Suspensões de nanocápsulas contendo CH8 (0,5 mg/mL) foram desenvolvidas e observou-se um sistema com distribuição bimodal, micrométrico.

Visto que existia um grande interesse na co-encapsulação de limoneno e CH8, desenvolveram-se formulações co-encapsulando esses ativos em concentrações crescentes da chalcona (50-500 μg/mL) para avaliar a máxima concentração encapsulada com perfil de distribuição monomodal da LNC. Observou-se que em concentração acima de 0,3 mg/mL obtinha-se um sistema com

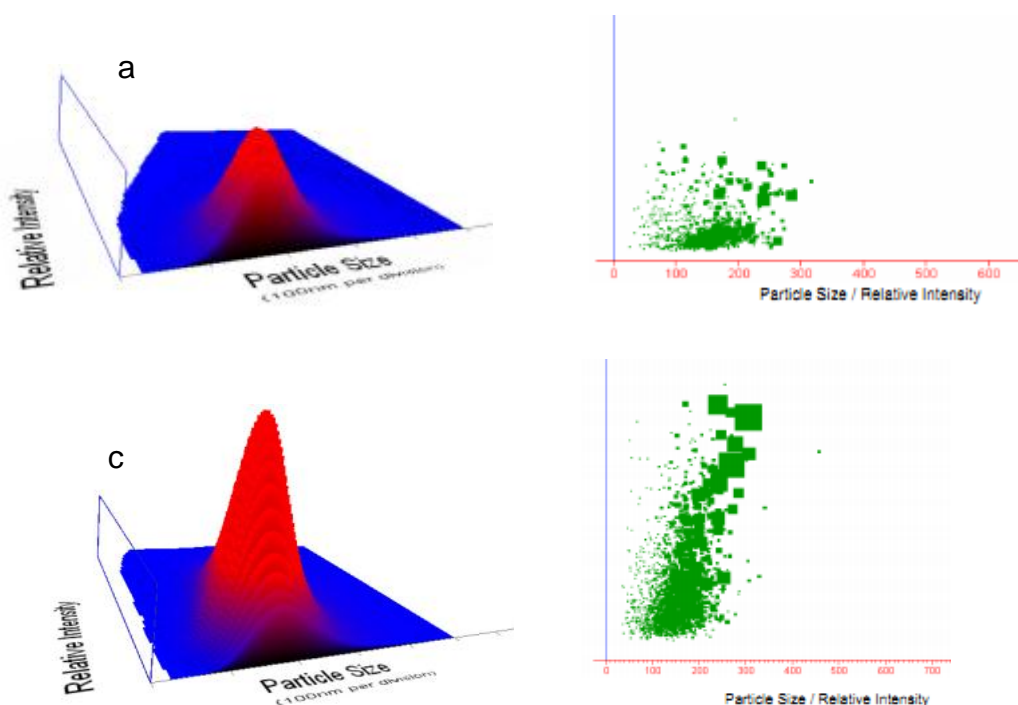
distribuição bimodal e micrométrico, ou seja, não foi possível obter uma formulação contendo CH8 ou CH8 co-encapsulada na concentração desejada. As análises por difratometria de laser está representada na figura 37, o índice de refração utilizado foi 1,59, referente ao poliestireno látex.

O diâmetro de esfera equivalente ( $d_{4.3}$ ) em percentual de volume das formulações variou de 0,139  $\mu\text{m}$  (LNC-LICH<sub>50</sub>) a 0,183  $\mu\text{m}$  (LNC-LICH<sub>150</sub>) e 27,35  $\mu\text{m}$  referente a LNC-LICH<sub>400</sub> e 21,2  $\mu\text{m}$  da LNC-CH<sub>500</sub>. Os diâmetros cumulativos em volume de 50 % da população total ( $d_{0.5}$ ) para todas as formulações mantiveram-se aproximadamente na mesma faixa de tamanho para as formulações contendo até 0,3 mg/mL de CH8, 0,257  $\mu\text{m}$  para a formulação contendo 0,4 mg/mL de CH8 e 0,215  $\mu\text{m}$  para a formulação LNC-LICH<sub>500</sub> e 0,199  $\mu\text{m}$  para LNC-CH<sub>500</sub>. Os valores de *Span* foram inferiores a 2,0 para as formulações com população nanométrica e para LNC-LICH<sub>400</sub>, LNC-LICH<sub>500</sub> e LNC-CH<sub>500</sub> 325,2, 215,5 e 378,3, respectivamente. Conforme demonstrado, observa-se o aumento do diâmetro da esfera equivalente com o aumento da quantidade de chalcona CH8 encapsulada (Tabela 9). O resultado de LNC-LICH<sub>500</sub> era esperado, visto que havíamos observado características bimodais na formulação LNC-CH<sub>500</sub>.

**Tabela 9:** Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser.

Formulação	$d_{4.3}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.9}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.5}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.1}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i> (adimensional)
LNC-Lim	0,166±0,006	0,294±0,0011	0,140±0,004	0,081±0,002	1,6±0,10
LNC-CH <sub>500</sub>	21,3±0,012	69,58±0,0017	0,199±0,006	0,101±0,006	378,3±0,20
LNC-LICH <sub>50</sub>	0,139±0,005	0,225±0,0010	0,127±0,006	0,069±0,002	1,2±0,12
LNC-LICH <sub>75</sub>	0,149±0,008	0,244±0,0020	0,139±0,004	0,072±0,003	1,2±0,11
LNC-LICH <sub>100</sub>	0,152±0,010	0,260±0,0009	0,132±0,005	0,067±0,004	1,4±0,09
LNC-LICH <sub>150</sub>	0,183±0,004	0,335±0,0015	0,152±0,004	0,072±0,002	1,7±0,10
LNC-LICH <sub>300</sub>	0,168 ±0,006	0,299±0,0008	0,142±0,003	0,069±0,003	1,6 ±0,18
LNC-LICH <sub>400</sub>	27,4 ±0,009	83,57±0,0011	0,257±0,005	0,091±0,001	325,2 ±0,12
LNC-LICH <sub>500</sub>	14,1±0,005	46,5±0,0012	0,215±0,006	0,091±0,005	215,5±0,14

A análise de rastreamento do movimento das partículas (NTA), obtida com o equipamento NanoSight®, foi utilizada para verificar se nanocristais de chalcona CH8 não-encapsulada estariam presentes nas formulações. Analisa-se a intensidade de luz espalhada, detectada ao longo dos vários *frames* captados pela câmera do equipamento. Observou-se uma variação com a presença de chalcona CH8, nas concentrações testadas. Na figura 38 está demonstrado LNC-LICH<sub>50</sub> e LNC-LiCH<sub>300</sub>. Observou-se o aumento da intensidade relativa sem aumentar significativamente o tamanho das partículas, à medida que aumenta a concentração de chalcona CH8. O aumento da intensidade relativa pode indicar presença de nanocristais e para complementar esse estudo, analisou-se as formulações em microscopia óptica de luz polarizada e num prazo de 10 dias e havia presença de cristais.

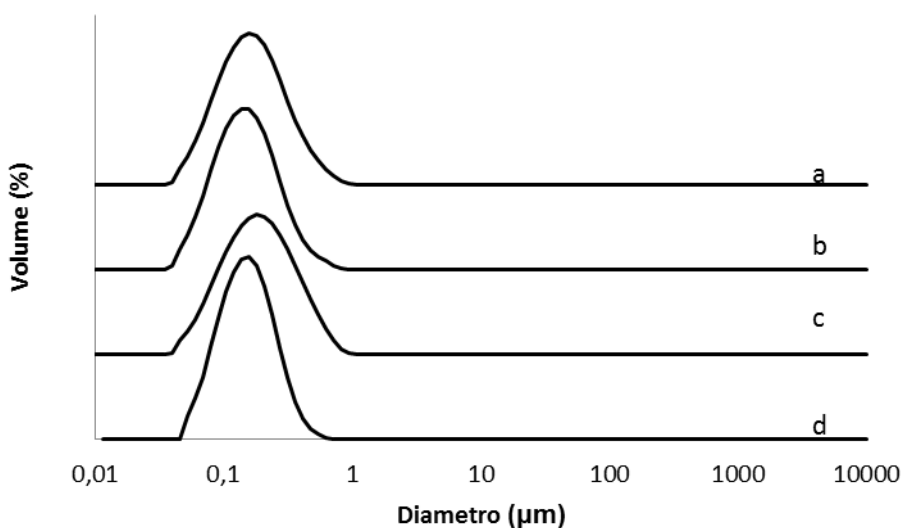


**Figura 31:** Intensidade de luz captada pela câmera ao longo de 60s em função do diâmetro de partícula, a partir da técnica de rastreamento do movimento das partículas (nanosight®), para as formulações (A) LNC-LICH<sub>50</sub>, (C) LNC-LICH<sub>300</sub>. No detalhe, é demonstrada a distribuição de diâmetro da partícula por intensidade relativa em 3d e em 2d.

Buscando melhorar a capacidade de encapsulação das suspensões de nanocápsulas, desenvolveram-se formulações contendo o dobro da fração

volumétrica. Visto que é possível aumentar a eficiência de encapsulação de fármacos com o aumento do número da densidade de partícula na formulação<sup>38</sup>. Há influência da agregação crítica dos materiais sobre o tamanho médio final de partícula e polidispersão de lípidos poliméricos de núcleo nanocápsulas. Essa é uma valiosa ferramenta na produção de formulações de núcleo lipídico de nanocápsulas com capacidades de carga diferentes destinados a terapêutica<sup>38</sup>.

Dessa forma, suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o dobro da fração volumétrica foram desenvolvidas e obtiveram-se resultados positivos no que diz respeito ao aumento da eficiência de encapsulação, mantendo a distribuição nanométrica e unimodal. No gráfico abaixo, observa-se as análises desenvolvidas por difração de laser das LNCs. Nota-se que as suspensões de nanocápsulas apresentam características nanométrica e unimodal com resultados reprodutíveis (figura 41).



**Figura 32:** Distribuição do tamanho de partícula das formulações. A) LNC-BLANK, B) LNC-LIM<sub>2X</sub>, C) LNC-CH8<sub>2X</sub> E D) LNC-LICH<sub>500</sub>, por difração de laser (meio dispersante: água).

O diâmetro de esfera equivalente ( $d_{4,3}$ ) em percentual de volume dessas formulações foi de 0,152 μm a 0,208 μm. Os diâmetros cumulativos em volume de 50 % da população total ( $d_{0,5}$ ) encontrado foram em torno de 0,150 μm e o valor de *Span* inferior a 2,0 em todas as amostras. Características essas, importantes para confirmar a obtenção de uma nanocápsula com distribuição monomodal (tabela 10).

**Tabela 10:** Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser

Formulação	$d_{4.3}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.9}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.5}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.1}$ ( $\mu\text{m}$ )	Span (adimensional)
LNC-Blank	0,152 $\pm$ 0,010	0,260 $\pm$ 0,0009	0,132 $\pm$ 0,005	0,067 $\pm$ 0,004	1,4 $\pm$ 0,1
LNC-Lim <sub>2x</sub>	0,168 $\pm$ 0,003	0,288 $\pm$ 0,0008	0,139 $\pm$ 0,001	0,070 $\pm$ 0,002	1,6 $\pm$ 0,1
LNC-CH8 <sub>2x</sub>	0,208 $\pm$ 0,003	0,393 $\pm$ 0,0007	0,173 $\pm$ 0,004	0,076 $\pm$ 0,002	1,83 $\pm$ 0,1
LNC-LICH <sub>500</sub>	0,157 $\pm$ 0,007	0,261 $\pm$ 0,006	0,140 $\pm$ 0,003	0,074 $\pm$ 0,003	1,3 $\pm$ 0,1

Essas formulações também foram avaliadas através de espalhamento de luz dinâmico. A análise da luz espalhada, aplicando-se o método dos cumulantes, resultou em valores de diâmetro (*Z-average*) na faixa de 170 nm com PDI menor que 0,12. (tabela 11).

**Tabela 11:** Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por espalhamento de luz dinâmico.

Formulação	PCS (método dos cumulantes)	
	$d_h$ ( <i>Z-average</i> ) (nm)	PDI (adimensional)
LNC-blank	154 $\pm$ 09	0,12 $\pm$ 0,01
LNC-Lim <sub>2x</sub>	175 $\pm$ 08	0,10 $\pm$ 0,01
LNC-CH8 <sub>2x</sub>	230 $\pm$ 10	0,10 $\pm$ 0,04
LNC-LICH <sub>500</sub>	174 $\pm$ 03	0,13 $\pm$ 0,02

As formulações também foram analisadas quanto a outras características físico-químicas como pH, viscosidade, potencial  $\zeta$ , teor e taxa de associação. Os valores de pH em torno de 5,5 foram condizentes com o método de preparação e matérias-primas utilizadas no estudo (tabela 12). Esses dados estão de acordo com valores previamente reportados, quando desenvolveram-se nanocápsulas preparadas com poliésteres pelo método de nanoprecipitação<sup>15</sup>. A viscosidade das



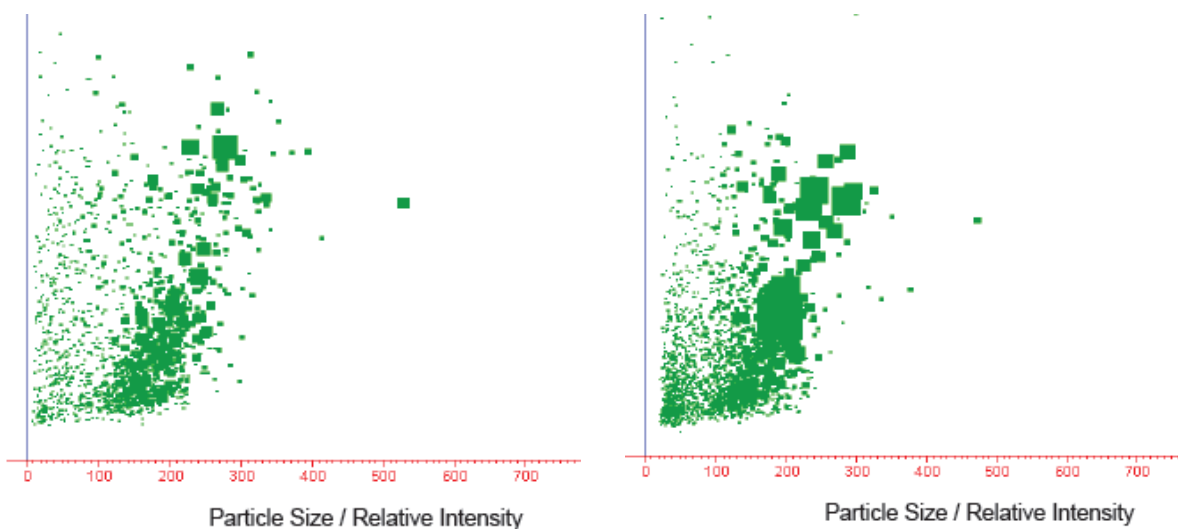
suspensões apresentou um valor próximo a viscosidade da água pura, esse resultado está de acordo com estudos anteriores sobre suspensões aquosas de nanocápsulas poliméricas<sup>39</sup>

As análises do Potencial  $\zeta$  refletem o potencial de superfície das partículas, os valores obtidos foram cerca de -8,5 mV. Esses valores próximo a zero são adequados evitar a agregação das gotículas já que são revestidas com tensoativo não-iônico, como o polissorbato 80 através do mecanismo de impedimento estérico<sup>28</sup>.

**Tabela 12:** Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após a preparação (n = 3).

Formulação	<i>pH</i>	<i>Viscosidade (mPas)</i>	<i>Potencial <math>\zeta</math> (mV)</i>	<i>Teor (mg/mL)</i>	<i>Taxa de associação (%)</i>
<b>LNC-blank</b>	5,51 ± 0,12	1,01 ± 0,013	-8,13 ± 0,09	-	-
<b>LNC-Lim<sub>2x</sub></b>	5,83 ± 2,1	0,98 ± 0,01	-8,45 ± 0,11	0,488 ± 0,7	98,90
<b>LNC-CH8<sub>2x</sub></b>	5,98 ± 2,0	1,01 ± 0,02	-8,54 ± 0,09	0,501 ± 0,02	99,99
<b>LNC-LICH<sub>500</sub></b>	5,67 ± 1,8	1,02 ± 0,01	-8,25 ± 0,07	0,499 ± 0,01	100

A análise de rastreamento do movimento das partículas (NTA), obtida com o equipamento NanoSight, foi utilizada para verificar se nanocristais de chalcona CH8 não-encapsulada estariam presentes nas formulações. A intensidade de luz espalhada, detectada ao longo dos vários *frames* da formulação LNC-LICH<sub>500</sub>, captados pela câmera do equipamento, não variou com a presença de chalcona CH8 (Figura 40). Isso indicou que estruturas anisotrópicas não estiveram presentes nas formulações, em destaque LNC-blank e LNC-LICH<sub>500</sub>. Portanto, nanocristais de chalcona CH8 não teriam sido formados concomitantemente com as nanocápsulas.



**Figura 33:** Intensidade de luz captada pela câmera ao longo de 60 s (900 *frames*) em função do diâmetro de partícula, a partir da técnica de rastreamento do movimento das partículas (nanosight®), para as formulações (A) LNC-blank e (B) LNC-LICH<sub>500</sub>. no detalhe, é demonstrada a distribuição de diâmetro por concentração de partículas em cada amostra.

### Microscópio óptico com luz polarizada

Após 45 dias da preparação das formulações, análises no microscópio óptico foram desenvolvidas, com o objetivo de observar a presença de cristais na amostra. Conclui-se que não foi observado cristais nas suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico.

#### 5.6.1.2 Suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo derivados do limoneno.

##### 5.6.1.2.1 Distribuição de tamanho de partícula

O diâmetro de esfera equivalente ( $d_{4.3}$ ) em percentual de volume das formulações variou de 0,143  $\mu\text{m}$  (LNC-L28) a 0,196  $\mu\text{m}$  (LNC-L08). Os diâmetros cumulativos em volume de 50 % da população total ( $d_{0.5}$ ) para todas as formulações mantiveram-se aproximadamente na mesma faixa de tamanho, de 0,126  $\mu\text{m}$  (LNC-blank) a 0,165  $\mu\text{m}$  (LNC-LaSOM 08). Os valores de *Span* foram inferiores a 2,0 (Tabela 13).

**Tabela 7:** Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser (n = 3).

Formulação	$d_{4.3}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.9}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.5}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.1}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i> (adimensional)
<b>LNC-Lim</b>	0,166 $\pm$ 0,006	0,294 $\pm$ ,0011	0,140 $\pm$ 0,004	0,081 $\pm$ 0,002	1,6 $\pm$ 0,1
<b>LNC-L08</b>	0,196 $\pm$ 0,001	0,363 $\pm$ 0,001	0,165 $\pm$ ,001	0,075 $\pm$ 0,001	1,7 $\pm$ 0,1
<b>LNC-L28</b>	0,143 $\pm$ 0,04	0,240 $\pm$ 0,013	0,126 $\pm$ 0,009	0,063 $\pm$ 0,009	1,4 $\pm$ 0,1

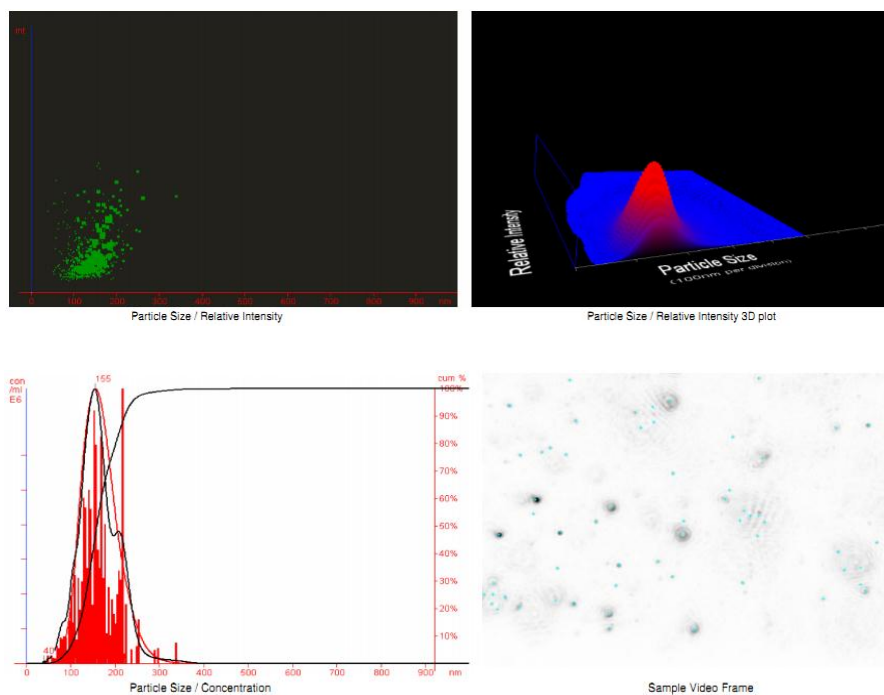
E o diâmetro médio encontrado foi compatível aos relatados em outros trabalhos para nanocápsulas preparadas com poliésteres e pelo método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados<sup>40,41</sup>. Foi verificada diferença nos diâmetros das nanocápsulas contendo as amostras, demonstrando que a viscosidade da fração oleosa influencia no tamanho das nanopartículas. Há diferença macroscópica na viscosidade dos compostos encapsulados que estão de acordo com os resultados dos diâmetros obtidos.

As formulações foram avaliadas também através de espalhamento de luz dinâmico (tabela 14). A análise da luz espalhada, aplicando-se o método dos cumulantes, resultou em valores de diâmetro (*Z-average*) na faixa de 158  $\pm$  14 nm (LNC-Lim) a 189,9  $\pm$  10 nm (LNC-LaSOM 08), com PDI inferior a 0,1.

**Tabela 8:** Caracterização físicoquímica das nanocápsulas de núcleo lipídico (n= 3).

Formulação	PCS (método dos cumulantes)	
	$d_h$ ( <i>Z-ave</i> ) (nm)	<i>PDI</i> (adimensional)
<b>LNC-Lim</b>	174 $\pm$ 14	0,08 $\pm$ 0,01
<b>LNC-L08</b>	190 $\pm$ 10	0,10 $\pm$ 0,04
<b>LNC-L28</b>	158 $\pm$ 11	0,04 $\pm$ 0,02

A análise de rastreamento do movimento das partículas (NTA) foi investigada pelo Software Analítico NTA 2.0 (NanoSight). Esse equipamento fornece informações quantitativa e visual da distribuição do tamanho das nanocápsulas, além de verificar a presença de possíveis nanocristais dos derivados de limoneno não-encapsulados que pudessem estar presentes nas formulações. A intensidade de luz espalhada, detectada ao longo dos vários *frames* captados pela câmera do equipamento, não variou com a presença dos derivados. Os ensaios desenvolvidos no Nanosight® demonstraram em tempo real o movimento browniano das partículas que é influenciado diretamente pelo diâmetro das mesmas. A quantidade de luz dispersa indica o diferente tamanho das partículas, ponto luminoso maior se refere a nanoestruturas maiores<sup>55</sup>. Observa-se nesse trabalho, que a luz dispersa no campo do microscópio é semelhante, indicando homogeneidade no tamanho das partículas (figura 43).



**Figura 34:** a) Distribuição do tamanho das partículas em relação a intensidade (esquerda superior) e distribuição do tamanho das partículas em 3d (direita superior) referente a LNC-L28. b) Diâmetro médio das partículas baseado na concentração (esquerda inferior) e uma foto do vídeo que analisa as partículas pelo movimento browniano (direita inferior).

### 5.6.2.2 Demais caracterizações das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas

A tabela 15 demonstra as características de pH, viscosidade, potencial  $\zeta$ , teor e taxa de associação das formulações desenvolvidas com limoneno, LaSOM 08 e LaSOM 28. Os valores de pH entre 5,51 a 6,37 é condizente com o método de preparação e matérias-primas utilizadas no estudo e não diferiram significativamente após 30 dias de armazenamento das formulações (tabela 8). Esses dados estão de acordo com valores previamente reportados<sup>15</sup>.

Quando foram desenvolvidas nanocápsulas com concentrações maiores de LaSOM 08 e LaSOM 28 (1 - 2,5mg/mL) observou-se que o pH das suspensões aumentava, estando neutro a básico, aumentando com o passar dos dias. Além disso, as análises de difratometria de laser mostraram aparecimento de população micrométrica em poucos dias de preparo. Acredita-se que isso se deva ao grupamento amina presente na estrutura dos compostos, que em maior quantidade poderia estar sendo ionizada e transferida para a fase aquosa, visto que o polímero é uma rede porosa. Outra suposição embasada na literatura envolve a degradação acelerada do polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) em meio alcalino, visto que a integridade do mesmo é dependente do pH.

A PCL, assim como os outros poliésteres alifáticos sintéticos, com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros, ou monômeros, solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue então por processos biologicamente ativos ou pela clivagem hidrolítica passiva<sup>42</sup>. Duek em 2006<sup>43</sup> avaliaram por meio da degradação *in vitro* amostras de PCL (Mw 100.000 g/mol) e PLGA 50 (Mw 65.000 g/mol) em soluções de NaOH, buscando predizer de forma acelerada o comportamento da variação de massa, das propriedades térmicas e morfológicas em pH fisiológico, 7,4. Puderam observar nesse trabalho que o PLGA apresentou uma velocidade de perda de massa maior que a PCL, mas ambas perderam massa em pH alcalino.

Essas suspensões também apresentaram valor de viscosidade próximo a viscosidade da água pura, esse resultado está de acordo com estudos anteriores envolvendo LNCs<sup>39</sup>.

Por fim, a análise do Potencial  $\zeta$ , que reflete o potencial de superfície das partículas, na LNC-Lim o valor obtido foi de -8,45mV. Os valores de LNC-L08 e LNC-L28 foram um pouco maiores em módulo, -20,5mV e -14,7mV. O valor do potencial  $\zeta$  obtido foi próximo de zero para as formulações LNC-blank e LNC-Lim, sendo adequado para evitar a agregação das gotículas já que foram preparadas com tensoativo não-iônico, como o polissorbato 80, com mecanismo de impedimento estérico<sup>28</sup>. Ou seja, obteve-se potencial zeta com valores (em módulo) menores, mas isso não representa instabilidade do sistema<sup>44</sup>. Para as formulações contendo os derivados do limoneno, mesmo utilizando o mesmo tensoativo não-ionico para a estabilização, observou-se um aumento (em módulo) do potencial  $\zeta$ . A partir desse resultado e dos dados de pH, pode-se propor um mecanismo pelo qual os compostos (LaSOM 08 e LaSOM 28) e o polímero interagem. Acredita-se que os ativos estejam parcialmente dissolvidos no núcleo oleoso das nanocápsulas e também adsorvidos à parede polimérica das nanocápsulas. Ou seja, esses indícios que nos faz pensar que as estruturas podem estar com sua porção apolar voltada para o núcleo oleoso e a porção polar para a parede polimérica. Sugerindo que ocorra uma interação eletrostática entre o fármaco e o polímero<sup>15</sup>.

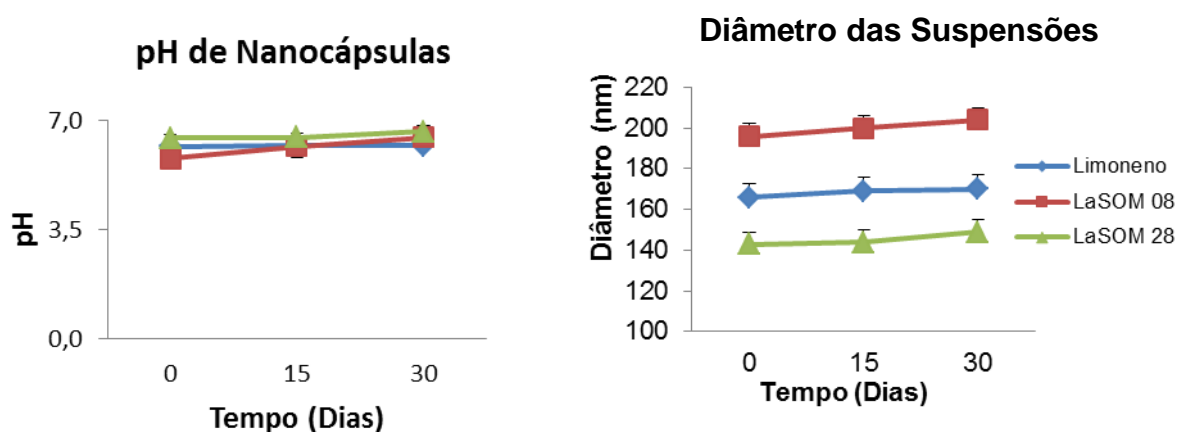
**TABELA 9:** Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após a preparação (n = 3).

<b>Formulação</b>	<b>pH</b>	<b>Viscosidade (mPas)</b>	<b>Potencial <math>\zeta</math> (mV)</b>	<b>Teor (mg/mL)</b>	<b>Taxa de associação (%)</b>
<b>LNC-Lim</b>	6,10 ± 2,1	0,96 ± 0,03	-8,19 ± 0,10	0,470 ± 0,10*	98,00
<b>LNC-L08</b>	5,98 ± 4,3	1,01 ± 0,02	-20,5 ± 0,20	0,501 ± 0,03	99,99
<b>LNC-L28</b>	6,37 ± 0,8	1,03 ± 0,011	-14,7 ± 0,11	0,495 ± 0,01	99,80

\*Teor correspondente a 20% de limoneno na nanoestrutura.

### 5.6.2.3 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade efetuado com análise de pH e diâmetro está representado nos gráficos abaixo. O pH da formulação LNC-Lim não variou durante os dias, já o pH das demais formulações apresentaram uma leve tendência ao aumento, porém sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo zero e 30 dias (figura 44).

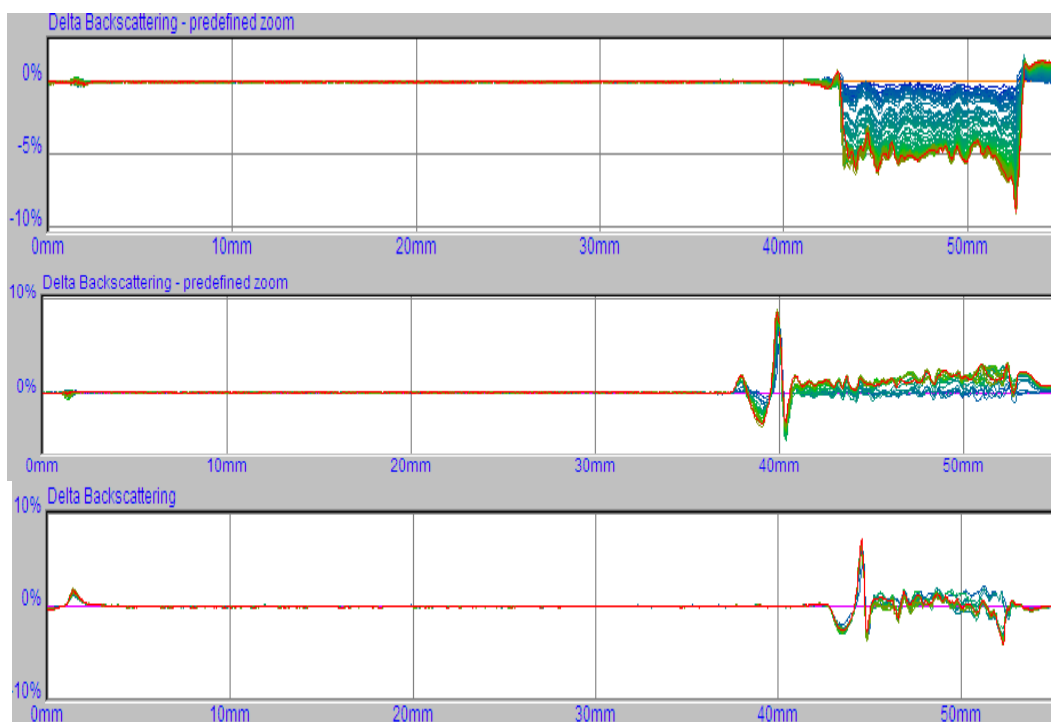


**Figura 35:** Diâmetro e pH médio das suspensões durante o armazenamento.

Análise por espalhamento múltiplo de luz é capaz de demonstrar possíveis fenômenos de desestabilização reversíveis (cremagem e sedimentação) e irreversíveis (coalescência e segregação) sem diluição da amostra. Nesse estudo, o gráfico de transmissão apresentou variação de transmissão inferior a 0,2% devido a isto, somente o gráfico do retroespalhamento será apresentado. Na figura 45 é possível ver as análises gráficas referente à variação de backscattering das formulações. A parte esquerda do gráfico refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo.

Na análise por espalhamento múltiplo de luz das nanocápsulas pode-se observar, de maneira geral, que os fenômenos de instabilidade na base e no topo da célula de vidro foram inferiores a 2% e dentro dessa faixa de variação há estabilidade física no sistema. Já, variações acima de 10% são representativos de uma formulação instável<sup>45</sup>. O pico negativo no topo da cubeta e o positivo na base corresponde a uma ligeira cremagem ou processo de sedimentação. Sabe-se que

essas suspensões coloidais apresentam intrinsecamente instabilidades físicas consideradas aceitáveis e características.

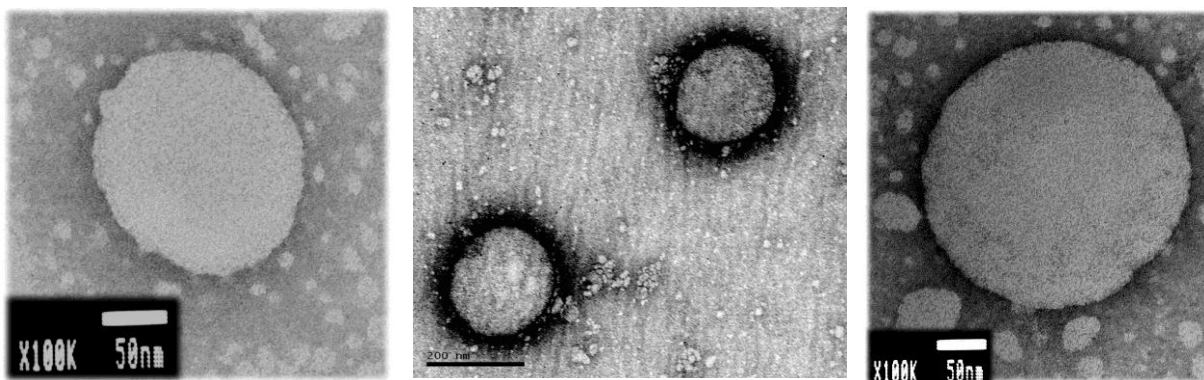


**Figura 36:** Análise por espalhamento múltiplo de luz das suspensões de nanocápsula. A) LNCLim; B) LNC-L08; C) LNC-L28.

## 5.7 Avaliação morfológica

As análises por Microscopia Eletônica de Transmissão (MET) efetuadas com as formulações LNC-Lim, LNC-L08 e LNC-L28 estão expostas na figura 46. A MET tem sido muito empregada para a obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanoestruturas<sup>15</sup>. As análises por MET demonstraram nas fotomicrografias, nanocápsulas com tamanho esférico ou quase esférico com aproximadamente 200 nm de diâmetro. A LNC-LaSOM 08 demonstrou apresentar a parede polimérica espessa, possivelmente isso possa indicar que o LaSOM 08 se encontra entre o núcleo oleoso e a parede polimérica, corroborando com o dado encontrado no  $\zeta$  zeta. Isso também é observado na fotomicrografia de LNC-L28. Ressalto também, que essas nanocápsulas estão revestidas de polissorbato 80 e isso também pode representar a presença desse tensoativo na interface entre a fase dispersante e a partícula.





**Figura 37:** Fotomicrografias obtidas por MET das suspensões de nanocápsulas: A) LNC-Lim (100K); B) LNC-L08 (200K) E C) LNC-L28 (100K).

### **5.8 Desenvolvimento de formulações semissólidas para tratamento tópico de leishmaniose.**

Como estratégia de formulação, a nanoencapsulação propicia uma série de vantagens, várias delas de interesse para a administração cutânea<sup>1</sup>. A incorporação de substâncias em nanocarreadores pode modular e/ou controlar seus perfis de entrega (imediate ou sustentada) e permeação através da pele<sup>18,19</sup>. Outros benefícios decorrentes da nanoencapsulação são: o aumento da estabilidade de moléculas lábeis e a melhoria das características oclusivas de formulações (efeito hidratante) devido ao tamanho nanométrico dos sistemas<sup>20</sup>.

Dentre as diversas espécies de leishmania, destaca-se a *leishmania amazonensis* como uma importante causadora de lesões cutâneas e muitas dessas lesões causam deformações irreversíveis. As manifestações clínicas se iniciam com pequenas pápulas eritematosas que aumentam vagarosamente de tamanho, transformando-se em nódulos e posteriormente em lesões. A anormalidade da pele causada pela patologia não é apenas um fenômeno secundário, mas crítico que pode acarretar alterações inflamatórias de maior gravidade. Quando a superfície externa da pele (extrato córneo) é danificada, uma série de eventos inflamatórios se iniciam. O período de incubação da leishmaniose cutânea varia conforme a espécie dessa doença, estando entre duas semanas a três anos<sup>13</sup>.

As formulações semissólidas desenvolvidas foram caracterizadas quanto ao

seu aspecto visual, pH, diâmetro médio das nanocápsulas incorporadas e propriedades reológicas.

## **5.8.1 Caracterização dos hidrogéis contendo nanocápsulas**

### **5.8.1.1 Aspectos visuais**

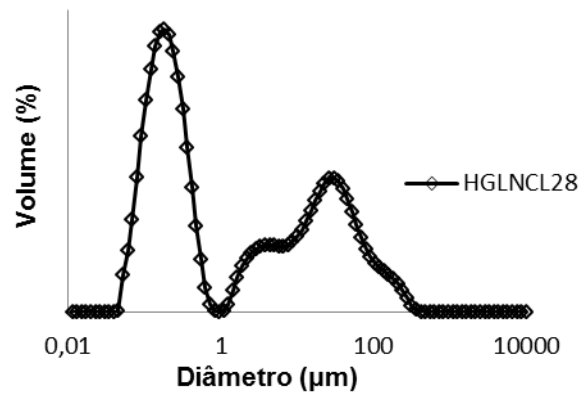
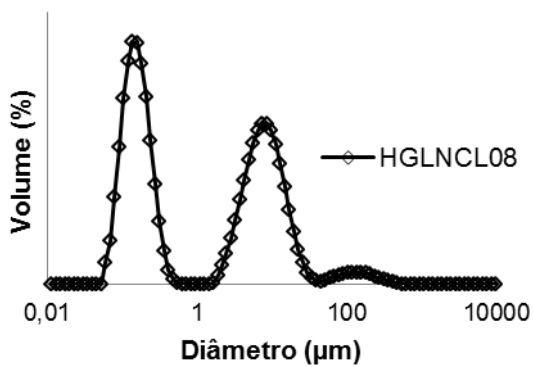
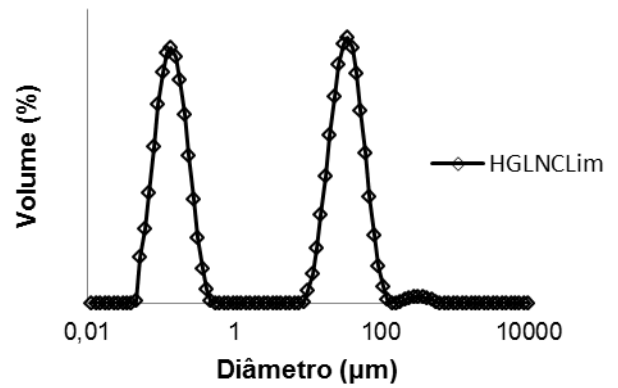
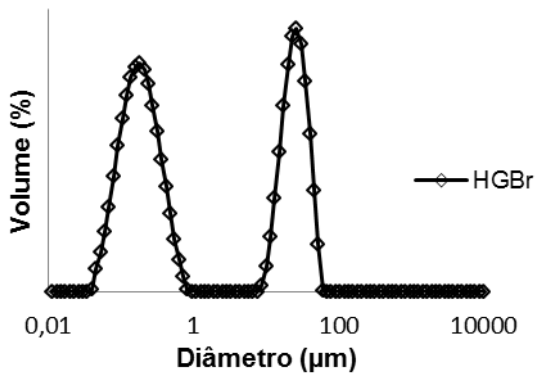
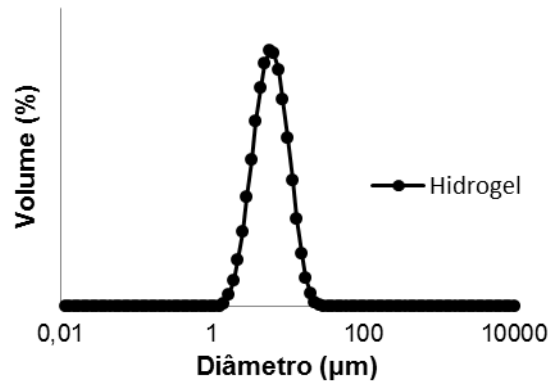
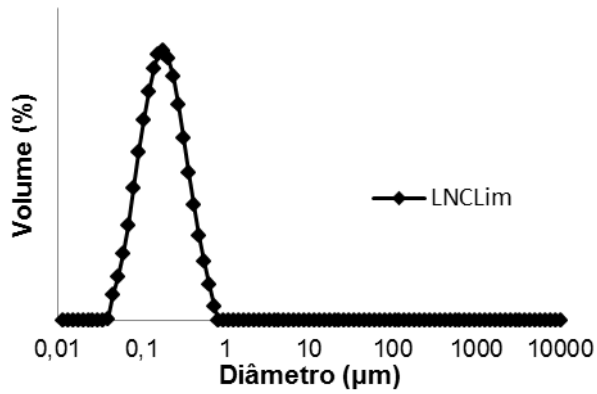
As formulações de nanocápsulas sem os compostos ativos (HGBr) e contendo os ativos (LNC-Lim, LNC-LaSOM 08 e LNC-LaSOM 28) foram incorporadas em géis hidrofílicos compostos por carbômero, denominados de HGLNCLim, HGLNCL08 e HGLNCL28. Para fins de comparação, foi preparado também um hidrogel contendo apenas carbômero e água (HG), esse hidrogel apresentou-se transparente enquanto que os hidrogéis formados com as suspensões de nanocápsulas apresentaram coloração esbranquiçada, brilhosa e homogênea. Essas características se devem à presença de nanopartículas pouco polidispersas em que seu diâmetro nanométrico espalha luz.

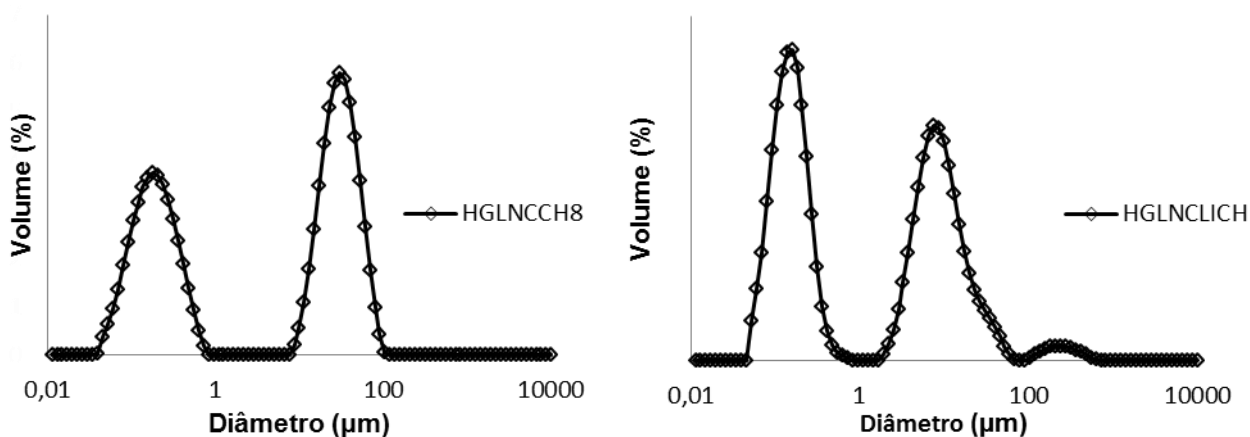
### **5.8.1.2 pH e diâmetro médio das nanocápsulas incorporadas**

Os valores de pH para os diversos hidrogéis permaneceram em torno de 6,5 e não foi observado diferença nos valores de pH dos hidrogéis contendo as suspensões de nanocápsulas quando comparados ao HG. Esses valores de pH são ideais para aplicação cutânea das formulações, valores de pH entre 3 e 10 não interferem nas características de permeação de substância lipofílicas.

A distribuição do tamanho das partículas obtida pela análise das suspensões de nanocápsulas, por difratometria de laser, antes da incorporação à base semissólida demonstrou similaridade à distribuição do tamanho das partículas após a incorporação na base. Na figura abaixo, estão representados os perfis de LNCLim e HGLNCLim, eles servirão como representantes das demais formulações, visto que esse perfil foi comum entre todas as suspensões de nanocápsulas e hidrogéis contendo as suspensões. Segundo Verma e colaboradores<sup>53</sup>, o diâmetro recomendado de nanoestruturas para aplicação tópica é inferior a 600nm. Ressalta-se então que as nanocápsulas desenvolvidas contendo limoneno ou seus derivados

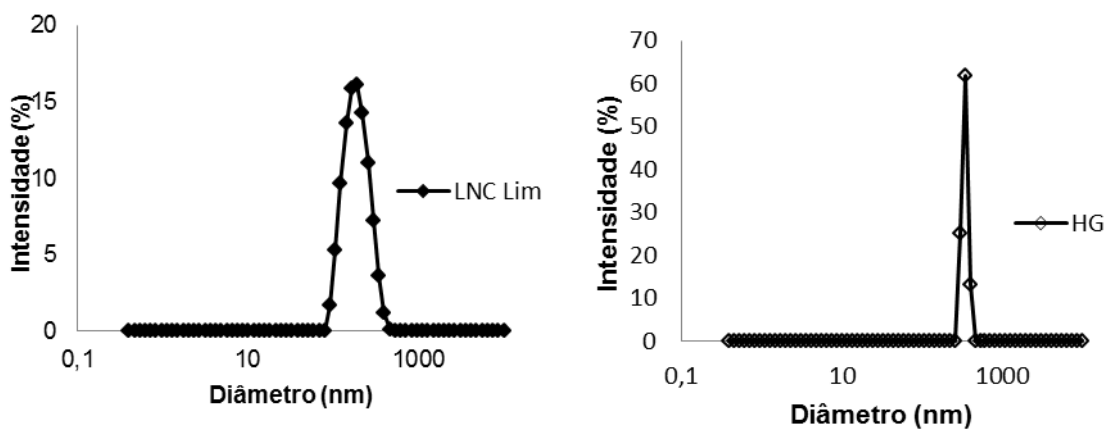
apresentam diâmetro médio menor que 200nm, sendo adequadas para aplicação tópica.

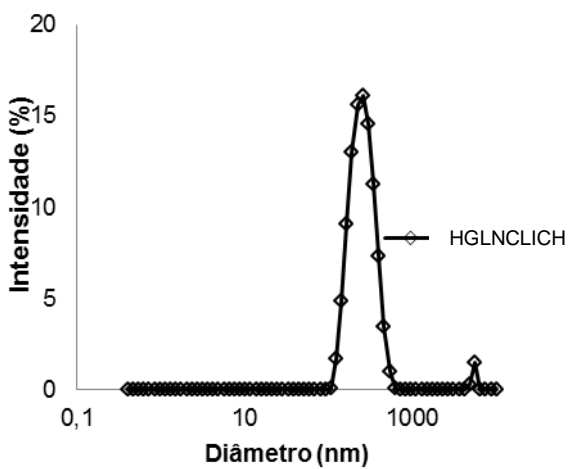
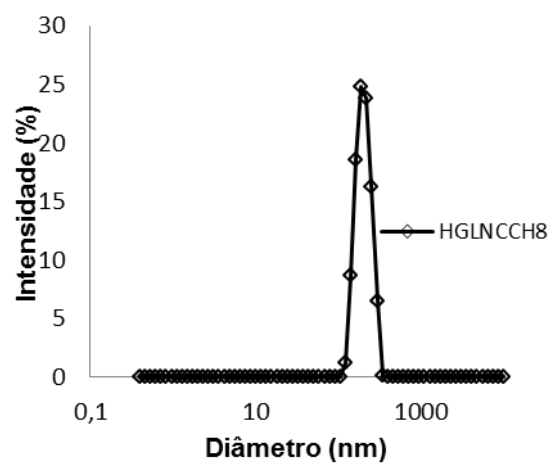
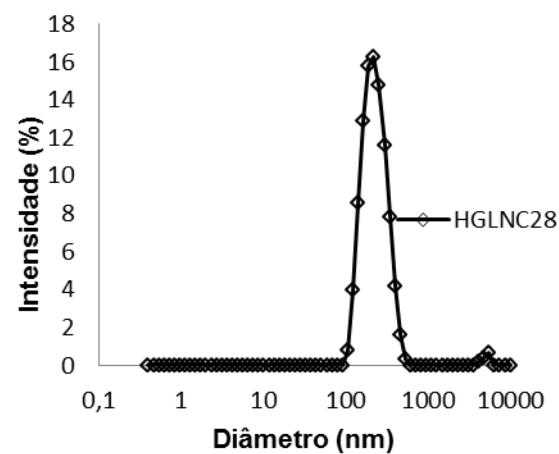
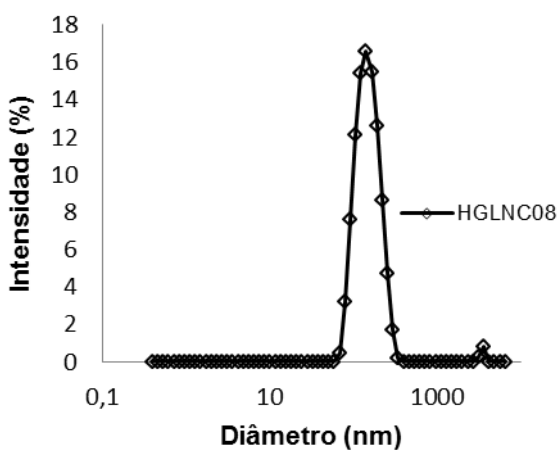
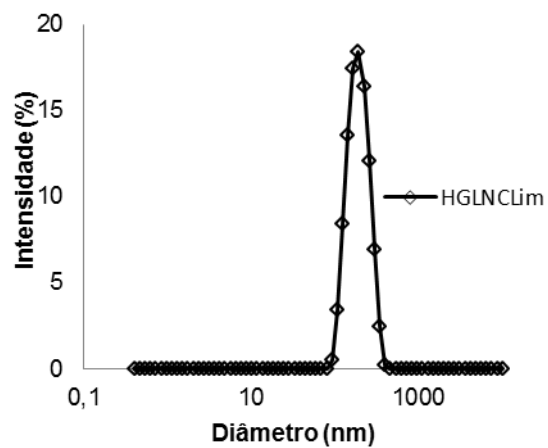
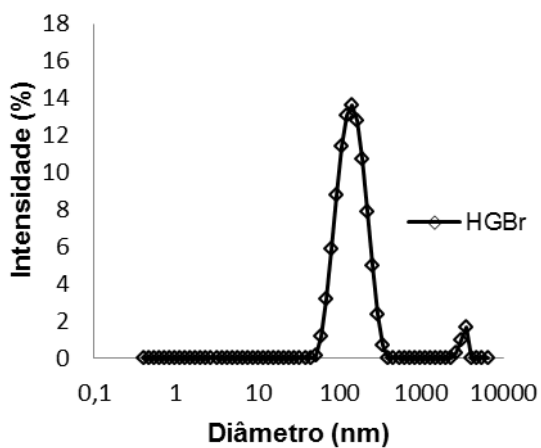


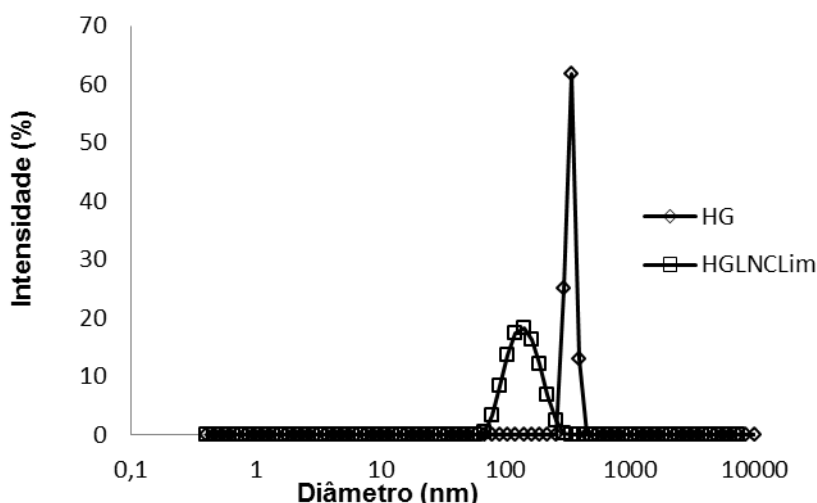


**Figura 47.** Distribuição de tamanho de partícula dos hidrogéis. a) LNCLim; b) HG; c) HGLNCbr; d) HGLNCLim; e) HGLNCL08; f) HGLNCL28; g) HGLNCCH8 e h) HGLNCLICH (n = 3).

A distribuição do diâmetro das partículas e a polidispersão dessas amostras, LNCLim e HGLNCLim, por espectrometria de correlação de fótons, também demonstrou proximidade na distribuição do tamanho das partículas antes e após a incorporação na base semi-sólida. O diâmetro médio das partículas antes da incorporação em base semi-sólida foi de 174 nm, enquanto que após a incorporação no hidrogel, o diâmetro médio foi de 189 nm (Figura 48).







**Figura 48:** Distribuição do tamanho das partículas por espectrometria de correlação de fótons. a) LNCLim; b) HG; c) HGLNCbr; d) HGLNCLim; e) HGLNCL08; f) HGLNCL28; g) HGLNCCH8 e h) HGLNCLICH (n = 3).

### 5.8.1.3 Propriedades reológicas das bases semissólidas contendo as suspensões de nanocápsulas

Avaliar o comportamento reológico das formulações semissólidas para uso tópico é essencial para determinar seus efeitos, controle de qualidade, espalhabilidade e consequente aceitação pelo paciente, além da estabilidade dessa forma farmacêutica<sup>54</sup>.

A viscosidade de um líquido mede a resistência de um líquido em fluir ou escoar e não está diretamente relacionada com a densidade do líquido. Os hidrogéis foram avaliados quanto ao seu comportamento reológico através de viscosímetro rotacional. Os reogramas das formulações semi-sólidas da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento não apresentaram linearidade, ou seja, a viscosidade não foi constante ou igual ao coeficiente angular da reta, caracterizando os hidrogéis como sistemas não-newtonianos. Visto que, segundo a Lei de Newton para os líquidos ideais a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à velocidade de cisalhamento. As principais causas do fluxo não-newtoniano em sistemas coloidais são a formação de uma estrutura organizada através do sistema

e a orientação de partículas assimétricas na direção do fluxo provocadas pelo gradiente de velocidade.

Diferentes tipos de comportamentos não-newtonianos podem ser identificados, dentre eles destacam-se os fluxos dilatantes, plásticos e pseudoplásticos. Materiais em que a viscosidade aparente aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento é chamado de dilatante. A equação que representa esse modelo é semelhante a que descreve o modelo pseudoplástico, sobretudo, o valor de  $n$  (índice de fluxo) é maior que 1 e aumenta com o aumento da dilatância.

O material com comportamento plástico se comporta como um sólido quando em repouso devido as interações interparticulares e apresentam escoamento a partir de uma tensão mínima. A tensão crítica mínima deve ser maior que interações interparticulares destruindo a estrutura do material. Essa força é chamada de tensão de cedência. Subsequentemente, exibe uma relação linear entre tensão e taxa de deformação, se comportando como um material newtoniano.

O comportamento pseudoplástico é o oposto da dilatância, nesse caso ocorre a redução da resistência do material com o aumento da taxa de cisalhamento. Esse comportamento obedece o modelo de Ostwald, com  $n$  menor do que 1. O índice de fluxo é um parâmetro importante nessas análises, pois indica o grau de pseudoplasticidade de formulações semissólidas, sendo que quanto mais próximo de zero mais pseudoplástico o material.

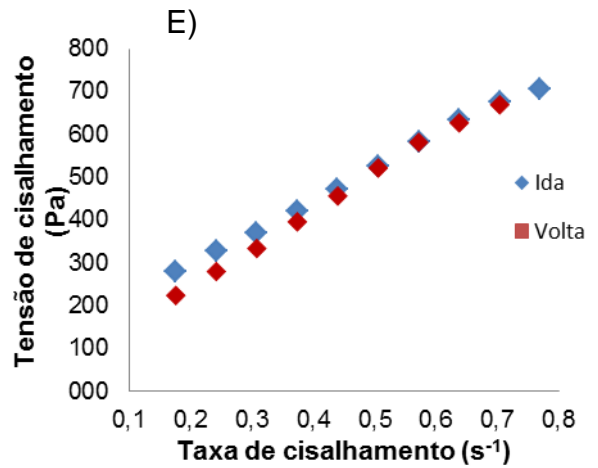
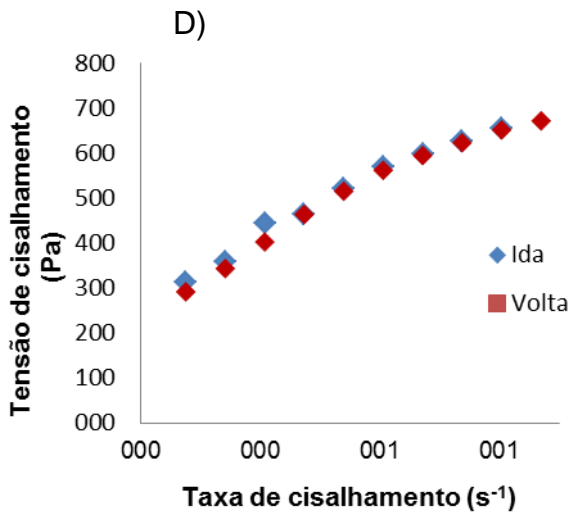
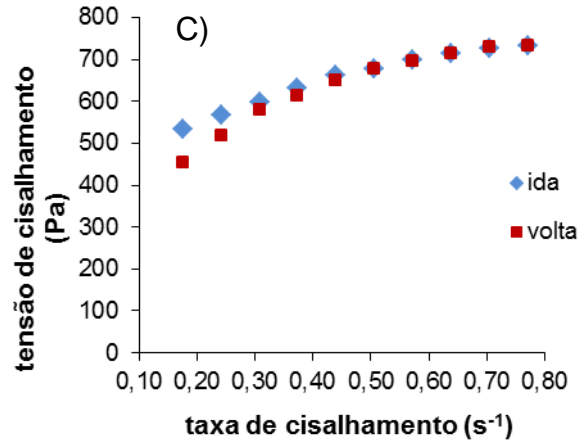
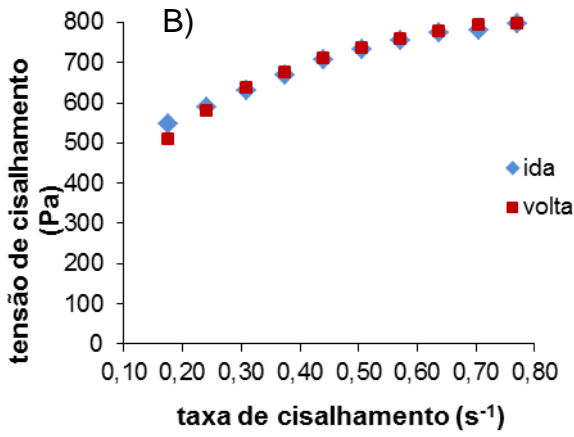
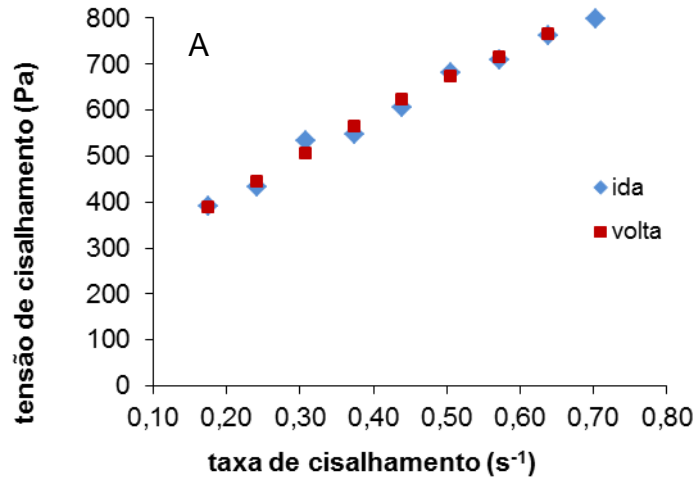
Para determinar o comportamento dos hidrogéis desenvolvidos, modelos matemáticos foram propostos. O modelo de Bingham representa o modelo de plástico perfeito mostrando relação linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, após vencer a tensão de cisalhamento inicial ( $\tau_0$ ). O modelo de Casson mostra características plásticas, calcula-se pela raiz quadrada da tensão de cisalhamento é plotada em relação a raiz quadrada da taxa de cisalhamento. O modelo de Ostwald representa um modelo pseudoplástico para valores de  $n < 1$  e é obtido pelos valores de log da tensão e taxa de cisalhamento. Esses modelos seguem a lei das potências e informam valores de consistência e índice de escoamento. O modelo de Herschel-Bulkley representam o comportamento do tipo lei da potência com tensão de cisalhamento inicial.

Os hidrogéis desenvolvidos nessa tese representaram formulações semisólidas com comportamento não-newtoniana e características plásticas. Resultado coerente com Milão e colaboradores em 2003, que obtiveram formulações semi-sólidas do mesmo carbômero, gel de carbopol, com características plásticas<sup>56</sup>. Dentre os quatro modelos, as curvas do fluxo desses géis foram melhor ajustadas pelo modelo de Casson, apresentando maiores valores de coeficientes de determinação. Esses valores permaneceram entre 0,990 a 0,996 para os hidrogéis desenvolvidos. Sistemas complexas que contém tensoativo, polímero e outros excipientes, como é o caso das emulsões ou suspensões apresentar características reológicas dependentes do sistema reticular formado.

Os hidrogéis foram avaliados quanto ao seu comportamento reológico através de viscosímetro rotacional (figura 49). Os géis mostraram-se com comportamento não-newtoniano, pois a viscosidade variou com o aumento da taxa de cisalhamento em todas as amostras. A viscosidade do hidrogel preparado com água variou de 221353 a 109143 cP com o aumento da taxa de cisalhamento de 0,18 a 0,77 s<sup>-1</sup>, e passou a 220153 cP com a redução subsequente da taxa de cisalhamento para 0,18 s<sup>-1</sup>. Tal resultado indicou ausência de histerese. Comportamento semelhante foi encontrado para os hidrogéis contendo nanocápsulas. No entanto, os valores de viscosidade foram levemente superiores na amostra HGLNClBr, correspondendo à variação de 310734 a 103384 cP com aumento da taxa de cisalhamento, passando a 288538 cP com redução subsequente desse parâmetro. Por sua vez, a amostra contendo LNC-Lim apresentou valores levemente inferiores, variando de 302935 a 95020 cP com aumento da taxa de cisalhamento, o qual passou a 258545 cP com aumento subsequente da mesma. Por sua vez, a amostra contendo LNC-CH8 apresentou valores levemente inferiores, variando de 176924 a 87204 cP com aumento da taxa de cisalhamento, o qual passou a 165565 cP com redução subsequente da mesma. A amostra HGLNCl08 apresentou valores inferiores as demais amostras, com variação entre 158966 e 91729 cP e com o aumento da taxa de cisalhamento, passando a 127173. O hidrogel HGLNCl28, que apresentou resultados semelhantes aos demais, os valores de viscosidade variou de 273542 a 98859, aumentando com o aumento da taxa de cisalhamento, passando a 221953. Por fim, o HGLNClICH apresentou valores variando de 176898 a 85130 cP com aumento da taxa de cisalhamento, o qual passou a 169544 cP com redução

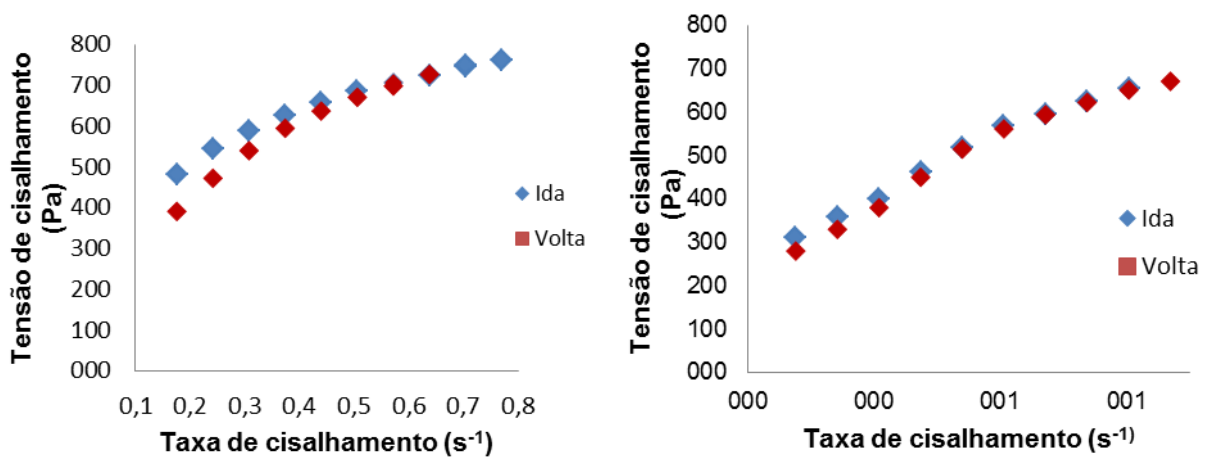


subsequente da mesma.



F)

G)



**Figura 49:** Perfil reológico dos géis. a) HG; b) HGLNCbr; c) HGLNCLim; d) HGLNCCH8; e) HGLNCL08; f) HGLNCL28 e g) HGLNCLICH (n = 3).

## 6 CONCLUSÕES

Nesse estudo inovador com o limoneno, seus derivados e chalcona, nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas e caracterizadas para aplicação tópica no tratamento de leishmaniose cutânea.

Suspensões de nanocápsulas desenvolvidas com o dobro da fração volumétrica contendo limoneno, seus derivados e/ou chalcona preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado apresentaram diâmetro menor que 210 nm, índices de polidispersão abaixo de 0,13.

Análises por espalhamento múltiplo de luz das nanocápsulas demonstraram, de maneira geral, que os fenômenos de instabilidade foram inferiores a 2% e dentro dessa faixa de variação demonstrando que há estabilidade física nos sistemas.

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico com distribuição nanométrica e unimodal em análise na difração de laser demonstraram estabilidade quanto ao diâmetro médio, polidispersão, pH durante 30 dias armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Foi possível obter nanocápsulas com um aumento expressivo na concentração de limoneno com o auxílio de fixadores de perfume. Esse compostos atuaram como âncoras moleculares, aumentando a permanência desse terpeno na nanoestrutura. As nanocápsulas demonstraram ser estáveis por 30 dias, na concentração máxima encapsulada de 0,5mg/mL de ativo.

O método analítico de quantificação dos derivados aminados encapsulados foi desenvolvido por CG-MS, demonstrando ser um método linear, preciso, exato, específico e com limites de quantificação e detecção abaixo da curva padrão.

Formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas com o dobro da fração volumétrica contendo 0,5 mg/mL de chalcona CH8 foram preparadas sem evidência de formação de população micrométrica. Nanocristais de flavonóide não se formaram concomitantemente às nanocápsulas nessa concentração.

Foi possível incorporar as formulações em hidrogéis de carbômero, os quais apresentaram perfil reológico não-newtoniano e características plásticas. Dentre os

quatro modelos, as curvas do fluxo desses géis foram melhor ajustadas pelo modelo de Casson, apresentando maiores valores de coeficientes de determinação.

## 7 REFERÊNCIAS

1. GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**. v.2, p.147-157, 2007.
2. TADROS, T., ISQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.108, p.303-318, 2004.
4. FOLDVARI, M. Non- invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. v.3, p. 417-425, 2000.
5. RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada à dermocosmética**. 2ª Edição, São Paulo: Pharmabooks, 2010.
6. MARKS, R. The stratum corneum barrier: the final frontier. **The Journal of Nutrition**. v.143, p.2017S-2021S, 2004.
7. MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001
8. NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function- **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, p. 318-326, 2000.
9. ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**., v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
10. HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research**. v.25, p.363-370, 2000.
11. SAMUELSON, J. Doenças infecciosas. In ROBBINS, S.L. (Ed). **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.350-351, 2000.
12. REY, L. Leishmania e Leishmaníases: os parasitos. In REY, L.(Ed). **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.214-266, 2001.
13. MARKELL, E.K., JOHN, D.T., KROTOSKI, W.A., Outros protozoários que habitam o sangue e os tecidos. In: MARKELL, E.K., JOHN, D.T., KROTOSKI, W.A., (Ed). **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.115-176, 2003
14. PIÑON-SEGUNDO, E.; GANEM-QUINTANAR, A.; ALONSO-PÉREZ, V.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation and characterization of triclosan nanoparticles for periodontal treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 217 – 232, 2005.
15. SCHAFFAZICK S.R., FREITAS L.L., POHLMANN A.R., GUTERRES S.S.: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos **Química Nova**. v 26, p726-737, 2003.

16. CEVC, G. Lipid vesicles and others colloids as drug carrier on the skin. **Advanced drug delivery Reviews**. v.56, p.675-681, 2004.
17. WILLIAMS, D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. **Biomaterials**. v.29, p.1737-1738, 2008.
18. WISSING, S. A. e MÜLLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, (254): 65-68, 2002.
19. GARG, A., KOKKOLI, E. Characterizing particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. **Engineering in Medicine and Biology Magazine**. v.24, p.87-95, 2005.
20. WEISS-ANGELI V, POLETTO FS, ZANCAN LR, BALDASSO F, POHLMANN AR, GUTERRES SS: Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical and Nanotechnology**. v.4, p. 80– 89, 2008.
21. MULLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.54, p.S131–S155, 2002.
22. BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631 – 651, 2002.
23. REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drugloaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 2, p. 8 – 21, 2006.
24. RODRIGUES, J., CROFT, S., FESSI, H., BORIES, C., DEVISSAGUET, J. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly(D, L -lactide) nanoparticles in Leishmania donovani infected mice, **Tropical Medicine and Parasitology**. v.45, p.223–228, 1994.
25. ESPUELAS, M., LEGRAND, P., LOISEAU, P., BORIES, C., BARRAT, G., IRACHE, J. In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in Poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanospheres, **Journal of Drug Targeting**. v.10, p. 593 –599, 2002.
26. TORRES-SANTOS, E., RODRIGUES JR., J., MOREIRA, D., KAPLAN, M., ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2,6 -dihydroxy-4 -methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.43, p.1776– 1778, 1999.
27. FERRARINI, S.R. ; GRAEBIN, C.S. ; LIMBERGER, J.; CANTO, R.F.S. ; DIAS, D.O. ; ROSA, R.G. DA; MADEIRA, M.F.; EIFLER-LIMA, V.L. Synthesis of limonene and  $\beta$ -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 773-777, 2008.
28. JÄGER E, VENTURINI CG, POLETTO FS, COLOMÉ LM, BERNARDI A, BATTASTINI AM, GUTERRES SS, POHLMANN AR: Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by

Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v.5, p.130–140, 2009.

29. GOVENDER, T.; STOLNIK, S. GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S.S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v.57, p.171–185, 1999.

30. CARRETERO, A.; VILLEPIN, R.; BRUNEL, L.; CARRIES, J.F. **Turbiscan LAb User Guide, Formulation**. 2005.

31. GUTERRES, SS. Etude pharmacotechnique et de tolerances digestive et tissulaire des nanocapsules de diclofenac. Paris: Faculé de Pharmacie de Chatenay-Malabry, 1995. Tese (**Doutorado em Farmácia**).

32. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. United States of America, 1996.

33. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial da União: Brasília, 2003.

34. KIM, M.K; CHOI, S.Y, Evaluation of gender difference in skin type and pH, **Journal of Dermatology Science**. v.41, p. 153–156, 2006.

35. GUTERRES SS, WEISS V, DE LUCCA FREITAS L, POHLMANN AR: Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**. v.7, p.195-199, 2000.

36. SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S.; Caracterização e Estudo de estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, p. 2, 2002.

37. CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA-COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES , S. S.; POHLMANN, A. R.; Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

38. JORNADA, D.S., Fiel, L.A., Bueno, K., Gerent, J., Petzold, C.L., Beck, R.C.R., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**. v.8, p. 6646-6655, 2012.

39. CONTRI RV, CORREA, KLR, FIEL LA, POLHMANN, AR, GUTERRES SS: Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**. V. p., 2011.

40. SIQUEIRA N.M., CONTRI R.V., PAESE K., BECK R.C.R., POHLMANN A.R., GUTERRES S.S. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 24, p. 166-174, 2011.

41. ALMEIDA JS., LIMA F, ROS S, BULHÕES LOS, CARVALHO LM, BECK RCR. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters** v.5, p.1603–1610, 2010.
42. MARTEN, E., MÜLLER, R-J., DECKWER, W-D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v.80, p.485-501, 2003.
43. DUEK, E.A.R., BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C. Degradação acelerada de suportes de poli(e-caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polimers**. v.16, p.141-148, 2006
44. DURO R., GÓMEZ-AMOZA JL, MARTÍNEZ-PACHECO R, CONCHEIRO A: Adsorption of polysorbate 80 on pytanter pamote: effects on suspension stability. **International Journal of Pharmaceutics**. v.165, p.211-216, 1998.
45. CELIA C, TRAPASSO E, COSCO D, PAOLINO D, FRESTA M: TURBISCAN LAB (R) Expert analysis of the stability of ethosomes (R) and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.72, p.155-160, 2009.
46. KRULL, I., SWARTZ M. Quantification in method Validation. **LC-GC**. v.16, p.1084-1090, 1998.
47. Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M; Bosque-Sendra, J. M.; **Trends in Analytical Chemistry**. v.20, p.620, 2001.
48. HAJŠLOVÁ, J., HOLADOVA, K., KOCOUREK, V., POUŠTKA, J., GODULA, M., CUHRA, P., KEMPNY, M. **Journal of Chromatography A**. v 800, p.283, 1998.
49. PINHO, G.P., NEVES, A.A., QUEIROZ, M.E.L.R., SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**. v.32 (4), p.987-995, 2009.
50. RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27 (5), p.771-780, 2004.
51. ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M.; GILVYDIS, D. M. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**. v.638, p. 57-63, 1993.
52. DOMOTOROVA, M., KIRCHNER, M., MATISOVA, E., ZEEUW, J. **Journal of Separation Science**. v.29, p.1051, 2006.
53. VERMA, D.D., VERMA, S., BLUME, G., FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International journal of Pharmaceutics**.. v.258 (1-2), p.141-151, 2003.
54. LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANG, J.L. **Teoria e prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Galouste Gulbenkian, 2001.



55. LEE, T. T. et al. Determination of heat-induced effects on the particle size distribution of casein micelles by dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis. **International Dairy Journal** [S.l.], v. 18, p. 1090-1096, 2008.
56. MILÃO, D., KNORST, M.T., GUTERRES, S.S., RICHTER, W. Hydrophilic gel containing nanocapsules of diclofenac: development, stability study and physico-chemical characterization. **Die Pharmazie**. v. 58 (5), p. 325-329, 2003.







# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO LIMONENO LIVRE E NANOENCAPSULADO FRENTE A CÂNCER CERVICAL.

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação comum para todos os tumores malignos. Apesar das origens antigas desse termo serem relativamente incertas, provavelmente deriva do termo em latim caranguejo, presumidamente porque o câncer “agarra-se de uma maneira obstinada a qualquer parte do que se apodera, como um caranguejo”<sup>1</sup>.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA)<sup>2</sup> o câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células invadindo tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, os quais podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Porém, a definição bioquímica para esta doença é uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular<sup>3</sup>.

Mundialmente, o câncer cervical constitui o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres. Sua incidência torna-se evidente na faixa etária entre 20 a 29 anos e o risco aumenta gradualmente com a idade. O câncer do colo do útero é uma doença que pode ser prevenida. No Brasil, a classificação das lesões intraepiteliais e cancerosas do colo do útero é utilizada em laudos citopatológicos, preconizada pelo Ministério da Saúde e as lesões identificadas no exame de Papanicolau devem ser tratadas e acompanhadas de acordo com o recomendado pelas Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero<sup>4,5</sup>. O exame de Papanicolau é primordial para o diagnóstico do câncer do colo do útero, pois este apresenta evolução lenta com longo período entre desenvolvimento das lesões precursoras e o aparecimento do câncer. Portanto, um dos mais altos potenciais de prevenção e cura, chegando perto de 100% quando diagnosticado nas fases pré-invasivas podendo ser tratado em nível ambulatorial em cerca de 80% dos casos<sup>6,7</sup>.

A etiologia deste tipo de câncer está associada à infecção pelo *Papilomavirus Humano (HPV)*, transmitido sexualmente, e à interação entre diversos fatores de risco. A infecção pelo vírus HPV precede o desenvolvimento de lesões malignas e tem sido associada a lesões precursoras de câncer cervical.

O tratamento dessa doença é efetuado com quimioterapia ou radioterapia. Estudos têm mostrado que a quimioterapia baseada em cisplatina administrada concomitantemente com a radiação proporciona um melhor tratamento. Porém, melhorias nos tratamentos terapêuticos não tem diminuído significativamente a taxa de mortalidade por esse tipo de câncer em pacientes com doença avançada, recorrente ou metastática que ainda tem um prognóstico ruim<sup>8</sup>. Assim outras alternativas têm sido propostas, levando em consideração os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro e que constitui a melhor compreensão dos mecanismos básicos de defesa antitumoral<sup>31</sup>.

A necessidade de agentes não-invasivos e antitumorais mais eficientes e menos onerosos tem levado a busca de novos compostos com ação farmacológica no controle do crescimento das células tumorais, bem como na modulação nas moléculas que permitem as metástases. Novos avanços através da intensificação do tratamento padrão são limitados pela resistência inata e adquirida do tumor e pelos efeitos colaterais de curto e longo prazo. Nesse sentido, alternativas são necessárias e podem prolongar o efeito antitumoral, com baixos efeitos tóxicos. Uma das alternativas muito promissoras é a utilização de compostos de origem natural na busca de terapias mais eficazes.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Câncer**

#### **2.1.1 Aspectos gerais e ciclo celular**

As neoplasias malignas representam quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade<sup>9</sup>. Essa doença é considerada um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo ainda importante causa de morte no Brasil e no mundo.

De fato, existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna<sup>10</sup>, mas a maior parte deles interferem na divisão celular por isso, o conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer<sup>11</sup>.

Grande parte das células eucarióticas passam por uma série de eventos ordenados que constituem o ciclo celular, o qual as células duplicam (replicam) seu DNA e, posteriormente, entram em divisão (mitose). Já, as células neoformadas não se comportam de forma coordenada, podendo continuar a se dividir, ou sair do ciclo celular, entrando no estado quiescência. A regulação do ciclo celular é crítica para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares<sup>12</sup>.

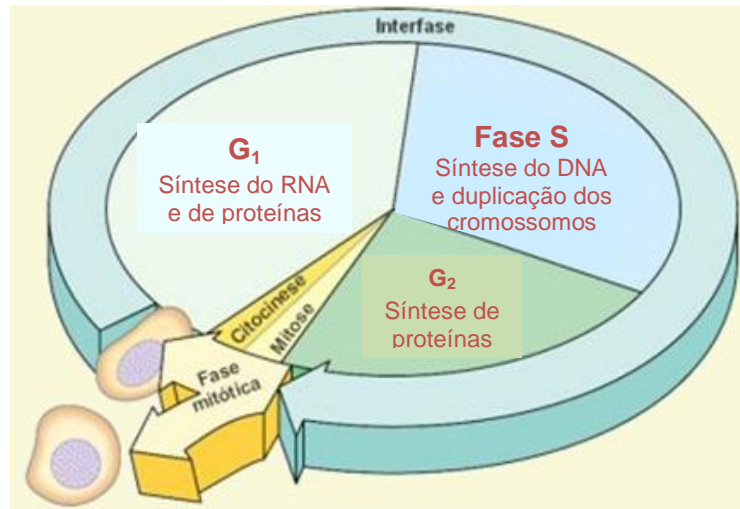
De acordo com a oncologia molecular, o câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas, algumas das quais podem ser adquiridas e outras herdadas. Os genes que são alterados são aqueles envolvidos nos processos celulares normais e fundamentais, como regulação do ciclo celular, a sinalização, e a diferenciação<sup>13</sup>.

Na figura abaixo, está representado o ciclo de replicação celular com as fases de desenvolvimento. Na fase  $G_0$ , que ocorre entre a fase mitótica e a fase  $G_1$ , a célula que não está replicando. Nesta fase, o DNA apresenta-se super-enovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio evolui para a fase  $G_1$ , onde a célula é

preparada para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S.

Nas fases  $G_1$  e S existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de crescimento, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação ("feedback") são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são, por exemplo, genes mutados (oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais). Oncogenes trata-se de um grupo de genes cuja presença e/ou hiperatividade podem predispor ao desenvolvimento de câncer. Visto que esse grupo codifica proteínas que estimulam excessivamente a proliferação celular<sup>14</sup>. O oncogene c-myc é fundamental para o processo tumorigênico em diversos cânceres humanos. A proteína codificada pelo gene c-myc em geral atua inativando os supressores tumorais, embora algumas vias associada a esta proteína não tenham sido totalmente elucidadas. A atividade desse gene em células normais é regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. Células diferenciadas normalmente expressam baixos níveis de c-myc<sup>15</sup>. Já, proto-oncogenes é uma família de genes normais que codificam as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular normal. Por fim, genes supressores tumorais, tratam-se de genes que codificam proteínas que inibem o crescimento de células tumorais<sup>16,17</sup>. Outro mecanismo regulador é a apoptose (morte celular programada), que provoca a morte da célula em detrimento da possibilidade da célula tornar-se alterada, podendo levar ao câncer<sup>18</sup>. Na fase  $G_2$  há a síntese de proteínas para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específico da espécie). Após a divisão do material nuclear há a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular (retorna à fase  $G_0$ ). A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase  $G_0$ ), assim passa da fase M para nova fase  $G_1$ .





**Figura 38:** Ciclo de replicação celular para célula em mitose. Adaptado de cientific.com.

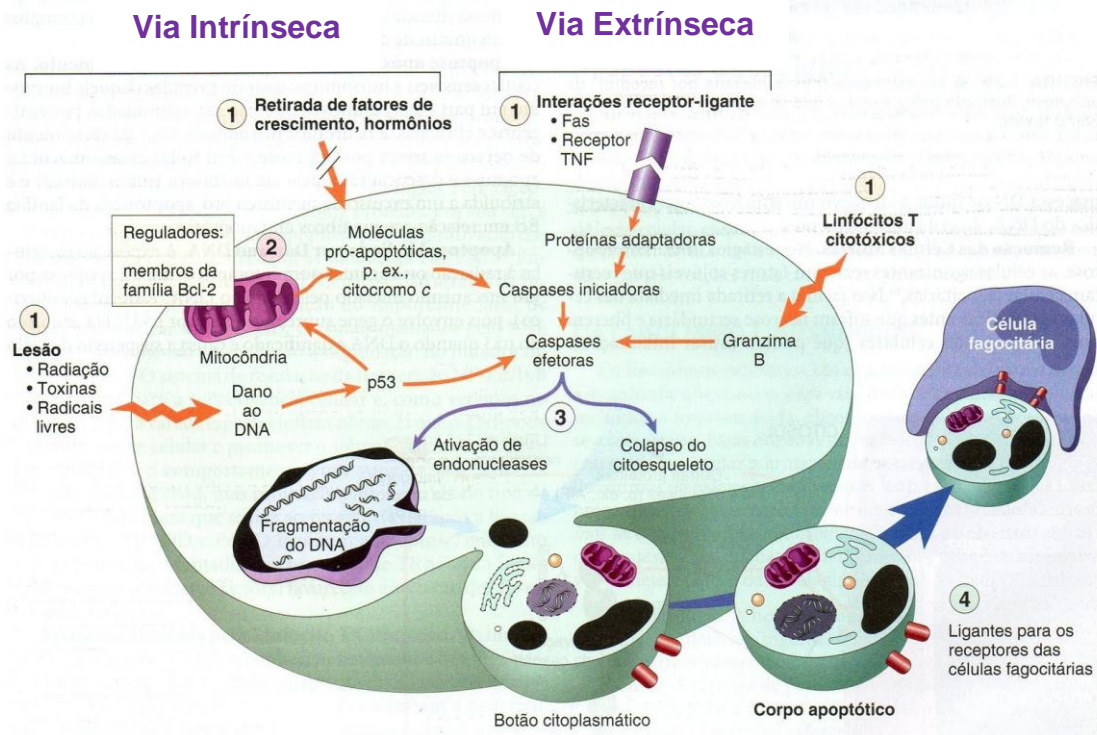
### 2.1.2 Apoptose

A apoptose (morte celular programada) ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na reposição fisiológica de diversos tecidos maduros, na resposta inflamatória e na eliminação de células após o dano celular por agentes genotóxicos<sup>19</sup>. A apoptose pode ser desencadeada por estímulos externos através de receptores de superfície (ditos receptores de morte) ou por estímulos internos de estresse intracelular ou nas vias metabólicas. Essas vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, as quais exercem papel central no processo de morte celular<sup>20</sup>.

O processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de ativação, na qual as caspases se tornam cataliticamente ativas, e uma fase de execução, na qual as enzimas atuam provocando a morte celular (figura 51).

O início da apoptose ocorre por sinais de duas vias distintas, porém convergentes: a via extrínseca ou iniciada por receptores e a via intrínseca ou mitocondrial. Resumidamente, a via extrínseca pode ser ativada por receptores de morte (membros da família de receptores do fator de necrose tumoral-TNF) que contém um domínio citoplasmático, envolvido nas interações proteína-proteína, chamado de domínio de morte. Na via intrínseca a permeabilidade mitocondrial aumenta e são liberadas moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, sem a

participação de receptores de morte<sup>1,22</sup>. A essência da via intrínseca é o equilíbrio entre as moléculas pró-apoptóticas e proteínas que regulam a permeabilidade mitocôndria.



**Figura 39:** Diagrama representativo dos mecanismos de apoptose. Adaptado de Robbins & Cotran<sup>21</sup>.

As caspases são divididas em dois grupos básicos: iniciadoras (caspase-8 e a caspase-9) e efetoras (caspase-3 e a caspase-6), dependendo da ordem em que são ativadas durante a apoptose. Depois que uma caspase iniciadora é ativada, o programa de morte enzimática é iniciado pela ativação rápida e sequencial das outras caspases. Uma vez ativada, a caspase-3 induz a clivagem de ligações peptídicas em substratos importantes tais como: proteína quinase, proteína do citoesqueleto, proteínas relacionadas com o reparo do DNA, subunidades inibitórias de endonucleases. Estes eventos que finalmente levam à destruição das funções celulares vitais, acarretando conseqüentemente ao aparecimento das modificações morfológicas características nas células em processo apoptótico, tais como:

contração do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos<sup>1,23,24</sup>. E, finalmente as células apoptóticas são fagocitadas, geralmente por macrófagos. Os corpos apoptóticos são rapidamente degradados nos lisossomos e as células saudáveis adjacentes migram e proliferam para substituir o espaço ocupado pela célula apoptótica.

## 2.2 Câncer Cervical

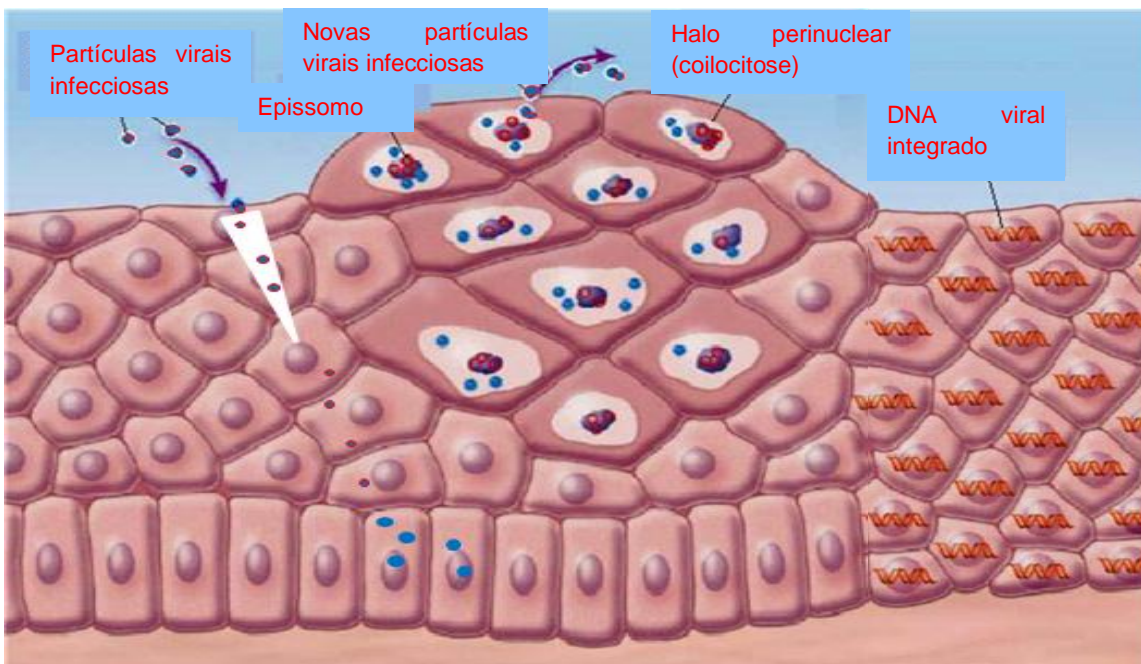
Câncer do colo do útero é a segunda neoplasia mais frequente na população feminina, detendo o Brasil, o terceiro lugar em incidência e a quarta causa de mortalidade. Por ano, faz 4.800 vítimas fatais e apresenta 18.430 novos casos. Prova de que o país avançou na sua capacidade de realizar diagnóstico precoce é que na década de 1990, 70% dos casos diagnosticados eram da doença invasiva. Ou seja: o estágio mais agressivo da doença. Atualmente 44% dos casos são de lesão precursora do câncer, chamada *in situ*, esse tipo de lesão é localizada. Mulheres diagnosticadas precocemente, que se tratadas adequadamente têm praticamente 100% de chance de cura. De acordo com os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou-se 17.540 novos casos em 2012 e 4.986 desde 2010<sup>25</sup>.

A incidência de câncer cervical torna-se evidente na faixa etária entre 20 a 29 anos e o risco aumenta gradualmente com a idade. A etiologia deste tipo de câncer está relacionada à infecção por certos tipos de Papilomavirus Humano (HPV) e a interação entre diversos fatores de risco<sup>26,27,28</sup>.

O papilomavírus humano (HPV) é um agente infeccioso transmitido principalmente por via sexual e sua vinculação com o desenvolvimento de uma variedade de lesões pré-malignas e câncer cervical já é bem estabelecida<sup>29</sup>. Têm sido identificado mais de 100 subtipos de HPV<sup>30</sup> e seus subtipos são classificados em três grupos, de acordo com o potencial oncogênico: de baixo, médio e alto risco. Na carcinogênese cervical por HPV, uma fração significativa de HPV de alto risco integra o seu DNA ao cromossomo do hospedeiro, com perda de E2, superexpressão de oncogenes virais E6 e E7 e instabilidade genômica. Estes

cânceres são tratados com quimioterapia, radioterapia e cirurgia, porém com sucesso limitado (Figura 52).

Embora o HPV seja essencial para a transformação das células epiteliais cervicais, sua presença não é suficiente. Uma grande variedade de eventos moleculares e co-fatores podem influenciar neste processo como por exemplo: cigarro, disfunções no sistema imunológico, número de parceiros, início precoce da atividade sexual, alto número de paridade (relativo a partos normais), uso prolongado de contraceptivos orais e infecção por outro agente transmitido sexualmente como *Chlamydia trachomatis*<sup>26,27</sup>.



**FIGURA 40:** Carcinogênese cervical pelo HPV. Infecção dos queratinócitos pelo HPV e replicação do DNA viral. Adaptado de Goodman, a. & Wilbur<sup>32</sup>.

Os HPVs de alto risco são ligados ao surgimento de 95% dos carcinomas cervicais, tais como os HPV 16 e 18, que são os mais frequentemente detectados<sup>33</sup>. Fatores genéticos, como os genes E6 e E7 estão relacionados às propriedades transformantes dos HPVs de alto risco. Em lesões malignas, associadas ao HPV 16 e 18, o DNA viral permanece integrado ao cromossomo do hospedeiro. Para possibilitar tal integração, ocorre uma quebra no genoma viral, geralmente, nas

regiões E1 e E2 do vírus, com perda das funções destes genes e aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7<sup>34</sup>. As proteínas codificadas por estes genes interferem na atividade inibitória do crescimento celular exercido pelos genes supressores de tumor<sup>35</sup>. A oncoproteína E6 leva à degradação e inativação do produto do gene supressor de tumor p53, inibindo apoptose, e a oncoproteína E7 se liga à proteína do retinoblastoma (pRb), a qual inibe a progressão do ciclo celular<sup>36</sup>.

O mecanismo pelo qual o HPV induz a tumogênese foi sugerido devido a habilidade da proteína E6 de se associar com o supressor de tumor p53<sup>37</sup>. Porém, essa degradação da proteína p53 parece não ser o único mecanismo pelo qual a proteína E6 inibe a apoptose. Howie e colaboradores em 2009<sup>38</sup> avaliaram em seu estudo outro mecanismo no qual o HPV induz a tumogênese. Para isso, foram utilizadas células que não expressam a proteína p53 e observou-se que E6 inibe esse processo por uma via independente, bloqueando e degradando proteínas chaves das vias intrínsecas e extrínsecas das caspases. Sendo assim, a proteína E6 é responsável por prevenir a morte celular, bloqueando outros mediadores intrínsecos envolvidos na apoptose além da p53.

O processo de apoptose é muito importante para eliminar dano celular, crescimento aberrante e células infectadas por vírus, que poderiam ser uma ameaça à sobrevivência de um organismo. Acredita-se que defeitos neste processo, tem uma função tanto no desenvolvimento de malignidade quanto na resistência à quimioterapia<sup>39</sup>. Enquanto a redução da apoptose está relacionada com o carcinoma cervical, seu aumento tem sido observado em lesões intra-epiteliais precursoras desta patologia<sup>40</sup>.

Tem sido descrita em cultura de células que a proteína E6 do HPV apresenta atividade anti-apoptótica, esta proteína pode também induzir ou sensibilizar as células a apoptose<sup>37</sup>. Esse efeito contraditório parece estar relacionado com a presença de isoformas da proteína E6, conhecidas por E6\*, que apresentam uma cadeia proteica menor e que podem interagir com E6 e formar complexos com novas funções. Os principais fatores que irão determinar o efeito final na célula, proteção ou sensibilização a apoptose são, o nível da expressão da proteína E6 e a relação entre E6 e suas isoformas (E6\*). O mecanismo pelo qual a célula se torna sensível a

apoptose parece ser devido à ligação entre E6\* e E6, inibindo, desta forma, a degradação da p53<sup>41</sup>.

A proteína E6 promove alterações na adesão, polaridade e diferenciação celular das camadas epiteliais da epiderme, além de inativar a p53 e bloquear a apoptose. Durante esse processo, a proteína E6 degrada uma série de proteínas importantes para o processo de diferenciação terminal celular a fim de permitir a proliferação celular e consequente replicação viral<sup>38</sup>.

### **2.2.1 Diagnóstico e tratamento do câncer cervical**

As alterações das células que podem desencadear o câncer são descobertas facilmente no exame preventivo (Papanicolou), por isso é importante a sua realização periódica. Papanicolou é o teste mais comum e mais aceito para ser utilizado para detecção precoce do câncer de colo do útero. Esse teste que examina as células coletadas do colo do útero. O objetivo do exame é detectar células cancerosas ou anormais. O exame pode também identificar condições não cancerosas como infecção ou inflamação. Quando essas alterações são identificadas e tratadas, é possível prevenir a doença em praticamente 100% dos casos.

Outra estratégia de prevenção é a vacinação contra HPV. Duas vacinas estão, atualmente, registradas no Brasil, ambas prevenindo contra a infecção pelos dois subtipos oncogênicos mais prevalentes no Brasil e no mundo, os tipos 16 e 18. A vacina tetravalente, que teve seu registro publicado em 2006 que está indicada para mulheres de 9 a 26 anos e previne contra HPV tipos 6, 11, 16 e 18. E a vacina bivalente teve seu registro publicado em 2008 e está indicada para mulheres de 10 a 25 anos de idade para a prevenção contra dois tipos de HPV, 16 e 18. Há evidências de que ambas são seguras e eficazes na prevenção da infecção pelos subtipos incluídos em suas formulações, entretanto, esta eficácia é reduzida quando a mulher já teve contato com o vírus. Apesar de existirem essas vacinas profiláticas (preventivas) contra as formas mais perigosas do HPV, elas não conseguem tratar infecções pré-existentes e outras lesões associadas ao micro-organismo, por isso a

necessidade da pesquisa de uma terapêutica que combata o tumor já existente e lesões pré-cancerosas.

O câncer cervical apresenta várias etapas de evolução, e em coerência, os tratamentos são definidos levando em consideração alguns fatores como: classificação das lesões do colo, estadiamento dessas lesões, idade das pacientes, desejo de manter fertilidade e condição clínica. O tratamento das pacientes portadoras desse câncer baseia-se na cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sempre dependente das condições clínicas da paciente, do tipo de tumor e de sua extensão. Quando o tumor é inicial, os resultados da cirurgia radical e da radioterapia são equivalentes.

O tratamento cirúrgico consiste na retirada do útero, porção superior da vagina e linfonodos pélvicos. Os ovários podem ser preservados nas pacientes jovens, dependendo do estadiamento do tumor; quanto mais avançado, mais extensa é a cirurgia. O tratamento radioterápico pode ser efetuado como tratamento exclusivo, pode ser feito associado à cirurgia (precedendo-a) ou quando a cirurgia é contra-indicada. Entretanto, apesar do aumento no número de ações de controle do câncer de colo de útero, ainda não estão sendo capazes de interferir no índice de mortalidade. O que indica que o tratamento para os casos diagnosticados precocemente ainda está aquém do se poderia esperar. Assim, ressalta-se a relevância de estudos baseados em ativos vegetais e nanotecnologia para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

### **2.2.2 Produtos naturais como fonte de compostos bioativos.**

Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% dos fármacos em uso clínico no mundo, além disso, aproximadamente 1/3 dos fármacos aprovados pela Food Drugs Administration (FDA) utilizados na medicina convencional tem sua origem de plantas<sup>42</sup>. O fator limitante para a utilização terapêutica dos fitomedicamentos no tratamento convencional das diversas doenças é a falta de dados científicos que comprovem sua eficácia e a segurança, frente a

isso, a busca por essas informações aumentou consideravelmente<sup>43</sup>. Apesar das grandes indústrias farmacêuticas darem preferência pelo desenvolvimento de medicamentos sintéticos, observa-se, nas últimas décadas, um grande interesse do mercado pelo potencial terapêutico das plantas medicinais<sup>44</sup>. O crescente interesse na pesquisa de produtos naturais para atividade farmacológica tem demonstrado que plantas representam uma fonte potencial de novos agentes. A terapia tradicional está se encaminhando para uma crise devido ao rápido desenvolvimento de resistência ou inatividade aos agentes existentes, o que aumenta consideravelmente a procura por novas e eficazes substâncias com atividade e baixa toxicidade.

A busca por agentes antitumorais a partir de fontes vegetais começou em 1950 com a descoberta dos alcalóides da vinca (vimblastina e vincristina). Com isso, em 1960, o United State National Cancer Institute (NCI) deu início a um amplo programa de coleta de plantas. Nesse contexto, essa busca por novos compostos bioativos vêm apresentando grandes dimensões, e apresentando resultados positivos. Como resultado dessa busca incessante de novos fármacos, pode-se mencionar medicamentos originários de plantas mais promissores no tratamento de câncer, os taxanos e camptocinas<sup>45</sup>.

Dentre os produtos naturais, daremos enfoque ao limoneno, um terpeno abundante em países tropicais e reconhecido como um potencial agente quimioterapêutico. Estudos que avaliaram a atividade do limoneno e seus metabólitos, o efeito sobre o ciclo celular e a viabilidade em várias linhas de células cancerosas demonstraram que esses terpenos têm o efeito de reduzir a regulação da expressão de Bcl-2 (um regulador importante da via de apoptose mitocondrial), que impedem a formação de poros em apoptose mediada pela proteína BAX. Bcl-2 é frequentemente superexpressa em células cancerosas. A regulação negativa da expressão de Bcl-2 e a regulação positiva de BAX conduz à liberação de citocromo c no citosol ativando assim o mecanismo apoptótico regulado pela caspase-9 e caspase-3, esta série de eventos resulta em apoptose.

Dados recentes relatam outro possível mecanismo que permite D-limoneno para induzir a via de morte mitocondrial. O composto é relatado por inibir a via



PI3K/Akt/mTOR (frequentemente mais ativada no câncer, permitindo a proliferação e prevenindo a apoptose) levando assim a ativação da BAD (Bcl-2, associada a promotor de morte celular), uma proteína que promove a apoptose e bloqueia proteínas anti-apoptóticas<sup>46</sup>. A inibição da via PI3K/Akt/mTOR por D-limoneno é relatado para ser dependente da dose. Este mecanismo de ação tem sido relatada em diferentes tipos de câncer, em particular em células de leucemia, em células de câncer de cólon (LS174T) e mesmo em células de câncer de mama. Além disso, o limoneno diminuiu os níveis de p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) e p-GSK-3 $\beta$  (Ser9), sugerindo que a apoptose induzida pelo terpeno ocorreu através da via mitocondrial e morte a supressão da via PI3K/Akt<sup>46</sup>.

Os fenômenos acima relatados são principalmente devido aos efeitos do limoneno sobre a activação da via de sinalização RAS. O processamento da proteína RAS requer uma farnesilação final ou geranylgeranilação em um resíduo de cisteína para obtenção de uma proteína funcional. Mutações desse bloco do resíduo da cisteína influenciam na atividade de RAS. Tal reação de farnesilação ou geranylgeranilação é feito por duas enzimas: farnesiltransferase (FT) e geranylgeranyltransferase 1 (GGT1). Ambas as enzimas partilham uma subunidade funcional chamado FNT $\alpha$ , tal proteína é clivada pela caspase-3 durante a apoptose, sugerindo que um tipo de sinal pode induzir apoptose por indiretamente inibir a prenilação de proteínas envolvidas na sobrevivência e proliferação celular.

O limoneno e o ácido perílico têm sido referidos como sendo inibidores de farnesiltransferase e geranylgeranyltransferase 1 impedindo assim a prenilação e subsequente ativação da RAS e suas cascatas de sinalização relacionadas<sup>47,48</sup>. Um grupo de pesquisadores do Hospital Infantil St. Jude Research em Memphis, EUA, está trabalhando sobre a hipótese de que esses compostos ocupam uma bolsa hidrofóbica das enzimas preniltransferases, conseqüentemente, bloqueando a sua actividade. Além disso, é relatado que esses dois terpenos afetam a via do mevalonato de diferentes maneiras: interferindo na produção de farnesil-PP e geranylgeranyl-PP e, por conseguinte, na produção de proteínas preniladas (não só RAS). Na realidade os dados recentes propõe que o ácido perílico e também o limoneno tem a capacidade de modular a expressão dos genes, a eficiência da

tradução e também processamento pós-traducional da coenzima A redutase 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG-CoA redutase)<sup>47</sup>. Há evidências de uma redução da atividade HMG-CoA redutase em células expostas ao ácido perílico e limoneno.

Porém, as terapias para o tratamento de câncer são de um modo geral, as mesmas que se utilizam desde há 40 anos e consistem basicamente em dissecação cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia. Estas terapias têm uma eficácia limitada, altos níveis de citotoxicidade e vários efeitos secundários indesejados. Adicionalmente, a natureza da doença é tal que, a menos que se destruam todas as células do câncer, as hipóteses de reincidência são elevadas e normalmente estão associadas a tumores mais agressivos e resistentes à terapia. Na literatura encontram-se um vasto número de trabalhos envolvendo as nanopartículas poliméricas e as doenças em questão, sendo eles com o intuito de tratamento baseados na capacidade que esses nanossistemas apresentam em reduzir a toxicidade e potencializar a atividade biológica.

### **2.3 Nanopartículas poliméricas e suas aplicação antitumoral.**

As nanopartículas poliméricas apresentam grande importância na área farmacêutica em virtude de serem sistemas coloidais que possuem interessantes propriedades físico-químicas, tais como o tamanho reduzido, ampla área superficial, carga superficial, que as tornam eficientes sistemas para aplicação na liberação controlada de fármacos.

As nanopartículas são constituídas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Os nanossistemas constituídos por polímeros biodegradáveis têm atraído maior atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento. As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais, carreadores de fármacos, que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm<sup>49,50</sup>. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a organização estrutural e composição. As nanocápsulas são sistemas reservatórios, constituídos por um núcleo oleoso envolto por um invólucro polimérico. Por outro lado, as

nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são sistemas matriciais formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido.

Muitos fármacos antitumorais apresentam sua eficácia comprometida pela baixa especificidade e toxicidade apresentada. A fim de abordar essas questões, pesquisadores têm explorado o uso de ácido fólico como alvo específico para aumentar a especificidade da quimioterapêutica, visto que as células cancerosas superexpressam os receptores de folato. Foi desenvolvido para isso nanopartículas poliméricas de L-tirosina polifosfato decoradas com PLGA-PEG conjugado com ácido fólico e testadas sob fluxo fisiológico simulado. As nanopartículas decoradas com ácido fólico apresentaram uma fixação 10 vezes maior em células HeLa, uma linha celular de câncer cervical, em relação ao controle de nanopartículas e em fibroblastos dérmicos humanos. Os autoras acreditam que essas interações do alvo nanopartículas para *HeLa* são provavelmente o resultado de uma ligação ligante-receptor. Para comparar foi desenvolvido um estudo de competição com o ácido fólico livre e observou-se que inibiu a fixação de nanopartículas<sup>51</sup>.

Muitos agentes quimioterapêuticos largamente utilizados têm sido testados em conjugados com ácido poli-glicólico, tendo mostrado resultados promissores. Exemplos destes agentes conjugados com ácido poli-glicólico são, o paclitaxel e a camptotecina, que se encontram em ensaios clínicos.

Mei e colaboradores em 2012<sup>52</sup> sintetizaram um copolímero dibloco biodegradável, TPGS-*b*-(PLA-*ran*-PGA). O succinato de D- $\alpha$ -tocoferil polietilenoglicol (TPGS) é um PEG solúvel em água, de origem natural, derivado da vitamina E. As nanopartículas desenvolvidas com esse copolímero contendo docetaxol foram testadas *in vitro* em células *HeLa*. Os resultados demonstraram que as nanopartículas TPGS-*b*-(PLA-*ran*-PGA) foram biocompatíveis e o docetaxol nanoencapsulado apresentou citotoxicidade significativa contra as células cancerosas. A citotoxicidade contra as células HeLa com nanopartículas (TPGS-*b* PLA-*ran*-PGA) foi tempo e concentração dependentes. Em conclusão, o copolímero TPGS-*b*-(PLA-*ran*-PGA) pode ter atuado como uma matriz polimérica biocompatível potencial aplicáveis em sistemas nanoestruturados para a quimioterapia do câncer.

Esse mesmo grupo de pesquisa desenvolveu outras nanopartículas com copolímeros, como (PCL-PLA-TPGS) para avaliar também a atividade citotóxica do docetaxol *in vitro* em células *HeLa*. A absorção celular e citotoxicidade *in vitro* das formulações de nanopartículas foram comparadas com a formulação comercial Taxotere®. Nos experimentos de viabilidade celular observou-se pelo IC<sub>50</sub>, que a formulação de nanopartículas PCL-PLA-TPGS foi mais eficaz na redução do número de células do que o Taxotere® após 48 h (p <0,05) e 72 h (p <0,05 ) de tratamento.

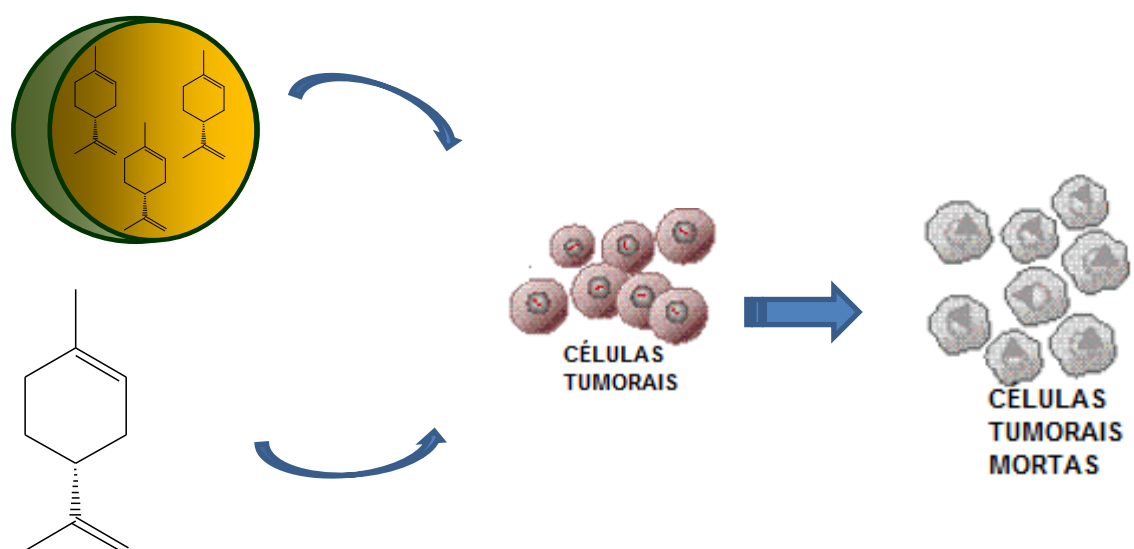
Dessa forma esse capítulo versa sobre o desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica *in vitro* de nanocápsulas contendo limoneno frente ao câncer cervical. As nanocápsulas foram escolhidas como vetores para administração de compostos e potencializadores da atividade.

### 3. HIPÓTESE DO TRABALHO E OBJETIVOS

Considerando o exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade biológica do limoneno livre e nanoencapsulado em ensaios *in vitro* com células cancerosas *SiHa*, linha celular de câncer cervical.

#### A hipótese do trabalho desse capítulo

A incorporação de limoneno em nanopartículas poliméricas potencializaria a atividade antitumoral.



**Figura 41:** Hipótese de trabalho desse capítulo envolve a incorporação de limoneno em nanopartículas poliméricas que potencializa a atividade antitumoral.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

- ❖ Substâncias ativas: *Limoneno*
- ❖ Polímero biodegradável: Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)  $\overline{M}_w = 65000 \text{ g.mol}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, França).
- ❖ Tensoativos: lipofílico: Span 60<sup>®</sup> (Monoestearato de sorbitano) (Sigma-Aldrich, Brasil) e hidrofílico: Tween 80<sup>®</sup> (Polissorbato 80) (Delaware, Brasil).
- ❖ Fase oleosa: Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (Brasquim, Brasil).

### 4.2 Aparelhos e Equipamentos

- ❖ Evaporador rotatório (Büchi - Alemanha);
- ❖ Bomba de vácuo V-500 (Büchi Vac<sup>®</sup> - Alemanha);
- ❖ Potenciômetro Denver<sup>®</sup> Instrument VB-10 (Nova Iorque);
- ❖ Agitador Certomat MV (Vitaris – Alemanha);
- ❖ Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Laboratório K213- Instituto de Química- UFRGS):
  - Injetor S-200 (Perkin-Elmer – Estados Unidos);
  - Detector UV-VIS S-200 (Perkin-Elmer – Estados Unidos);
  - Bomba S-200 (Perkin-Elmer – Estados Unidos);
- ❖ Difractometria de laser (Mastersizer 2000<sup>®</sup>, Malvern, UK)
- ❖ Espectrômetro de correlação de fótons - Zetasizer nanoseries - modelo ZEN 3600 (Malvern Instruments – Reino Unido);
- ❖ NanoSight LM10 & NTA 2.0 Analytical Software, NanoSight Ltd.
- ❖ Banho Termostatizado (Ika - Brasil);
- ❖ Turbiscan LAb (Formulacion - França);
- ❖ Viscosímetro vibracional (MODELO AED-SV 10 Série)

### 4.3 Solventes e outros materiais

- ❖ Acetonitrila grau CLAE (Tédia, Brasil);
- ❖ Acetona (Nuclear e Quimex, Brasil);
- ❖ Água destilada;
- ❖ Álcool etílico absoluto;
- ❖ Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli-Q<sup>®</sup> - Millipore, EUA);
- ❖ Membrana 0,45 µm (Millipore, EUA);
- ❖ Pré-coluna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (Merck, Alemanha); Coluna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (Merck, Alemanha);

### 4.4 Métodos

#### 4.4.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas

Para a preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas foi utilizado o método descrito previamente<sup>53</sup> baseado na deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1988 *apud* GOVENDER, 1999).

Preparou-se uma fase orgânica contendo 100 mg de poli(*epsilon*-caprolactona) CAPA, 120 mg de triglicérides de cadeia média (TCM), 40 mg de monoestearato de sorbitano, limoneno, 25mg almíscar + sândalo e 27 ml de acetona, a 40 °C. A fase orgânica foi injetada, sob agitação, em uma fase aquosa contendo 90 mg de polissorbatato 80 e 53 ml de água MilliQ<sup>®</sup>, a 40 °C. Após 10 min sob agitação moderada, a acetona foi removida e a suspensão foi concentrada a 10 ml em evaporador rotatório, à 40 °C. Formulação sem limoneno e sem fixadores foi preparada para fins de comparação e formulação contendo fixadores na mesma concentração utilizada na preparação de LNC-Lim.

#### 4.4.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

As nanocápsulas foram caracterizadas quanto ao seu teor de ativo, diâmetro médio da nanopartículas, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, pH,



viscosidade e morfologia. As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 30 dias. Os experimentos foram realizados em triplicatas de lotes.

#### **4.4.2.1 Determinação do tamanho da partícula por difratometria de laser**

As formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro médio de esfera equivalente ( $d_{4.3}$ ) e distribuição de tamanho de partícula (*Span*) por difração de laser empregando o equipamento Malvern Mastersizer® 2000 e água como meio dispersante. O valor de *Span* foi obtido conforme a equação 1,

$$Span = \frac{d_{0.9} - d_{0.1}}{d_{0.5}} \quad (1)$$

onde  $d_{0.9}$ ,  $d_{0.5}$  e  $d_{0.1}$  são os diâmetros cumulativos em volume de 90, 50 e 10 % da população total.

#### **4.4.2.2 Determinação do tamanho da partícula por espalhamento de luz dinâmico.**

As formulações foram avaliadas através do equipamento Malvern ZetaSizer ZS após diluição de 500 vezes (v:v) em água MilliQ® previamente filtrada (0,45 µm). O diâmetro cumulante médio (*Z-average*) e o índice de polidispersão (PDI), resultantes da aplicação do método dos cumulantes, foram medidos num ângulo de detecção de 173° (25°C).

#### **4.4.2.3 Análise de rastreamento de nanopartículas**

A determinação do diâmetro por rastreamento do movimento das partículas (NTA) foi realizado empregando-se equipamento NanoSight LM10, equipado com câmara porta-amostra acoplada a laser de 640 nm. As formulações foram diluídas 10000 vezes (v:v) em água MilliQ® e injetadas na câmara com seringa de vidro. As

amostras foram medidas durante 30 s empregando ajuste automático de ganho e *shutter*. Os dados foram capturados através de câmera de vídeo e analisados com *software* NTA 2.2 Build 0380. O *software* identifica e rastreia nanopartículas individuais sob movimento browniano e relaciona o movimento com o raio hidrodinâmico.

#### **4.4.2.4 Análise do pH e viscosidade**

A determinação do pH foi realizada logo após a preparação das formulações e após 15 e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Empregou-se potenciômetro (Denver<sup>®</sup> Instrument VB-10, Nova Iorque) previamente calibrado com padrões pH 4,0 e 7,0 as análises foram conduzidas em triplicata de lotes. As viscosidades das formulações foram realizadas no viscosímetro vibracional (MODELO AED-SV 10 Série). As análises foram desenvolvidas em triplicata de medidas e de lotes em temperatura  $24,7 \pm 0,5$  °C.

#### **4.4.2.5 Potencial zeta**

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através de eletroforese. Essa determinação foi realizada após diluição de 500 vezes (v:v) das suspensões de nanocápsulas em solução de NaCl 10mM previamente filtrada através de membrana 0,45µm. As medidas foram efetuadas em triplicata.

#### **4.4.2.6 Estabilidade físico-química**

Para estudar a estabilidade das formulações foram monitorados diâmetro e pH dos ativos presentes nas suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 15 e 30 dias. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e do calor.

#### **4.4.3 Doseamento dos ativos nas suspensões coloidais**

A concentração de limoneno nas formulações foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após dissolução das nanocápsulas em acetonitrila e subsequente filtração (0,45  $\mu$ m). O sistema consistiu de uma bomba e um autoinjeter Perkin-Elmer® S200 Perkin-Elmer e uma coluna Merck® LiChrospher 100 RP-18. Empregou-se uma fase móvel contendo acetonitrila:água (90:10 v/v), fluxo de 0,7 ml/min e detecção em 213 nm. A metodologia foi validada em termos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação de acordo com os códigos oficiais<sup>60,61</sup>.

#### **4.4.4 Determinação das taxas de associação<sup>54</sup>**

A concentração de ativo associado às nanocápsulas foi desenvolvida por CLAE, levando em consideração a diferença entre a concentração total de limoneno na suspensão coloidal e a concentração presente na fase aquosa da suspensão. A determinação do ativo livre, presente na fase aquosa da suspensão, foi determinada através do método de ultrafiltração-centrifugação das suspensões. Para isso fez-se uso de membranas Microcon®, Millipore 10.000 Da, durante 15 minutos a 5000 rpm, obtendo-se 40 $\mu$ l de ultrafiltrado, no qual o ativo foi quantificado de acordo com o método analítico já descrito.

#### **4.4.5 Atividade antitumoral do limoneno livre e nanoencapsulado**

##### **4.4.5.1 Linhagem celular e condições de cultivo**

As linhagem celular de carcinoma cervical humano, SiHa (HPV 16-positivo) (ATCC - American Type Culture Collection Rock-ville, MD) foi mantida em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e com 0,5 U/ml dos antibióticos penicilina/estreptomicina. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37 °C.

#### 4.4.5.2 Preparação das amostras

O limoneno e as suspensões de nanocápsulas (LNCs) foram preparados com 1% de DMSO, obtendo-se uma concentração final máxima de DMSO por poço de 0,2% durante os tratamentos.

#### 4.4.5.3 Avaliação da Viabilidade Celular- Ensaio de MTT

A linhagem celular SiHa ( $5 \times 10^3$ ) foi cultivada em placas de 96 poços, em um volume final de 200  $\mu$ l, e após atingir semiconfluência, foi tratada com limoneno e LNCs, nos tempos de 24 e 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), o qual foi adicionado ao meio de incubação a concentração final de 0,5 mg/ml. As células foram incubadas por 180 minutos a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. O meio foi então removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO, sob agitação por 10 minutos. A densidade óptica foi medida em leitor de placas Envision (PerkinElmer), nos comprimentos de onda de 630 nm e 560 nm. Como substâncias de referência, foram utilizadas a cisplatina, na concentração de 100  $\mu$ M. Foram realizados dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle negativo contendo o veículo DMSO, representando a viabilidade de cada tratamento. Esta absorbância foi proporcional ao número de células vivas com mitocôndrias ativas. A viabilidade celular foi calculada usando a equação.

$$\text{VIABILIDADE CELULAR (\%)} = (\text{Abs}_s / \text{Abs}_{\text{controle}}) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $\text{Abs}_s$  é a absorbância das células tratadas com diferentes concentrações de ativos ou formulações e  $\text{Abs}_{\text{controle}}$  é a absorbância das células de controle (incubadas apenas com meio de cultura celular).

#### 4.4.5.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados estatisticamente por Análise da Variância (ANOVA) seguidos de *post test* Tukey.  $P < 0,05$  foram considerados como indicativo de significância. Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados por análise de regressão linear de  $\log_{10}$  viabilidade de células versus  $\log_{10}$  da concentração. Os valores foram comparados utilizando-se análise e teste de Tukey para simultânea comparações entre grupos.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3 Validação do método de quantificação por CLAE

A necessidade de demonstrar a qualidade do doseamento de compostos está cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem gerar resultados errôneos e prejuízos irreparáveis, sejam eles financeiros ou biológicos. Para garantir que o novo método analítico gere informações interpretáveis e confiáveis da amostra, deve-se proceder o processo de validação. Validação tem por objetivo demonstrar que o método analítico desenvolvido pode ser aplicado para a finalidade pretendida. A quantificação do limoneno foi realizada por CLAE-UV.

O método analítico validado para o composto **1** foi considerado linear na faixa de 5 a 75 µg/mL ( $r=0,999$ ). Um método analítico linear indica que o aumento da concentração do analito é diretamente proporcional com os resultados obtidos experimentalmente dentro de um intervalo definido<sup>60,61</sup>. O método se mostrou específico (uma vez que não foram observados picos no mesmo tempo de retenção no cromatograma da nanocápsula branca).

A precisão intra-dia demonstra a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo analista e mesma instrumentação em um curto espaço de tempo, já a precisão inter-dia avalia a concordância dos resultados obtidos em dias diferentes. As análises de exatidão indica a proximidade dos resultados obtidos em comparação com o verdadeiro. Análises de precisão e exatidão demonstraram desvio padrão relativo abaixo de 2% e o percentual de recuperação variou entre  $97,4 \pm 1,34$  a  $103,7 \pm 0,22$ .

O resultado do doseamento de teor de limoneno nas formulações, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, correspondeu a  $0,488 \pm 0,7$  mg/mL, demonstrando que houve uma retenção significativa do limoneno na nanoestrutura com a adição do sândalo e almíscar. A seguir serão discutidos os possíveis fatores que influenciaram nesse resultado.

## 5.1 Desenvolvimento das nanocápsulas

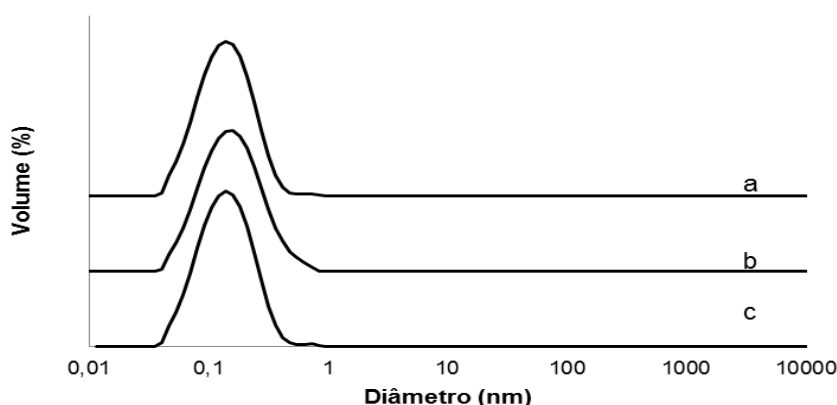
As nanocápsulas de núcleo lipídico foram desenvolvidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, contendo limoneno, apenas fixadores e nenhum ativo. Essas formulações serão cognominadas a partir desse momento como LNC-lim, LNC-Fix e LNC-Blank, respectivamente.

## 5.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas

Análise visual das suspensões de nanocápsulas após a preparação, demonstrou formulações com aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente. Além de reflexo azulado, resultante do movimento browniano das nanopartículas em suspensão.

### 5.2.1 Distribuição de tamanho de partícula

Nos estudos de caracterização das nanoestruturas, análises feitas por difratometria de laser demonstraram que todas as formulações apresentaram distribuição de tamanho monomodal e nanométrica nos três lotes, sem a presença simultânea de micropartículas. Estes resultados indicam que as nanocápsulas apresentam-se homogêneas quanto à distribuição do tamanho, como observado pelo baixo valor de *Span*. As análises por difratometria de laser está representada na figura 54, o índice de refração utilizado foi 1,59, referente ao poliestireno látex.



**Figura 42:** Distribuição do tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas. A) LNC-BLANK; B) LNC-LIM; C) LNC-FIX



O diâmetro de esfera equivalente ( $d_{4.3}$ ) em percentual de volume das formulações foi de 0,143  $\mu\text{m}$ . Os diâmetros cumulativos em volume de 50 % da população total ( $d_{0.5}$ ) para todas as formulações mantiveram-se aproximadamente na mesma faixa de tamanho, de 0,126  $\mu\text{m}$  (LNC-Fix) a 0,127  $\mu\text{m}$  (LNC-Lim). Os valores de *Span* foram inferiores a 2,0 (Tabela 16).

**Tabela 10:** Distribuição de tamanho de partícula das nanocápsulas por difração de laser (n = 3).

Formulação	$d_{4.3}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.9}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.5}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{0.1}$ ( $\mu\text{m}$ )	<i>Span</i> (adimensional)
LNC-blank	0,143±0,02	0,239±0,013	0,127±0,009	0,065±0,009	1,6±0,1
LNC-Fix	0,143±0,04	0,240±0,013	0,126±0,009	0,063±0,009	1,4±0,09

E o diâmetro médio encontrado foi compatível aos relatados em outros trabalhos para nanocápsulas preparadas pelo método de nanoprecipitação de polímeros pré-formados<sup>56,57</sup>. Pode-se afirmar que a variação dos diâmetros das nanocápsulas em suspensão é também, influenciado pela viscosidade da fração oleosa, visto que os resultados são coerentes com a diferença macroscópica na viscosidade dos compostos encapsulados.

As formulações foram avaliadas também através de espalhamento de luz dinâmico (tabela 17). A análise da luz espalhada, aplicando-se o método dos cumulantes, resultou em valores de diâmetro (Z-average) na faixa de 155 nm com PDI inferior a 0,12.

**Tabela 11:** Caracterização físicoquímica das nanocápsulas de núcleo lipídico (n= 3).

Formulação	PCS (método dos cumulantes)	
	$d_h$ (Z-ave) (nm)	<i>PDI</i> (adimensional)
LNC-blank	154 ± 09	0,12 ± 0,01
LNC-Fix	158 ± 11	0,04 ± 0,02

A análise de rastreamento do movimento das partículas e a distribuição do tamanho também foram investigadas pelo Software Analítico NTA 2.0 (NanoSight). Esse equipamento fornece informações quantitativa e visual pelo monitoramento em tempo real das mudanças sutis nas características das populações de nanoestruturas. No método NTA, o sistema de dimensionamento da partícula é baseado na dispersão de luz, onde todas as partículas visíveis e cada centro individual de espalhamento de luz é vista como uma partícula individual durante as filmagens. Nesse equipamento, visualiza-se a distribuição das partículas em relação à intensidade, concentração, em 3D e ainda é possível obter um vídeo do movimento browniano das partículas.

### 5.2.2 Demais caracterizações das suspensões de nanocápsulas desenvolvidas

A tabela 18 demonstra as características de pH, viscosidade, potencial zeta, teor e taxa de associação das formulações desenvolvidas com limoneno, fixadores e sem ativos.

Os valores de pH entre 5,51 a 6,37 é condizente com o método de preparação e matérias-primas utilizadas no estudo e não diferiram significativamente após 30 dias de armazenamento das formulações (tabela 3). Esses dados estão de acordo com valores previamente reportados, quando desenvolveram-se nanocápsulas preparadas com poliésteres pelo método de nanoprecipitação<sup>58</sup>.

A viscosidade das suspensões apresentou um valor próximo a viscosidade das formulações já desenvolvidas pelo autor.

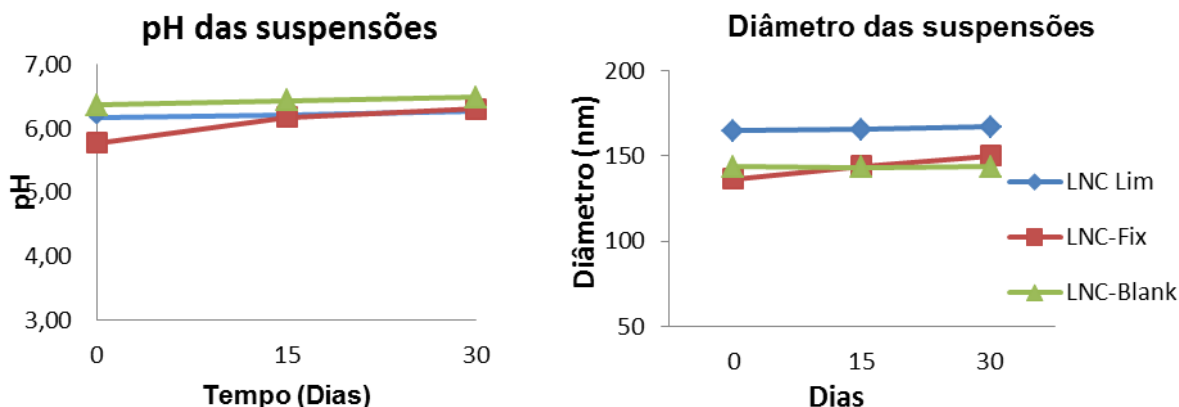
Por fim, a análise do Potencial  $\zeta$ , que reflete o potencial de superfície das partículas. Os valores de LNC-Fix e LNC-blank foram próximos, em módulo, - 8,32 mV e - 8,19 mV. O valor do potencial  $\zeta$  obtido foi próximo de zero, valores adequados para evitar a agregação das gotículas já que foram preparadas com tensoativo não-iônico, como o polissorbato 80, com mecanismo de impedimento estéreo<sup>53</sup>. Ou seja, obteve-se potencial zeta com valores (em módulo) menores, mas isso não representa instabilidade do sistema<sup>59</sup>.

**Tabela 12:** Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após a preparação (n = 3).

Formulação	pH	Viscosidade (mPas)	Potencial $\zeta$ (mV)	Teor (mg/mL)	Taxa de associação (%)
LNC-blank	5,51 ± 0,1	1,01 ± 0,013	-8,13 ± 0,09	-	-
LNC-Fix	6,37 ± 0,8	1,03 ± 0,011	-8,32 ± 0,11	-	-

### 5.2.3 Estudo de estabilidade

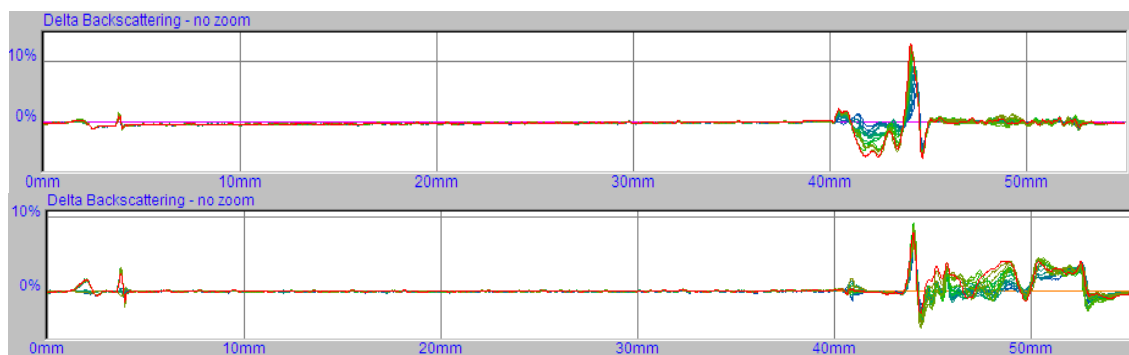
O estudo de estabilidade efetuado com análise de pH e diâmetro está representado nos gráficos abaixo. O pH da formulação LNC-Lim não variou durante os dias, já o pH das demais formulações apresentaram uma leve tendência ao aumento, porém sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo zero e 30 dias (figura 55).



**Figura 43:** Diâmetro e pH médio das suspensões durante o armazenamento.

Análise por espalhamento múltiplo de luz é capaz de demonstrar possíveis fenômenos de desestabilização reversíveis (cremagem e sedimentação) e irreversíveis (coalescência e segregação) sem diluição da amostra. Nesse estudo, o gráfico de transmissão apresentou variação de transmissão inferior a 0,2% devido a isto, somente o gráfico do retroespalhamento será apresentado. Na figura 56 é possível ver as análises gráficas referente à variação de backscattering das formulações. A parte esquerda do gráfico refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo.

Na análise por espalhamento múltiplo de luz das nanocápsulas pode-se observar, de maneira geral, que os fenômenos de instabilidade na base e no topo da célula de vidro foram inferiores a 2% e dentro dessa faixa de variação há estabilidade física no sistema. Já, variações acima de 10% são representativos de uma formulação instável. O pico negativo no topo da cubeta e o positivo na base corresponde a uma ligeira cremagem ou processo de sedimentação. Sabe-se que essas suspensões coloidais apresentam intrinsecamente instabilidades físicas consideradas aceitáveis e características.

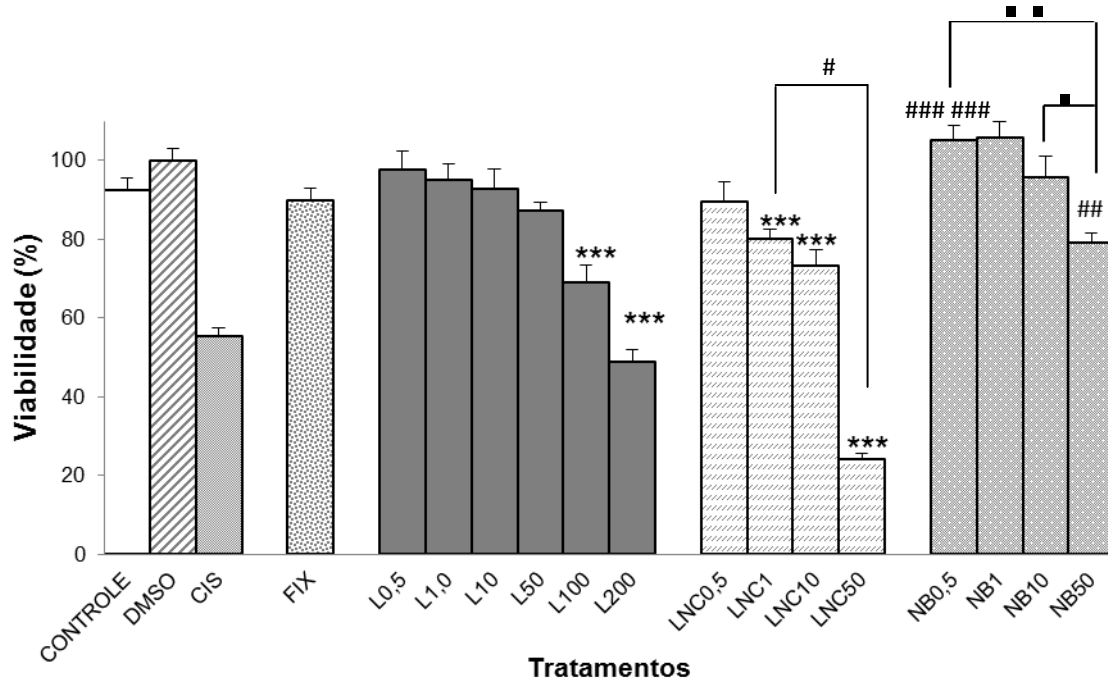


**Figura 44:** Análise por espalhamento múltiplo de luz das suspensões de nanocápsula. A) LNC-FIX; B) LNC-BLANK.

#### **5.4 Avaliação da viabilidade celular em células tumorais humanas-SiHa tratadas com limoneno livre e carregado em nanocápsulas de núcleo lipídico.**

Para investigar o efeito de nanocápsulas contendo limoneno sobre a viabilidade das células, utilizou-se o ensaio de MTT, que mede a atividade mitocondrial e, indiretamente, a viabilidade celular das células tratadas com estas formulações/ativo. As células em cultura foram tratados com várias concentrações (0,5, 1,0, 10, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) de limoneno em solução ou (0,5, 1,0, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ) nanoencapsulado por 24 e 48h. Para abordar o efeito de exposição de longa duração de formulações de nanocápsulas, as células foram tratadas com a solução ou formulações de nanocápsulas nos períodos de 24 e 48h. Os resultados mostraram que nesses períodos, os efeitos foram significativamente semelhantes, ou seja, não houve diferença significativa entre os resultados de proliferação celular, visto isso, os ensaios foram continuados com o período menor, 24h. Os tratamentos efetuados foram denominados da seguinte forma, um código (letra) referenciando o tratamento, seguido de um número que diz respeito a concentração utilizada, por exemplo: tratamentos com a soluções de limoneno foram chamados de L0,5, L1, L10, L50, L100 e L200. Formulação de nanocápsulas contendo limoneno foram chamadas de LNC0,5 a LNC50, e as formulações de nanocápsulas sem ativos, NB 0,5 a NB50.

Análise do ensaio de MTT mostrou que não houve diferença significativa entre os resultados da viabilidade celular obtidos com o controle (células sem tratamento) e tratamento efetuado com DMSO 1,0%, denominado a partir desse momento de CDMSO 1% (figura 57).



**Figura 45:** Efeito do limoneno em solução ou das formulações de nanocápsulas sobre a proliferação de células de câncer cervical. Os valores são representados pelas médias  $\pm$  dp de dois independentes experimentos efetuados em quintuplicata. o número médio de células no controle cdms0 1% (100%) foi de aproximadamente 200 células (SIHA). Os dados foram analisados por anova seguido de *post-hoc* de comparações (teste de tukey). \*\*\* Significativamente diferente do grupo controle cdms0 1% ( $p < 0.05$ ); # Significativamente diferente do respectivo grupo tratado com o composto em solução ( $p < 0,05$ ). ## Significativamente diferente da solução de limoneno 0,5  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ); ### Significativamente diferente da solução de limoneno 50  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ); . Significativamente diferente da LNC 10  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ) e .. Significativamente diferente da LNC 10 e 50  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ).

DMSO na concentração de 1,0% foi utilizado como solvente para a preparação das amostras a serem testadas. Além disso, os demais resultados foram calculados com base no valor da viabilidade obtido com CDMSO1%, correspondendo 100%. O resultado de CDMSO1% demonstrou diferença

significativa quando comparado a viabilidade celular da cisplatina, fármaco de referência e esse resultado mostrou coerência com os dados encontrados na literatura. Além disso, concentrações de 0,5 a 50  $\mu\text{M}$  de limoneno em solução não apresentaram diferença significativa em relação ao controle de DMSO. Já, nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  uma diferença significativa foi observada.

A relação entre o CDMSO1% e as LNCs contendo limoneno demonstrou que não houve diferença significativa nos resultados obtidos entre as concentrações 0,5 a 1,0  $\mu\text{M}$  do terpeno, ou seja, a inibição da proliferação celular foi considerável na concentração acima de 10  $\mu\text{M}$  de limoneno nanoencapsulado, demonstrando assim, o pronunciamento da atividade com o aumento da concentração de nanocápsulas contendo limoneno.

É importante notar que a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de nanocápsulas contendo limoneno já é suficiente para provocar um efeito antiproliferativo de forma significativa em células de câncer cervical. Um achado importante do presente estudo é que o efeito das nanocápsulas contendo limoneno foi mais evidente do que o limoneno em solução nas mesmas concentrações (figura 58 A e B). Observa-se nesse gráfico que a LNC50 apresentou maior atividade no estudo, inclusive quando comparada a cisplatina, o fármaco padrão. Nessa concentração, uma significativa redução da viabilidade celular foi obtida, comparando-se com todos os tratamentos, inclusive com o L50, uma solução de limoneno na mesma concentração. Estes resultados são muito interessantes, indicando aplicação da nanotecnologia apresenta um efeito mais significativo.

A formulação de nanocápsula de limoneno também continha fixadores (almíscar e sândalo), desenvolveu-se ensaios com nanocápsulas contendo apenas fixadores para avaliar se o efeito antiproliferativo era devido a presença dos mesmos na nanoestrutura. Assim, ficou comprovado que esses compostos não apresentam esse efeito, demonstrando que os resultados de viabilidade celular são mérito desse terpeno. As concentrações avaliadas nesse estudo entre a o limoneno livre e as nanoestruturas foram diferentes e isto se deve ao fato que as LNCs foram muito mais ativas que o protótipo, não havendo necessidade de utilizar concentrações mais altas. Todas as concentrações de limoneno contido nas nanocápsulas

causaram redução na viabilidade celular em comparação com os tratamentos livres em cultura de células, sendo que a diferença significativa foi observada nas maiores concentrações, 10 e 50  $\mu\text{M}$ .

O gráfico demonstra a redução da viabilidade celular com o aumento da concentração de limoneno nos tratamentos. Também observamos uma leve redução na proliferação celular com os tratamentos LNC-Blank. Isso é mais evidente quando relata-se os dados dos tratamentos contendo o terpeno, resultado já esperado, visto a atividade antitumoral desse composto já comprovada em outras linhagens celulares<sup>62</sup>.

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  revelou que nanocápsulas de limoneno aumentou 8,8 vezes a citotoxicidade em células SiHa em comparação com o limoneno em solução na mesma linhagem celular (Tabela 19).

**TABELA 13:** Valores de  $\text{IC}_{50}$  de limoneno em solução, formulações de nanocápsulas contendo limoneno e formulações brancas (livres de qualquer ativo) em linhagem de células de câncer cervical (SiHa).

<b><math>\text{IC}_{50}</math></b>	<b>SiHa</b>
<b>Limoneno</b>	189 $\pm$ 2,2 $\mu\text{M}$
<b>LNCLim</b>	21,5 $\pm$ 1,5 $\mu\text{M}$
<b>LNCBlank</b>	> 50 $\mu\text{M}^*$

\*Concentração máxima testada com NB= 50 $\mu\text{M}$ .

A média dos valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) durante 24 h de tratamento com limoneno, nanocápsulas contendo limoneno e nanocápsulas sem ativos por ensaios de MTT, tal como descrito em Materiais e Métodos. Os dados foram analisados por ANOVA seguida pelo *post-hoc* comparações (teste de Tukey).



## 6 CONCLUSÕES

Nesse estudo com o limoneno e nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas e caracterizadas para avaliar a viabilidade celular em células tumorais humanas-SiHa.

As suspensões de nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) contendo limoneno preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado apresentaram perfil manométrico, baixo índice de polidispersão, concentração aceitável de limoneno com o auxílio de fixadores (almíscar e sândalo), além de apresentarem estabilidade físico-química num período de 30 dias.

Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram que o limoneno em solução apresentou atividade antiproliferativa em concentração menor que 200  $\mu$ m, resultado coerente com a literatura para outras células tumorais.

Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo limoneno demonstraram potencializar a atividade desse terpeno, demonstrando IC<sub>50</sub> 8,8 vezes menor do que o ativo livre. Além disso, a suspensão de nanocápsulas contendo fixadores não apresentou atividade antiproliferativa considerável, implicado que a atividade é de responsabilidade do limoneno.

Embora o limoneno não seja um medicamento, e sim um protótipo para, os resultados sugerem que esse terpeno nanoencapsulado seja um potencial candidato para o tratamento de câncer cervical, sendo mais potente do que o ativo em solução. Além disso, é importante notar que os estudos *in vitro* são iniciais e que futuras investigações podem ser úteis para confirmar a efeitos distintos de nanocápsulas contendo limoneno em células normais *versus* células tumorais.



## 7 REFERÊNCIAS

1. KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N., ROBBINS, S.L., CONTRAN, R.S. **Pathology basis of disease**. 7ed. China:WB Saunders, p.1552, 2004.
2. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Site acessado em 20/01/2013: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).
3. MOFFAT, J., HASHIMOTO, M., KOJIMA A., KENNEDY, D.O., MURAKAMI, A., KOSHIMIZU, K., OHIGASHI, H., MATSUI-YUASA, I. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. **Carcinogenesis**, v.21 (12), p. 2151-2157, 2000.
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. Rio de Janeiro: INCA; 2006.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2011**: incidência de câncer no Brasil [acesso 17 jun 2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2011/>
6. ETLINGER, D.L.R., PEREIRA, S.M.M., OIKAWA, K.F., MARIN, A.C., ARAÚJO, R.S., SOUZA, C.J. Campanha de prevenção de câncer cervical: estudos no Instituto Adolfo Lutz mostram a necessidade de avaliação na faixa etária. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**.v.67(1), p. 64-8, 2008.
7. PAIVA, L.C.F., KEMMELMEIER, E.G., SORTI FILHO, A., MELLO, I.C.J., SOUZA, R.J.S., SOUZA, P.C. Lesões cancerosas e pré-cancerosas do colo uterino: uma análise citopatológica na região Noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 41(2), p.147-50, 2009.
8. LUNG, M. S.Y.; MAK, W. M.; MURRAY, V.. The use of a human papillomavirus 18 promoter for tissue-specific expression in cervical carcinoma cells. **Cellular & Molecular Biology Letters**, vol. 16. No. 3. 2011.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Acesso 17 jun 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>
10. HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A.; Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature Review Cancer**. v.2, p.331-341, 2002.
11. Salmonm, S.E. , Katzung, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 629-655, 1998.

12. LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, D. **Biologia celular e molecular**. 4ª edição. Revinter Ltda. 2002.
13. PELÚZIO, M.C.G., VOLP, A.C.P., QUEIROZ, I.C., BRITO, C.J., MIRANDA, T.C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas - Conhecendo seu papel. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 3 (21), p.233-238, 2006.
14. AUDIC, Y., HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer – Review. **Biology of the Cell**, v. 96, p. 479–498, 2004.
15. FARIA, M.H.G., RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene c-myc no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52 (2), p. 165-171, 2006.
16. DE VITA, V.T; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. Ed. 5th, Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1998.
17. WOLF, J.K.; RAMIREZ, P.T. The molecular biology of cervical cancer. **Cancer Investigation**, v, 19, n. 6, p. 621-629, 2001.
18. ZHOU, B -B. S.; ELLEDGE, S. J.; The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**.v.408,p.433-439, 2000.
19. GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53. 335-343, 2007
20. NICHOLSON, D.W., THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22 (8), p.299-306, 1997.
21. ROBBINS & COTRAN - **Bases Patológicas das Doenças**, 7a Ed. Elsevier, 2005.
22. RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
23. SHIOZAKI, E.N; SHI, Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: Mechanisms from structural biology. **Biochemical Sciences**, v.39 (9), p.486-494, 2004.
24. CONTRACT, B. Genetic Control Programmed Cell Death During Animal Development. **Annual Review of Genetics**, v.43, p. 493-523, 2009.
25. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2013: incidência de câncer no Brasil** [acesso 17 jan 2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
26. SANTANA, Ercilia *et al.* Cervical câncer: etiology, diagnosis and prevention. *Revista Arquivos de Ciências da Saúde*, v.15(4):199-204; 2008.
27. ARENDS, M. J.; BUCKLEY, C. H.; WELLS, M.. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. **Journal of Clinical Pathology**, v.51, p.96–103; 1998.

28. MELO, S.C.C.S.. Alterações citopatológicas e fatores de risco para a ocorrência do câncer de colo uterino. **Revista Gaúcha de Enfermagem**. 2009, v.30 (4),p. 602-608. ISSN 1983-1447. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-14472009000400004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-14472009000400004&script=sci_arttext). Acesso em: 06 nov. 2010.
29. LIU, Y., MCKALIP, A., HERMAN, B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.78, p.334–49, 2000.
30. WOODMAN, C. B., COLLINS, S. I., YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews. Cancer**, v.7, p.11–22, 2007.
31. JANEWEY, C.A., WALPORT, P.T.M., SHLOMCHIK, M. Imunologia: o sistema immune na saúde e na doença. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, p.76, 2002.
32. GOODMAN, A., WILBUR, D. C. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p.1555–1564, 2003.
33. RODEN, R., WU, T. C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nature Reviews.Cancer**. v.6, p.753-63, 2006.
34. DUGGAN, M. A. A review of the natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer & Chemotherapy**, v.29, p.176-93, 2002.
35. TJALMA, W. A., ARBYN, M., PAAVONEM, J., WAES, T. R., BOGERS, J. J. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. v.14, p.751-61, 2004.
36. LORENZATTO, M., CAUDROY, S., BRONNER, C., EVRARD, G., SIMON, M., DURLACH, A., BIREMBAUT, P., CLAVEL, C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? **Human Pathology**, v.36, p.1101-1107, 2005.
37. RAPP, L., CHEN, J. J. The papillomavirus E6 proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1378, p.F1–F19, 1998.
38. HOWIE, H. L., KATZENELLENBOGEN, R. A., GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 protein. **Virology**, v.384, n.2, p.324-334, 2009.
39. RODRIGUEZ-NIETO, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, p.4411–25, 2006.

40. CHUNG, T. K.; CHEUNG, T. H.; LO, W. K.; YIM, S. F.; YU, M. Y.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; WONG, Y. F. Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. **Cancer Letters**, v.180, p.63-8, 2002.
41. FILIPPOVA, M., FILIPPOV, V. A., KAGODA, M., GARNETT, T., FODOR, N., DUERKSEN-HUGHES, P. J. Complexes of Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins Form Pseudo-Death-Inducing Signaling Complex Structures during Tumor Necrosis Factor-Mediated Apoptosis. **Journal of Virology**, v. 83, n.1, p.210-227, 2009.
42. BREMER, J. S. Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do Tumor Ascítico de Ehrlich. **Dissertação de Mestrado** - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
43. BRESOLIN, T.M.B., CECHINEL, FILHO, V. (Orgs.). **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.
44. CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciências e Cultura**, v.55 (3), 2003.
45. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p.72-79, 2005.
46. JIA, S.S., GUANG-PENG, X., MING, Z., YAN-BO, C., BO, L., XIN-SHU, D., YAN-MEI, Y. Introduction of apoptosis by limonene is mediated by inactivation of Ask in LS174T human colon cancer cells. **Oncology Reports**. V.29(1), p.349-54, 2013.
47. MO, H., ELSON, C.E. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. v. 229(7), p.567-585, 2004.
48. SEBTI, S.M., HAMILTON, A.D. Inhibition of Ras prenylation: a novel approach to cancer chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**. V.74(1), p.103-14, 1997.
49. BRIGGER, I., DUBERNET, C., COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631 – 651, 2002.
50. REIS, C.P., NEUFELD, R.J., RIBEIRO, A.J., VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drugloaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 2, p. 8 – 21, 2006.
51. Ditto, A.J., Shah, K.N., Robishaw, N.K., Panzner, N.J., Youngs, W.J., Yun, Y.H. The Interactions between L-Tyrosine Based Nanoparticles Decorated with Folic Acid and Cervical Cancer Cells under Physiological Flow. **Molecular Pharmaceutics**. v.9, 3089-3098, 2012.
52. ZHENG, Y., HUANG, L., MEI, L. Docetaxel-loaded TPGS-*b*-(PLA-*ran*-PGA) nanoparticles for cervix cancer treatment. **4th International Conference on Bioinformatics and Engeneering**, 2010.

53. JÄGER, E, VENTURINI, C.G., POLETO, F.S., COLOMÉ, L.M., BERNARDI, A., BATTASTINI, A.M., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v.5, p.130–140, 2009.
54. GUTERRES, S.S. Etude pharmacotechnique et de tolérances digestive et tissulaire des nanocapsules de diclofenac. Paris: Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, 1995. **Tese de Doutorado em Farmácia**.
55. Buffon, A; Wink, M.R.; Ribeiro, B.V.; Casali, E.A.; Libermann, T.A.; Zerbini, L.F.; Robson S.C.; Sarkis, J.J. NTPDase and 5' ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1770(8), 1259-1265, 2007.
56. SIQUEIRA, N.M., CONTRI, R.V., PAESE, K., BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 24, p. 166-174, 2011.
57. ALMEIDA, J.S., LIMA, F., ROS, S., BULHÕES, L.O.S., CARVALHO, L.M., BECK, R.C.R. Nanostructured Systems Containing Rutin: *In Vitro* Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Res Letters** v.5, p.1603–1610, 2010.
58. SCHAFFAZICK S.R., FREITAS L.L., POHLMANN A.R., GUTERRES S.S.: Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos **Química Nova**. v 26, p:726-737, 2003.
59. DURO R., GÓMEZ-AMOZA JL, MARTÍNEZ-PACHECO R, CONCHEIRO A: Adsorption of polysorbate 80 on pyrantel pamoate: effects on suspension stability. **International Journal of Pharmaceutics**. v.165, p.211-216, 1998.
60. ICH Harmonized Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. United States of America, 1996.
61. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Diário Oficial da União: Brasília, 2003.
62. MURTHY, K.N.C., JAYAPRAKASHA, G.K., PATIL, B.S. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. **Life Sciences**. V.9, p. 429–439, 2012.
63. KOUKOURAKIS, M.I. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: Strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p.4301-4308, 2006.





## CONCLUSÕES DA TESE

O óxido de limoneno se mostrou um importante material de partida para a síntese de derivados aminados. As reações químicas se mostraram reprodutíveis e foi possível sintetizar através de protocolos simples e escalonáveis, uma família de amins derivadas do terpeno.

Ensaio da atividade anti-leishmania demonstraram que dentre as moléculas testadas, a grande maioria apresentou valores de  $IC_{50}$  inferior ao do limoneno (protótipo). Além disso, os derivados tosilados, gerados a partir de  $\beta$ -aminoálcoois da propilamina, foram o compostos mais ativos, apresentando três vezes maior citotoxicidade que o protótipo. Foi observado também que não houve diferença significativa na atividade biológica entre os derivados dos diferentes diastereoisômeros (*R*) e (*S*) do óxido de limoneno.

As modificações introduzidas na estrutura química do limoneno conduziram a compostos com atividade anti-leishmania promissora, pelo menos contra as formas promastigotas, comprovando a hipótese de que substituintes sulfonamida podem levar a compostos biologicamente ativos. Também, observa-se que o volume e a natureza hidrofóbica do derivado parece ser importante na atividade dos compostos.

Um método analítico alternativo com o uso da polarimetria para quantificar limoneno em nanoemulsões foi proposto. Essa técnica apresentou ser específica, linear, precisa e exata na faixa de 0,7 a 10 mg/mL. Além disso, a polarimetria é uma técnica com baixo custo, análise rápida e fácil sem necessidade de pré-tratamento da amostra.

Suspensões de nanocápsulas contendo limoneno, seus derivados (LaSOM 08 e LaSOM 28) e/ou chalcona, desenvolvidas com o dobro da fração volumétrica e preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado apresentaram diâmetro menor que 210 nm, índices de polidispersão abaixo de 0,13.

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico com distribuição nanométrica e unimodal em análise na difração de laser demonstraram estabilidade

quanto ao diâmetro médio, polidispersão, pH durante 30 dias armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Utilizando fixadores de perfume foi possível obter nanocápsulas com um aumento expressivo na concentração de limoneno. Essas âncoras moleculares aumentaram de 2 a 20% a permanência desse terpeno na nanoestrutura.

O método analítico de quantificação dos derivados aminados encapsulados foi desenvolvido por CG-MS, demonstrando ser um método linear, preciso, exato, específico e com limites de quantificação e detecção abaixo da curva padrão.

Foi possível incorporar as formulações em hidrogéis de carbômero, os quais apresentaram perfil reológico não-newtoniano e características plásticas. Dentre os quatro modelos, as curvas do fluxo desses géis foram melhor ajustadas pelo modelo de Casson, apresentando maiores valores de coeficientes de determinação.

Nesse estudo, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo limoneno foram preparadas e caracterizadas para avaliar a viabilidade celular em células tumorais humanas-SiHa. As suspensões de nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) contendo limoneno apresentaram perfil nanométrico, baixo índice de polidispersão, concentração aceitável de limoneno com o auxílio de fixadores (almíscar e sândalo), além de apresentarem estabilidade físico-química num período de 30 dias.

Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram que o limoneno em solução apresentou atividade antiproliferativa significativa em concentração menor que 200 $\mu$ M, resultado esse, coerente com a literatura para outras células tumorais.

Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo limoneno demonstraram potencializar a atividade desse terpeno, demonstrando IC<sub>50</sub> 8,8 vezes menor do que o ativo livre. Além disso, a suspensão de nanocápsulas contendo fixadores não apresentou atividade antiproliferativa considerável, implicado que a atividade é de responsabilidade do limoneno.