



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**ESTUDO DE EXTRAÇÃO DE *C. roseus* E PRODUÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS PARA LIBERAÇÃO DE VIMBLASTINA**

MANUEL ALVES FALCÃO

FARMACÊUTICO

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Março, 2016



ESTUDO DE EXTRAÇÃO DE C.ROSEUS E PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA LIBERAÇÃO DE VIMBLASTINA

CANDIDATO: MANUEL ALVES FALCÃO

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DRA. SILVIA STANISÇUASKI GUTERRES - DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS - UFRGS

DRA. FERNANDA BUENO MORRONE - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - PUCRS

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

“Está demonstrado que o que existe não pode ser diferente; porque, tendo tudo sido criado para um fim é para o melhor dos fins.”

Dr. Pangloss

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família.

AGRADECIMENTOS

A todos colaboradores e amigos do Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS pelas amizades realizadas, pelas conversas do dia a dia, pelas ajudas e por propiciarem um ambiente de trabalho/estudo tão saudável. Em especial gostaria de agradecer ao professor Dr. Eduardo Cassel pelas oportunidades que recebi nestes anos, professor Dr. Rubem M. F. Vargas, professora Dra. Aline Lucas, Alexandre Timm do Espírito Santo, Ana Luisa Fianco, Guilherme Evaldt Rossa, Gustavo Franceschini, José Jacques Garcez, Paulo Gandolfi e Rafael Nolibos Almeida.

Agradeço também ao Rodrigo Scopel Silva pela companhia e aventuras no ano que fomos roommates em Los Angeles.

A professora Dra. Andrea Kasko pela oportunidade que tive de fazer parte da sua equipe e a todos que me auxiliaram durante este período.

A todos meus amigos, colegas e familiares, pelas conversas e apoio.

A minha família Fátima J. Alves, Laura A. Falcão, Alessandro M. Rizzo, Guilherme F. Rizzo e a minha namorada Natasha Kuniechick.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
SUMÁRIO	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos	20
3. EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DE VIMBLASTINA A PARTIR DE <i>C. ROSEUS</i>	21
3.1. REVISAO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1.1. <i>Catharanthus roseus</i>	21
3.1.2. Vimblastina.....	22
3.1.3. Fluido Supercrítico	24
3.1.3.1. Extração por Fluidos Supercríticos (SFE).....	26
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.2.1. Materiais.....	29
3.2.2. Obtenção de Extratos de <i>Catharanthus roseus</i> Utilizando CO ₂	29
3.2.2.1. Extração por CO ₂ Supercrítico	29
3.2.3. Identificação e Quantificação de Vimblastina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria Ultravioleta e Espectrometria de Massas	31
3.3. RESULTADOS	32
4. PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA	41
4.1. Sistemas de Liberação Modificada de Fármacos	41
4.1.1. Polímeros Responsivos.....	42
4.1.1.1. Polímeros Responsivos a Estímulos Relativos ao Meio	43
4.1.1.1.1 <i>Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA)</i>	44
4.1.1.2. Polímeros Responsivos a Estímulos Internos.....	46
4.1.1.3. Polímeros Responsivos a Estímulos Externos	47

4.1.2. Nanosistemas no tratamento do câncer.....	48
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.2.1. Materiais.....	51
4.2.2. Produção de Nanopartículas de PLGA	51
4.2.3. Liberação de vimblastina “ <i>in vitro</i> ”.....	52
4.2.4. Determinação de viabilidade celular “ <i>in vitro</i> ”	52
4.2.5. Determinação de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta.....	52
4.3. RESULTADOS	53
5. PROPOSTA DE POLIMERIZAÇÃO DE GLICOPOLÍMEROS A PARTIR DE UM INICIADOR BASEADO EM PLGA.....	59
5.1.1. Polissacarídeos	59
5.1.1.1. Glicopolímeros	60
5.2. Formação de Corona Proteica em Nanopartículas	63
5.3. MATERIAIS E MÉTODOS	64
5.3.1. Materiais.....	64
5.3.2. Monômero Manose Acrilato	65
5.3.2.1. 6-tritil-1,2,3,4-tetraacetato β -manopiranosose	65
5.3.2.2. 1,2,3,4-tetracetato β -manopiranosose	66
5.3.2.3. 6-acriloxi-1,2,3,4-tetracetate β -manopiranosose	66
5.3.2.4. 6-acriloxi manopiranosose	67
5.3.3. Monômero Galactose Acrilato	68
5.3.3.1. 1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose.....	69
5.3.3.2. 6-acriloxi-1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose	70
5.3.3.3. 6-Acrlaxi-1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose.....	70
5.3.4. Síntese do Monômero Glicose Acrilato	71
5.3.4.1. 6-tritil-1,2,3,4-tetracetato Glicopiranosose	72
5.3.4.2. 1,2,3,4-tetracetato Glicopiranosose	73
5.3.4.3. 6-acriloxi-1,2,3,4-tetracetato Glicopiranosose	73
5.3.4.4. 6-acriloxi Glicopiranosose.....	74
5.3.5. Síntese do iniciador baseado em biotina	75
5.3.6. Síntese do iniciador baseado em PLGA	76
5.3.7. Polimerização dos monômeros de açúcares a partir do iniciador baseado em PLGA	77

5.3.7.1. Polimerização dos monômeros de açúcares a partir do iniciador baseado em PLGA em tolueno.....	77
5.3.7.2. Polimerização dos monômeros de açúcares a partir do iniciador baseado em PLGA em DMSO.....	77
5.3.8. Polimerização de Monômeros de Sacarídeos por RAFT	78
5.3.9. Desproteção dos grupos –OH dos polímeros de glicose e manose	79
5.3.10. Desproteção dos grupos –OH dos polímeros de galactose.....	79
5.4. Determinação de Formação de Corona Proteica em Nanopartículas	79
5.4.1. Ressonância Plasmônica de Superfície.....	79
5.4.2. Cromatografia de Permeação em Gel.....	80
5.5. Resultados	80
5.5.1. Síntese dos iniciadores de ATRP.....	80
5.5.1.1. Síntese do iniciador baseado em biotina	80
5.5.2. Polimerizações via ATRP a partir do iniciador baseado em biotina.....	81
5.5.3. Polimerizações via RAFT	81
5.5.4. Análise da formação de corona proteica por SPR	82
5.5.4.1. Síntese do iniciador baseado em PLGA	83
5.5.5. Polimerizações via ATRP a partir do iniciador baseado em PLGA.....	84
6. CONCLUSÕES	88
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	21
Figura 3.2: Estrutura química da vimblastina, C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	23
Figura 3.3: [A] Diagrama de fases do CO ₂ (Adaptado de Taylor, 1996); [B] CO ₂ líquido e gasoso; [C] CO ₂ supercrítico.	25
Figura 3.4: Diagrama do equipamento de extração supercrítica (Adaptado de: Cassel e Rocha, 2008).	27
Figura 3.5: Fluxograma do Equipamento de Extração Supercrítica em Escala Piloto (Cassel et al., 2011). [1] Cilindro de CO ₂ com tubo pescador, [2] trocador de calor, [3] bomba de alta pressão, [4] válvulas de retenção, [5] trocador de calor (aquecimento), [6] válvulas de 3 vias, [7] vaso de extração 100 mL, [8] vaso de extração de 500 mL, [9] vaso de extração 1 L, [10] válvulas de bloqueio, [11] válvulas micrométricas, [12] vasos de expansão, [13] válvulas de segurança, [14] sensor de pressão, [15] vaso de cossolvente, [16] bomba de cossolvente. PT – Transmissor de pressão, TT – Transmissor de temperatura, TC – Controlador de temperatura.	30
Figura 3.6: Cromatograma do extrato obtido utilizando CO ₂ supercrítico a 300 bar e 40° C.....	33
Figura 3.7: Cromatograma do extrato obtido utilizando CO ₂ supercrítico a 300 bar e 40° C com etanol a 2% como cossolvente.	33
Figura 3.8: Curvas de extração de <i>C. roseus</i> utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol 2,0, 5,0 e 9,0 % (m/m) a 300 bar 40° C.	36
Figura 3.9: Curvas de extração de vimblastina utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol a 2,0, 5,0 e 9,0 % (m/m) a 300 bar 40° C.	36
Figura 4.1: Monômeros do PLGA, ácido láctico e ácido glicólico.....	45
Figura 4.2: Mecanismos de degradação e liberação de fármacos de matrizes de PLGA (Adaptado de: Fredenberg <i>et al.</i> , 2011).....	45
Figura 5.1: Exemplos de um glicopolímero e um polissacarídeo.	60
Figura 5.2: (A) Exemplos de agentes de RAFT e (B) mecanismo de polimerização via RAFT. Adaptado de: Moad <i>et al.</i> (2013).....	62

Figura 5.3: Mecanismo de polimerização via ATRP Adaptado de: Peng <i>et al.</i> , 2011	62
Figura 5.4: Esquema da síntese de 6-acriloxi β -manopirranose.	65
Figura 5.5: Esquema da síntese de 6-tritil-1,2,3,4- tetraacetato β -manopirranose. ...	65
Figura 5.6: Esquema da síntese de 1,2,3,4- tetraacetato β -manopirranose.	66
Figura 5.7: Esquema da síntese de 6-acryloxy-1,2,3,4- tetraacetato β -manopirranose.	67
Figura 5.8: Esquema da síntese de 6-acriloxi- β -manopirranose.	67
Figura 5.9: Esquema da síntese de 6-acriloxi galactopirranose.	68
Figura 5.10: Esquema da síntese de 1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopirranose	69
Figura 5.11: Esquema da síntese de 6-acriloxi-1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopirranose	70
Figura 5.12: Esquema da síntese de 6-acriloxi-1,2,3,4-Di isopropilideno galactopirranose	71
Figura 5.13: Esquema da síntese de 6-acriloxi glicopirranose	71
Figura 5.14: Esquema da síntese de 6-tritil-1,2,3,4-tetracetato Glicopirranose.....	72
Figura 5.15: Esquema da síntese de 1,2,3,4-tetracetato Glicopirranose.....	73
Figura 5.16: Esquema da síntese de 6-acriloxi-1,2,3,4-tetracetato Glicopirranose....	73
Figura 5.17: Esquema da síntese de 6-acriloxi Glicopirranose	74
Figura 5.18: Esquema da síntese de iniciador de ATRP baseado em biotina	75
Figura 5.19: Esquema da síntese de iniciador de ATRP baseado em biotina	76
Figura 5.20: Esquema da polimerização via ATRP.	77
Figura 5.21: Esquema da polimerização via ATRP.	78
Figura 5.22: Esquema da polimerização via RAFT.	78
Figura 5.23: Esquema da síntese de iniciador de ATRP baseado em biotina.	80

Figura 5.24: RMN do glicopolímero de galactose obtido por RAFT depois de ser desprotegido e antes de ser desprotegido.	82
Figura 5.25: Esquema da síntese do iniciador baseado em PLGA.....	83
Figura 5.26: RMN do iniciador de ATRP baseado em PLGA.....	84
Figura 5.27: RMN do polímero sintetizado via ATRP antes e depois da desproteção com ácido acético.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Temperaturas críticas (T_c) e pressões críticas (P_c) de diferentes compostos.	25
Tabela 3.2: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por SFE.	34
Tabela 3.3: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração supercrítica com CO_2 e água 2 % (m/m) a 300 bar, 40° C.	34
Tabela 3.4: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração supercrítica com CO_2 e etanol 2 % (m/m) a 300 bar, 40° C.	35
Tabela 3.5: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração supercrítica com CO_2 e etanol 2,0 % (m/m) a 300 bar, 40° C. .	37
Tabela 3.6: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração a alta pressão com CO_2 e etanol 5,0 % (m/m) a 300 bar, 40° C.	37
Tabela 3.7: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração a alta pressão com CO_2 e etanol 9,0 % (m/m) a 300 bar, 40° C	38
Tabela 3.8: Comparativo entre os resultados de extração de vimblastina obtidos por esta tese e outros estudos.	39
Tabela 4.1: Variação de pH em diferentes tecidos do corpo humano.	43
Tabela 4.2: Resultados de rendimento (m/m), tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes nanopartículas de PLGA produzidas.	53
Tabela 4.3: Resultados de liberação de vimblastina por cento em razão do tempo das diferentes nanopartículas de PLGA 8515 200 kDa, PLGA 5050 100 kDa e PLGA 5050 54 kDa produzidas por nanoemulsão.	55
Tabela 4.4: Desvios padrão dos resultados de liberação de vimblastina por cento em razão do tempo das diferentes nanopartículas de PLGA 8515 200 kDa, PLGA 5050 100 kDa e PLGA 5050 54 kDa produzidas por nanoemulsão.	56
Tabela 4.5: Tabela de viabilidade celular de células HEP G2 tratadas com diferentes concentrações de vimblastina e nanopartículas de PLGA contendo vimblastina.	57
Tabela 5.1: Rendimento e conversão dos polímeros obtidos via RAFT.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ATRP	Polimerização por Transferência Atômica Reversível
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC/UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria Ultravioleta
LC/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa
LOPE	Laboratório de Operações Unitárias
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli(ácidos lático-co-glicólico)
PVA	Temperatura de fusão
RAFT	Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação
SFE	Extração por Fluido Supercrítico
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície

RESUMO

FALCAO, Manuel. **Estudo de Extração de *C. roseus* e Produção de Nanopartículas para Liberação de Vimblastina**. Porto Alegre. 2016. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A quimioterapia é opção terapêutica para o tratamento de diversas classes de tumores, principalmente pelos novos nanosistemas de liberação modificada de fármacos. Os nanosistemas de liberação modificada têm como foco a maior seletividade aos tecidos anormais, a diminuição de efeitos adversos, redução da dose e diminuição da frequência de aplicações. Devido a escala destes sistemas, o efeito EPR favorece a permeabilização nos vasos sanguíneos e a retenção de partículas no tecido tumoral. Nesta tese foram realizadas extrações de vimblastina a partir de *C. roseus* utilizando água e etanol como co-solventes de CO₂ a 300 bar e a diferentes temperaturas mostraram a viabilidade do método de extração, posteriormente, as extrações foram otimizadas utilizando etanol. Quando os resultados encontrados são comparados a métodos tradicionais de extração como a extração sólido-líquido o resultado encontrado foi de até 92,41% superior. Concluindo, que a extração de vimblastina utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol a altas pressões é possível. As nanopartículas de PLGA contendo vimblastina demonstraram a reprodutibilidade do método de nanoemulsão garantindo a produção de nanopartículas homogêneas, com e sem fármaco. Os experimentos de viabilidade celular mostraram que as três formulações de nanopartículas de PLGA contendo vimblastina potencializaram a atividade do fármaco para as doses mais baixas, 1 e 5 µg/mL, em relação ao fármaco livre. Os estudos realizados de síntese de glicopolímeros apresentaram a síntese inédita de um iniciador de ATRP baseado em PLGA sem o uso de espaçadores de PEG. Este iniciador pode, em futuros estudos, ser utilizado para a modificação de PLGA. As sucessivas tentativas de polimerização de monômeros de sacarídeos via ATRP em água e DMSO leva a conclusão que esta metodologia não é a mais adequada para sínteses glicopolímeros conjugados a PLGA sem o uso de espaçadores de PEG.

Palavras-Chaves: CO₂ supercrítico, vimblastina, glicopolímeros e nanopartículas.

ABSTRACT

FALCAO, Manuel. **Study of *C. roseus* Extraction and Production of Nanoparticles for Vinblastine Release.** Porto Alegre. 2016. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Chemotherapy is highlighted for the treatment of many classes of tumors, especially by new drug delivery nanosystems. The drug delivery nanosystems are focused on greater selectivity for abnormal tissue, decrease adverse effects, dose reduction and decreased frequency applications. Due to the scale of these systems, the EPR effect favors the permeabilization in blood vessels and retention in tumor tissue particles. This thesis performed vinblastine extractions from *C. roseus* using water and ethanol as co-solvents for CO₂ at 300 bar and at different temperatures, those experiments showed the viability of this extraction method, subsequent extractions were optimized using ethanol. The results are compared to traditional extraction methods such as solid-liquid extraction the results found was up to 92.41%. Concluding that vinblastine extraction using carbon dioxide and ethanol mixtures at high pressure is possible. The PLGA nanoparticles containing vinblastine showed again the reproducibility of the nanoemulsion method of ensuring the production of homogeneous nanoparticles with and without drug and cell viability experiments show that the three formulations of PLGA nanoparticles containing vinblastine potentiated drug activity at the lower doses, 1 and 5 µg/mL, compared to free drug. The studies of glycopolymers synthesis presented the novel synthesis of an ATRP initiator based on PLGA without using PEG spacers. This initiator may, in future studies, be used for modifying PLGA. Successive attempts monomer polymerization saccharide via ATRP in water and DMSO leads to the conclusion that this approach is not the most suitable for the syntheses of glycopolymers graft from a PLGA initiator without the use of PEG spacers.

Key-words: Supercritical Carbon Dioxide, vinblastine, glycopolymers and nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como o conjunto de doenças caracterizadas pelo aumento descontrolado de número de células. Se este aumento de replicação celular não for controlado por estratégias como cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormônios ou imunoterapia pode resultar em morte (Ferlay *et al.*, 2010). O câncer está entre as doenças que mais causam mortes no mundo, mais de 8,2 milhões de mortes e 14,1 milhões de novos casos em 2012 (WHO, 2013).

O tratamento do câncer teve como marco inicial estudos realizados por Paul Ehrlich, o qual desenvolveu o conceito de quimioterapia, o uso de substâncias químicas para o tratamento de doenças. Ehrlich iniciou os desenvolvimentos de fármacos para o tratamento de doenças em modelos animais. Para o tratamento para câncer estudou os primeiros agentes alquilantes e corantes de anilina (Chabner e Roberts Jr, 2005). Após Paul Ehrlich, até a década de 1960, a ressecção cirúrgica e a radioterapia eram os tratamentos de escolha para diversos casos de câncer. Porém, após observar pacientes com câncer de mama, constatou-se que a combinação destas técnicas com a quimioterapia se tornava mais efetiva. A década de 1960 também foi promissora por causa da descoberta e aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) de diversos fármacos, entre eles os denominados alcaloides de vinca, fármacos biossintetizados pela *Catharanthus roseus* representados pela vimblastina e vincristina. A partir da década de 1980 iniciaram-se

estudos de biologia molecular a fim de identificar possíveis alvos moleculares e rotas metabólicas dos tumores, dando origem a novas classes de fármacos para o combate do câncer como os anticorpos monoclonais, os inibidores da tirosinaquinase entre outros (Chabner e Roberts Jr, 2005). No início deste século foram desenvolvidas e aprimoradas diversas tecnologias que possibilitaram a melhora nos mecanismos de liberação e vetorização de quimioterápicos, utilizando sistemas de liberação modificada de fármacos.

Existe uma tendência de redução do número de novos fármacos aprovados pelo FDA nos Estados Unidos (Chong e Sullivan Jr., 2007). Conseqüentemente, aumentaram os estudos que buscam novos usos para fármacos já existentes, alterando formulações, doses e indicações (Keiser *et al.*, 2009; Ashburn e Thor, 2004). Estas pesquisas, muitas já em etapas pré-clínicas e clínicas de fase I e II, beneficiam-se do conhecimento prévio das propriedades das moléculas, tais como segurança e perfis farmacocinéticos das mesmas (Ashburn e Thor, 2004).

Um estudo clínico de fase II (Bouffet *et al.*, 2012) colocou em evidência um novo uso para vimblastina, o tratamento de gliomas de baixo grau. A vimblastina é um alcaloide de alto peso molecular biossintetizado pela vinca-de-Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) utilizado tradicionalmente no tratamento de linfomas, câncer de mama e de testículos.

Os extratos de *C. roseus*, uma planta nativa da ilha de Madagascar e da Índia, atualmente distribuída por todo do globo, são utilizados para diversos fins na

medicina popular. Muitas de suas atividades biológicas estão relacionadas com a alta quantidade de moléculas farmacologicamente ativas como alcaloides, taninos e flavonoides. Dentre os metabólitos secundários da vinca-de-Madagascar, os mais conhecidos por suas atividades antineoplásicas são a vimblastina e a vincristina, com estruturas moleculares muito semelhantes entre si e com alta atividade citotóxica. Atualmente, a vimblastina comercial é extraída por vias clássicas de fitoquímica ou semi-sintetizada a partir de precursores produzidos pela própria *C. roseus*.

Diversas metodologias foram desenvolvidas para a extração dos alcaloides de *C. roseus*, em sua maioria extrações longas, com diversas etapas e com alto uso de solventes orgânicos (Verma *et al.*, 2008). Apesar do alto valor agregado do produto gerado, as diversas etapas acabam gerando grandes quantidades de resíduos tóxicos e aumento dos custos de produção. Sendo assim, a extração por fluidos supercríticos é uma alternativa aos processos fitoquímicos tradicionais. Desde o final da década de 70 os fluidos supercríticos têm sido utilizados em processos extrativos tais como a descafeinização de chás e café, a extração de lúpulo para indústria cervejeira e a extração de produtos aromáticos e flavorizantes (Taylor, 1996). Atualmente as pesquisas buscam produtos de alto valor agregado como extração fármacos provenientes de fontes naturais. A vimblastina é disponível no mercado apenas sob a forma de ampolas contendo sulfato de vimblastina liofilizado, o qual é suspenso e aplicado intravenosamente. Este fato torna evidente que novas formulações e estratégias de liberação do fármaco são opções para prospecção de novas aplicações e indicações. A estratégia de desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos é uma opção

altamente viável para fármacos antineoplásicos, formando sistemas de agentes terapêuticos incorporados a matrizes com características distintas e de tamanhos reduzidos, em micro e nanoescala. Estas partículas com tamanho, carga de superfície, morfologia e outras propriedades controladas, podem atingir novos alvos e possuir novas funções (Sinko, 2008). Com estes sistemas, projetam-se tratamentos mais efetivos, com menores efeitos adversos e maior adesão (Zhang *et al.*, 2013).

Os estudos relacionados ao tratamento de câncer, utilizando nanotecnologia, tiveram grande impulso após a descoberta do efeito EPR (*enhanced permeability and retention*), o qual aumenta a permeabilidade de vasos sanguíneos no tecido tumoral e a retenção de partículas (Stewart e Kleihues, 2003; Saha *et al.*, 2010). A partir da década de 1980, equipes multidisciplinares iniciaram o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos em nanoescala, os quais possibilitam o uso do efeito EPR, podendo atingir com maior seletividade os tecidos anormais e causando menores efeitos adversos.

Para a formulação de sistemas de liberação de fármacos existem quatro grupos principais de materiais: lipossomas/micelas, fármacos conjugados a polímeros, materiais biodegradáveis e fármacos ligados a proteínas. Atualmente existem 35 nanomedicamentos aprovados pelo FDA que utilizam estas estratégias, sendo 13 de fármacos incorporados a materiais biodegradáveis (Zhang *et al.*, 2013).

Dos materiais biodegradáveis a classe mais destacada é a dos polímeros, que pela atual química são de fácil síntese e modificação e podem ser obtidos em larga escala. O polímero mais utilizado em nanosistemas de liberação de fármacos é o poli (ácidos lático-co-glicólico) (PLGA), aprovado pelo FDA para o uso como excipiente em medicamentos, diagnóstico, aplicações clínicas e em pesquisa de ciência básica.

Com o objetivo de proporcionar uma característica furtiva e aumentar o tempo de circulação destes sistemas em nanoescala tem se estudado métodos de revestimento de nanopartículas. O polietilenoglicol (PEG) é o agente de revestimento mais utilizado, entretanto, estudos sugerem que em certos casos a aplicação sistemática favorece a competência do sistema imune em reconhecer o PEG como um material estranho ao organismo (Yang *et al.*, 2015; Ishida *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Esta tese propõe uma tecnologia limpa para extração de vimblastina, a produção de um nanosistema para liberação de vimblastina e, como alternativa aos métodos convencionais de revestimento de nanopartículas, esta tese propõe o uso de glicopolímeros sintéticos. Estes glicopolímeros buscariam mimetizar os polissacarídeos presentes nas membranas celulares de eritrócitos, adicionar uma característica furtiva às nanopartículas, reduzir a formação de uma corona proteica e aumentar o tempo de circulação.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em obter vimblastina a partir de *C. roseus*, produzir nanosistemas de PLGA para liberação modificada de vimblastina e apresentar uma proposta para o desenvolvimento de nanopartículas revestidas com glicopolímeros sintetizados a partir de um iniciador baseado em PLGA.

2.1. Objetivos Específicos

- Extrair de vimblastina por CO₂ supercrítico a partir de *C. roseus* (Cap. 3);
- Analisar qualitativa e quantitativa dos extratos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria UV e espectrometria de massas (Cap. 3);
- Produzir de nanosistemas de liberação modificada de vimblastina (Cap. 4 e Cap. 5);
- Caracterizar físico-química dos sistemas de liberação modificada (Cap. 4 e Cap. 5);
- Avaliar a viabilidade celular “*in vitro*” (Cap. 4 e Cap. 5);
- Sintetizar monômeros de glicose, galactose e manose para polimerização via ATRP e RAFT (Cap. 5);
- Polimerizar glicopolímeros via RAFT (Cap. 5);
- Polimerizar glicopolímeros via ATRP a partir de um iniciador baseado em PLGA (Cap. 5).

3. EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO DE VIMBLASTINA A PARTIR DE *C. roseus*

3.1. REVISAO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1. *Catharanthus roseus*

Catharanthus roseus (L.) G. Don (Figura 3.1), conhecida popularmente como vinca ou pervinca, é originária da Índia e de Madagascar. Atualmente está distribuída mundialmente, sendo utilizada como planta ornamental. Esta planta chega a 90 cm de altura, composta principalmente por folhas com 3 – 7 cm de comprimento (Verma *et al.*, 2007; Pasquali *et al.*, 1992).



Figura 3.1: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

A partir da década de 1950 a *C. roseus* despertou interesse de indústrias farmacêuticas devido a diversos usos na medicina popular relatados após sua ampla difusão em países tropicais. Durante estas pesquisas, observou-se a alta concentração de alcaloides nas folhas, sendo três deles utilizados comercialmente, dois antineoplásicos, vimblastina e vincristina, e um anti-hipertensivo, ajmalicina (Svoboda *et al.*, 1959; Shanks *et al.*, 1998; Bouffet *et al.*, 2012).

3.1.2. Vimblastina

A vimblastina (Figura 3.2) é um dos diversos alcaloides encontrados na *C. roseus*. Na década de 1970 a companhia farmacêutica Eli Lilly patenteou uma metodologia de extração e purificação utilizando solventes orgânicos (Jones, 1973). O método consiste em uma extração utilizando água e ácido sulfúrico e quatro processos de purificação: (1) fracionamento por partição com benzeno, (2, 3) duas colunas cromatográficas e, por fim, (4) a purificação por cristalização em etanol e ácido sulfúrico.

Como é característico dos fármacos antineoplásicos, a vimblastina também gera uma série de efeitos adversos ao paciente, entre eles distúrbios gastrointestinais, queda de cabelo, estomatite, dermatite e leucopenia. Apesar destes efeitos, a vimblastina é considerada um fármaco antineoplásico de baixa toxicidade e com efeitos adversos de fácil controle (Sweetman, 2011; Bouffet *et al.*, 2012). A vimblastina é utilizada amplamente no tratamento de linfomas e tumores de testículo, pulmão e mama (Sweetman, 2011).

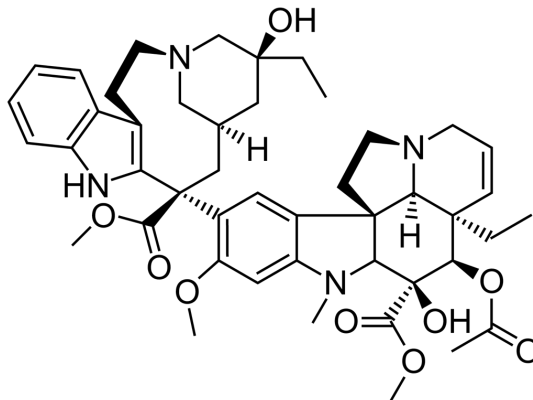


Figura 3.2: Estrutura química da vimblastina, $C_{46}H_{58}N_4O_9$.

A partir da metade da primeira década dos anos 2000 aumentaram os estudos para novos usos de fármacos antigos. Nesta mesma década uma pesquisa promissora utilizando vimblastina foi publicada, na qual a vimblastina foi administrada como alternativa à carboplatina para cinquenta e um pacientes pediátricos com gliomas de baixo grau. Este estudo piloto tratou pacientes pediátricos com doses semanais de 6 mg/m^2 . Destes pacientes, 7 tiveram uma redução do tumor maior que 25% ao final do tratamento. A administração de vimblastina a esta dosagem obteve moderada hematotoxicidade e melhora da qualidade de vida dos pacientes, quando comparada a outros fármacos (Lafay Cousin *et al.*, 2005). Como complemento um estudo piloto multicêntrico de fase II foi realizado de 2002 – 2006 (Bouffet *et al.*, 2012), e publicado em 2012, no qual nove pacientes entre 1,4 a 18,2 anos com glioma de baixo grau foram tratados com vimblastina por 52 semanas com aplicações intravenosas semanais de 6 mg/m^2 , e dose máxima de 10 mg por semana. Ao final das 52 semanas 35% dos pacientes tiveram a redução dos tumores e uma grande parte a estabilização da patologia. Novamente, foi observada uma baixa toxicidade e uma melhora da qualidade de

vida dos pacientes. Após 5 anos do início do tratamento 43% dos pacientes não necessitaram de novos tratamentos para a patologia. Estes resultados indicam uma nova terapia para gliomas de baixo grau, sendo ela barata, de baixa toxicidade e podendo ser administrada por longos períodos.

Estes estudos sobre a vimblastina abrem espaço para a modificação da forma de aplicação, visto que a atividade antineoplásica da vimblastina é reconhecida e devido aos baixos efeitos adversos possibilitam uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Com a liberação modificada o fármaco pode ser carregado ao tumor e então ser liberado em quantidades menores do que quando utilizado sistemicamente, reduzindo ainda mais os efeitos adversos e aumentando a eficácia do tratamento (Sinko *et al.*, 2008).

A vimblastina atua nas células em mitose bloqueando a β -tubulina, que fica incapaz de se polimerizar com a α -tubulina em microtúbulos. Com a interrupção da formação dos microtúbulos não ocorre o fuso mitótico, dispersando os cromossomos pelo citoplasma, e assim ocorrem alterações características da apoptose (Jordan e Wilson, 2004).

3.1.3. Fluido Supercrítico

O fluido supercrítico é, por definição, uma substância a pressão e temperatura acima do ponto crítico em fase única (Figura 3.3). Estes fluidos possuem propriedades características das fases líquida e gasosa, isto é, difundem-

se através de matrizes sólidas como um gás e solubilizam extratos como um líquido (Taylor, 1996).

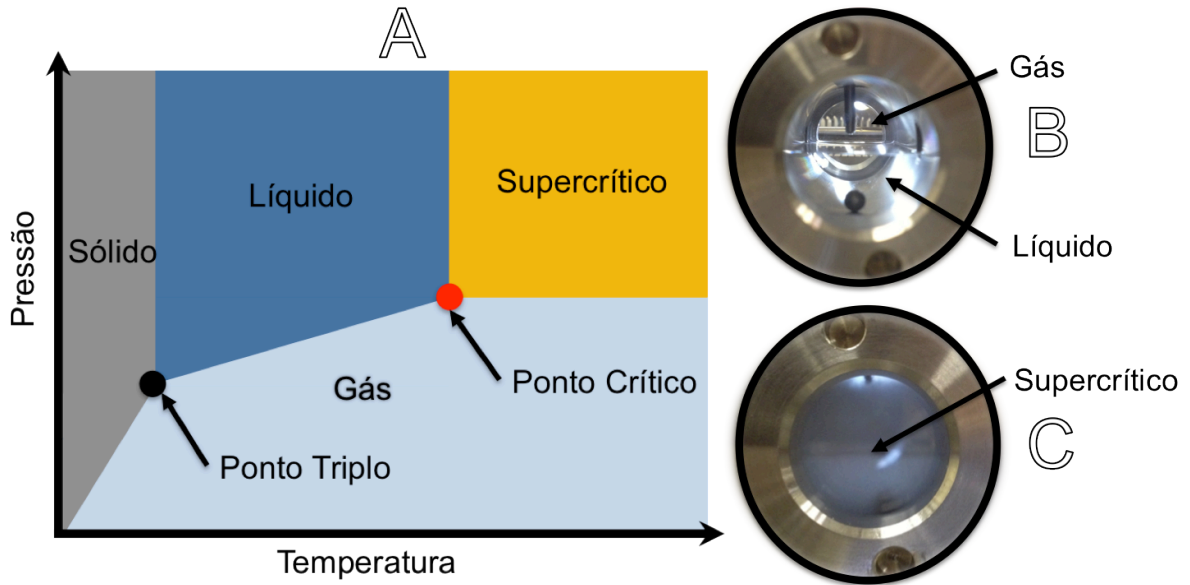


Figura 3.3: [A] Diagrama de fases do CO₂ (Adaptado de Taylor, 1996); [B] CO₂ líquido e gasoso; [C] CO₂ supercrítico.

O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), por necessitar de baixas temperaturas e pressões para atingir essa condição, ser seguro, atóxico, de baixo custo e possuir alta pureza, em comparação com outras substâncias (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Temperaturas críticas (T_c) e pressões críticas (P_c) de diferentes compostos.

Fluidos	T _c (°C)	P _c (bar)
Xenônio	16,6	57,6
Trifluorometano	25,9	46,9
Dióxido de Carbono	31,0	72,9
Propano	96,8	42,4
Amônia	132,4	111,3
Água	374,0	217,7

Adaptado de: Taylor, 1996.

A potencial aplicação na indústria farmacêutica de fluidos supercríticos é ampla, principalmente do dióxido de carbono, desde a produção de matérias primas (por extração) até processamento e esterilização de formas farmacêuticas (Brun *et al.*, 2012; Carginin *et al.*, 2010; Cassel *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Deshpande *et al.*, 2011; Dillow *et al.*, 1999).

3.1.3.1. *Extração por Fluidos Supercríticos (SFE)*

A pesquisa sobre o uso de fluidos supercríticos em extrações comerciais iniciou em 1960. A partir da década de 1970 os fluidos supercríticos têm sido utilizados para isolar produtos naturais, mas por um longo período estas extrações eram aplicadas para poucos produtos (Taylor, 1996).

O processo de SFE consiste em passar um solvente em condições supercríticas através de um leito poroso formado por uma matriz vegetal em um vaso extrator, solubilizando e arrastando os compostos até uma válvula de expansão. Em seguida, o extrato é precipitado no vaso de separação e o CO₂ é eliminado para o ambiente ou reciclado. Para realizar este processo é necessário o uso de uma fonte de CO₂, uma bomba de alta pressão, um trocador de calor, um vaso de alta pressão e um vaso de expansão/separação (Figura 3.4). Em escala industrial é realizado o reciclo do CO₂, voltando a origem do sistema.

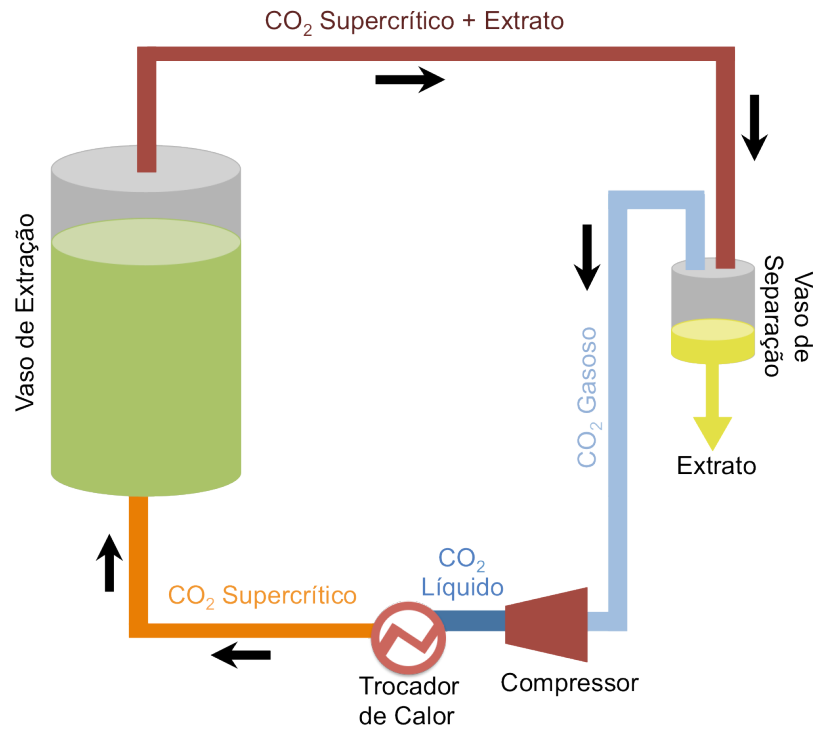


Figura 3.4: Diagrama do equipamento de extração supercrítica (Adaptado de: Cassel e Rocha, 2008).

Devido à tecnologia da SFE já estar industrialmente estabelecida em indústrias de descafeinização de café e chás, produção de extratos de lúpulo, produção de aromatizantes e flavorizantes, as pesquisas de SFE buscam a geração de novos extratos com usos semelhantes, logo, em sua grande maioria se destinam a produtos alimentícios e aromas.

No Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai se consome grandes quantidades de *Ilex paraguayensis* (erva-mate), a qual contém cafeína, tendo sido já realizados estudos para o uso de SFE na descafeinização de erva-mate (Cassel *et al.*, 2010; Cassel *et al.*, 2008). Além de estudos para extração de flavorizantes e aromatizantes de pimenta (*Piper nigrum*) (Topal *et al.*, 2008), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (Carvalho Jr. *et al.*, 2005), marcela (*Achyrocline satureioides*) (Vargas *et*

al., 2013), alho (*Allium cepa*) (Simándi *et al.*, 2000), cravo da Índia (Scopel *et al.*, 2016) e lavanda (*Lavandula angustifolia*) (Da Porto *et al.*, 2009). Os compostos de aroma e sabor muitas vezes são de baixo peso molecular e lipofílicos, sendo de fácil extração por CO₂ supercrítico. Para moléculas polares e/ou de alto peso molecular é possível alterar durante as extrações o poder de solubilização do fluido supercrítico adicionando um cossolvente. A extração de fármacos utilizando SFE foi estudada em escala laboratorial para a extração de paclitaxel de *Taxus brevifolia* (Jennings *et al.*, 1992), lapachol de *Tabebuia avellanedae* (Viana *et al.*, 2003), digoxina de *Digitallis lanata* (Moore e Taylor, 1997) e escopolamina de *Scopolia japonica* (Choi *et al.*, 1999).

Estudos para SFE de *C. roseus* foram realizados em escala analítica, quantidade de planta na escala de mg. Verma *et al.* (2008) tiveram como foco de estudo a extração de 3',4'-anidrovimblastina, podendo ser observado nos cromatogramas os picos de catarantina, vindolina, vimblastina e ajmalicina para extratos obtidos a 250 bar e 80°C. Outro estudo (Choi *et al.*, 2002) utilizou os cossolventes dietilamina e trietilamina em combinações com metanol, sendo o melhor resultado para combinação de CO₂-metanol-trietilamina (80:18:2) a 80°C e 340 bar, obtendo 37,53 µg/g de vimblastina por massa de extrato.

Este capítulo da tese propõe o uso de CO₂ supercrítico para a extração de vimblastina de *C. roseus*, utilizando água e etanol como cossolventes.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Materiais

Metanol (Merck, Alemanha), acetato de amônio (Merck, Alemanha), acetonitrila (J.T. Baker, Estados Unidos), vimblastina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), e Dióxido de Carbono 99% (AirProducts, Brasil).

Mudas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don foram adquiridas na Floricultura Úrsula localizada na cidade de Nova Petrópolis – RS. As partes aéreas da matéria vegetal foram coletadas, secas em estufa a 40° C por 24 horas e trituradas em um moinho de facas até a obtenção de partículas com tamanho médio de 362 µm, definido conforme Gomide (1983).

3.2.2. Obtenção de Extratos de *Catharanthus roseus* Utilizando CO₂

3.2.2.1. *Extração por CO₂ Supercrítico*

As extrações foram realizadas na unidade piloto de extração supercrítica (Cassel *et al.*, 2011 – Figura 4.2) localizada no Laboratório de Operações Unitárias situado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (LOPE/PUCRS). Foram adicionados 10 g do material vegetal seco e moído ao vaso de extração. Após pressurização do sistema com CO₂ foram realizadas extrações a 300 bar nas temperaturas de 40° C, 50° C, 60° C com dois cossolventes, água e etanol a 2,0% (m/m). Em seguida foram realizadas extrações a 300 bar e 40° C, utilizando etanol como cossolvente em três concentrações, 2,0, 5,0 e 9,0% (m/m).

O equipamento de extração supercrítica consiste em: um cilindro de CO₂, um trocador de calor de arrefecimento, uma bomba de pistão para altas pressões, um trocador de calor de aquecimento, três vasos de extração (100 mL, 500 mL e 1000 mL), quatro vasos de expansão e uma bomba de alta pressão para cossolvente (Cassel *et al.*, 2011).

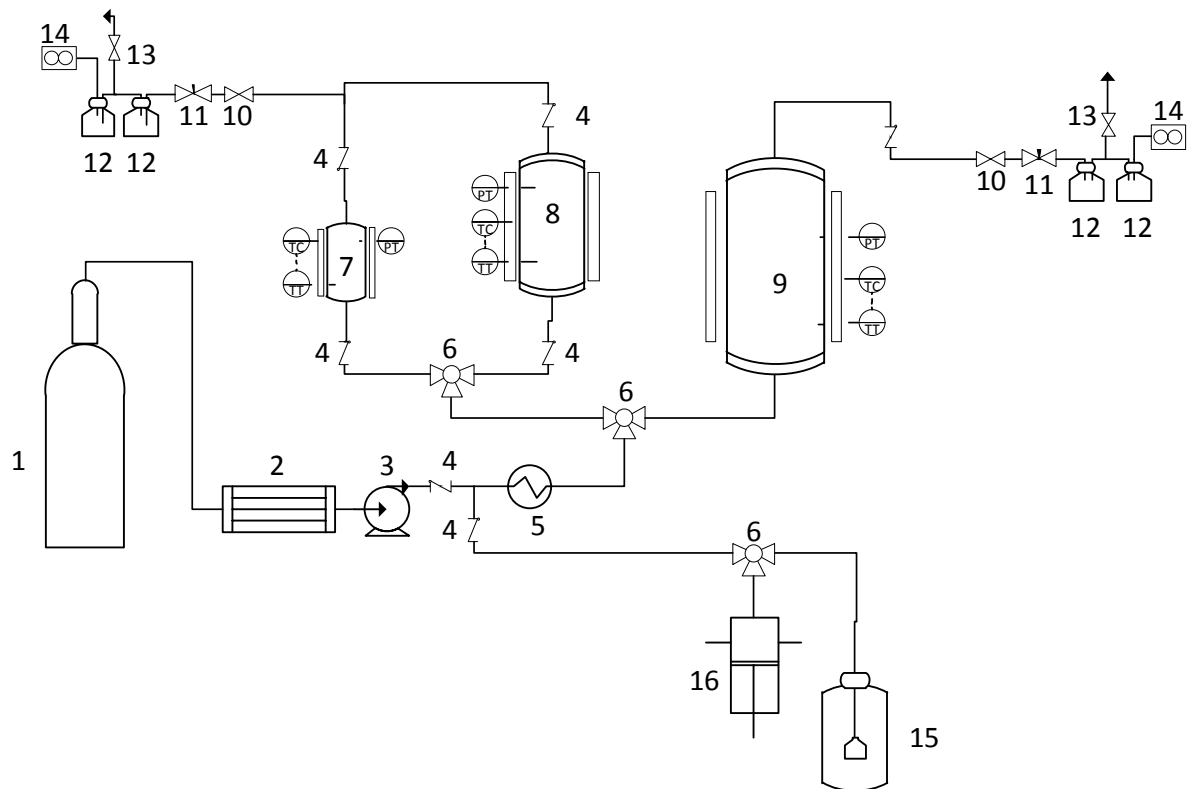


Figura 3.5: Fluxograma do Equipamento de Extração Supercrítica em Escala Piloto (Cassel *et al.*, 2011). [1] Cilindro de CO₂ com tubo pescador, [2] trocador de calor, [3] bomba de alta pressão, [4] válvulas de retenção, [5] trocador de calor (aquecimento), [6] válvulas de 3 vias, [7] vaso de extração 100 mL, [8] vaso de extração de 500 mL, [9] vaso de extração 1 L, [10] válvulas de bloqueio, [11] válvulas micrométricas, [12] vasos de expansão, [13] válvulas de segurança, [14] sensor de vaso, [15] vaso de cossolvente, [16] bomba de cossolvente. PT – Transmissor de pressão, TT – Transmissor de temperatura, TC – Controlador de temperatura.

O processo consiste em direcionar o CO₂ já em condições supercríticas (pressurizado e aquecido) ao fundo do vaso de extração, onde está localizada a planta. Após passar pelo leito vegetal, o fluido supercrítico e o extrato chegam ao topo do vaso, onde é direcionado aos vasos de expansão, separando o extrato do solvente. Quando cossolventes são utilizados, estes são injetados junto com o solvente supercrítico a partir do fundo do vaso de extração.

3.2.3. Identificação e Quantificação de Vimblastina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria Ultravioleta e Espectrometria de Massas

A identificação de vimblastina em extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa (Agilent® Technologies 1100 series). A separação da amostra foi realizada em uma coluna ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ de 100 mm, utilizando como fase móvel metanol. O detector de espectrometria de massas no modo *scan* selecionou as massas identificadas no padrão de vimblastina (406.2, 376.2, 346.4, 271.6 e 210.1 Da), além de analisar íons na faixa de 100 – 1500 Da (Adaptado de: Choi *et al.*, 2002).

Para quantificação de vimblastina em extratos foi utilizado um cromatógrafo (Agilent® Technologies 1200 series). Após a filtração das amostras em filtros com poros de 0,2 µm (Milipore®), 20 µL foram injetadas no cromatógrafo. Sendo separadas em uma coluna cromatográfica C₁₈ (15 x 2 mm) empacotada com partículas de 5 µm (Agilent® Technologies). Como fase móvel foi utilizado acetato de amônio (20 mM) e acetonitrila nas proporções 70:30, alterando para 25:75 durante

30 minutos em um gradiente linear e mantendo 25:75 até 50 minutos, com fluxo de 0,2 mL/min, sendo o tempo total de análise de 50 minutos. Em um detector UV no comprimento de onda de $\lambda = 254$ nm foi realizada a quantificação de vimblastina (Adaptado de: Choi *et al.*, 2002), sendo realizada uma curva de calibração utilizando um padrão de vimblastina (>95% Sigma-Aldrich).

3.3. RESULTADOS

As primeiras extrações de vimblastina a partir de *C. roseus* foram realizadas com 5 g de material vegetal seco e moído na condição de 300 bar e 40° C. Em sequência, utilizando a mesma planta, manteve-se as mesmas condições de extração, porém ao solvente foi adicionado 2% (m/m) de etanol como cossolvente. As massas de extratos obtidos foram de 45 mg e 179 mg, respectivamente. Estas amostras foram analisadas por HPLC/UV e foi possível observar que o uso de dióxido de carbono como solvente, foi seletivo para um composto não identificado que representa 95% de área com tempo de retenção de 43,859 minutos (Figura 3.6). Já a extração utilizando cossolvente apresentou um extrato com um maior número de compostos (Figura 3.7). A vimblastina foi identificada no extrato obtido com cossolvente por LC/MS com picos correspondentes a 406,2, 376,2, 346,4, 271,6 e 210,1 Da e no HPLC/UV com pico em 35,5 min.

Os experimentos iniciais indicaram que a pressão de 300 bar, limite de operação da unidade piloto de extração supercrítica, foi eficiente para extração de vimblastina. Sendo assim, foram avaliadas outras temperaturas e cossolventes, visando maximizar a concentração de vimblastina no extrato. Conforme Tabela 3.2,

ambos cossolventes, água e etanol, influenciaram no aumento da concentração de vimblastina no extrato.

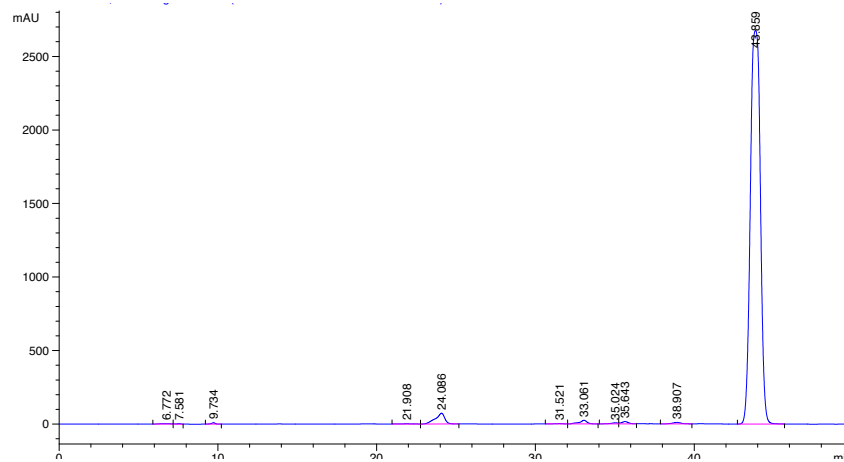


Figura 3.6: Cromatograma do extrato obtido utilizando CO₂ supercrítico a 300 bar e 40° C.

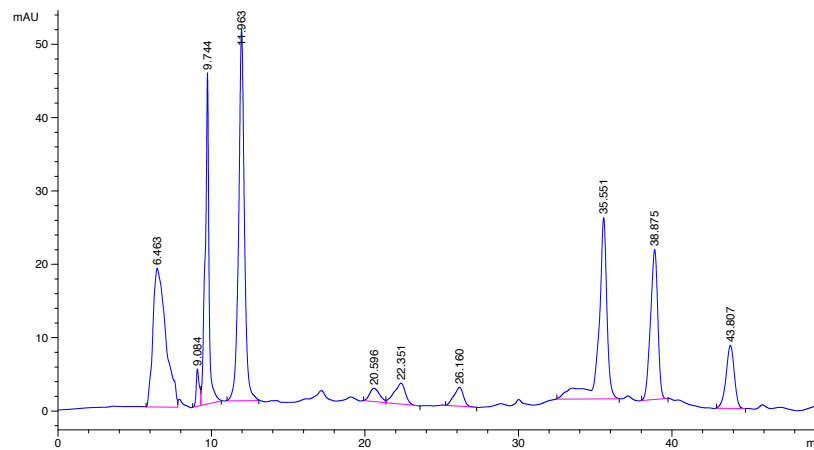


Figura 3.7: Cromatograma do extrato obtido utilizando CO₂ supercrítico a 300 bar e 40° C com etanol a 2% como cossolvente.

A densidade do fluido supercrítico em uma pressão constante pode ser alterada modificando sua temperatura. Quanto menor a temperatura maior sua densidade. As extrações realizadas a 40° C apresentaram uma maior seletividade

para vimblastina, possivelmente a maior densidade influenciou na extração de compostos de maior massa molecular.

Tabela 3.2: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por SFE.

Condição	Massa de Extrato	VBL/extrato ($\mu\text{g/g}$)
300 bar, 40° C	45 mg	0,00
300 bar, 40° C+água	360 mg	74,01
300 bar, 40° C+etanol	320 mg	70,36
300 bar, 50° C+água	480 mg	55,45
300 bar, 50° C+etanol	402 mg	66,91
300 bar, 60° C+água	321 mg	62,45
300 bar, 60° C+etanol	436 mg	68,83

Definidas as condições de operação do processo, foram realizadas novas extrações com coleta de extrato a cada 30 minutos para avaliar a variação da concentração de vimblastina ao longo do processo de extração. Os resultados são apresentados na Tabela 3.3 para cossolvente água e na Tabela 3.4 para cossolvente etanol.

Tabela 3.3: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração supercrítica com CO_2 e água 2 % (m/m) a 300 bar, 40° C.

300 bar, 40° C+água	Massa de Extrato	VBL/extrato ($\mu\text{g/g}$)
30 minutos	250 mg	92,29
60 minutos	32 mg	45,23
90 minutos	22 mg	34,62
130 minutos	122 mg	27,04

A partir dos resultados obtidos verificou-se que para a condição 300 bar, 40° C e água 2% (m/m) como cossolvente a faixa com maior concentração de vimblastina é extraída na faixa de 30 até 90 minutos e para etanol de 60 até 130 minutos.

Tabela 3.4: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração supercrítica com CO₂ e etanol 2 %(m/m) a 300 bar, 40° C.

300 bar, 40° C+etanol	Massa de Extrato	VBL/extrato (µg/g)
30 minutos	167 mg	38,46
60 minutos	53 mg	102,01
90 minutos	32 mg	81,70
130 minutos	22 mg	52,56

Dentro da estratégia de otimização das condições operacionais de extração, definiu-se o etanol como cossolvente, apesar da concentração mássica de vimblastina no extrato ser menor. O etanol é um solvente limpo, de fácil recuperação e mais volátil que a água, permitindo um menor tempo no processo de volatilização e secagem dos extratos. Para avaliar a concentração adequada de cossolvente, foram realizados experimentos a 300 bar, 40° C e etanol como cossolvente a 2,0, 5,0 e 9,0% (m/m).

Os resultados de extração massa *versus* tempo (Figura 3.8 e Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7) indicam que o aumento da vazão de cossolvente aumentou o rendimento de extrato. As amostras extraídas utilizando 5,0 e 9,0% de etanol obtiveram resultados estatisticamente semelhantes de massa total de extrato, chegando próximas da saturação da mistura de solventes.

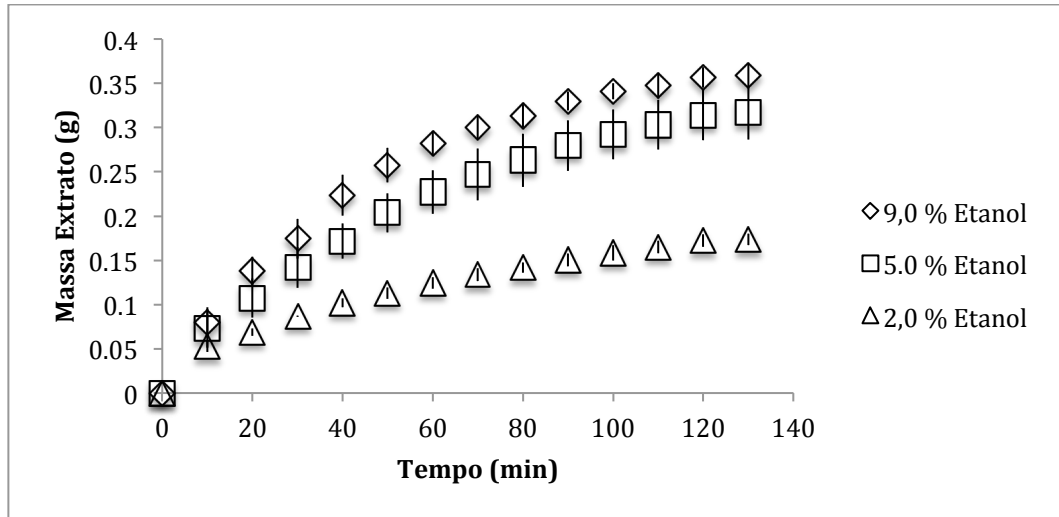


Figura 3.8: Curvas de extração de *C. roseus* utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol 2,0, 5,0 e 9,0 % (m/m) a 300 bar 40° C.

O gráfico de extração de vimblastina (μg) versus tempo (Figura 3.9) também apresenta curvas semelhantes para as amostras obtidas utilizando 5,0 e 9,0% de cossolvente e valores abaixo quando utilizada uma vazão baixa de etanol (2,0%).

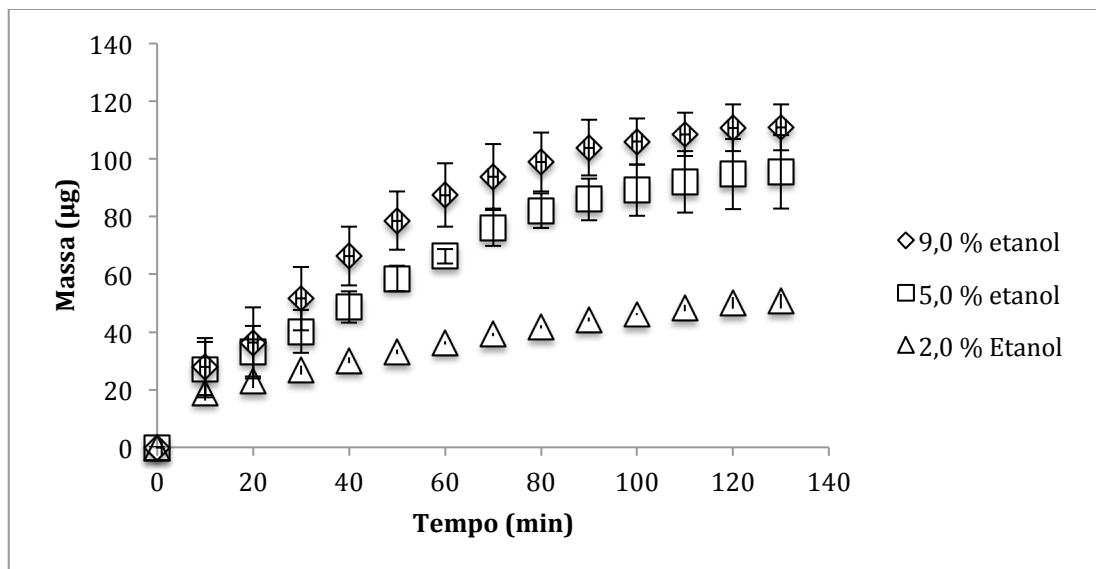


Figura 3.9: Curvas de extração de vimblastina utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol a 2,0, 5,0 e 9,0 % (m/m) a 300 bar 40° C.

Tabela 3.5: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração supercrítica com CO₂ e etanol 2,0 %(m/m) a 300 bar, 40° C.

Tempo (min)	Extrato		Vimblastina		% VBL extraída	VBL/extrato (µg/g)
	Média (g)	DesvPad	Média (µg)	DesvPad		
0	0,0000	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,0530	0,0066	18,98	2,76	37,44	358,09
20	0,0690	0,0044	22,98	2,52	45,34	333,03
30	0,0867	0,0006	26,77	1,54	52,81	308,83
40	0,1020	0,0050	30,16	0,97	59,50	295,64
50	0,1130	0,0066	33,07	0,82	65,24	292,63
60	0,1243	0,0067	36,24	0,66	71,49	291,44
70	0,1337	0,0071	39,12	0,55	77,17	292,63
80	0,1417	0,0059	41,74	0,57	82,35	294,64
90	0,1503	0,0072	44,25	0,65	87,30	294,32
100	0,1583	0,0086	46,22	0,41	91,18	291,89
110	0,1650	0,0070	48,26	1,13	95,22	292,49
120	0,1723	0,0071	50,04	1,97	98,73	290,38
130	0,1737	0,0064	50,68	2,53	100,00	291,85

Tabela 3.6: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração a alta pressão com CO₂ e etanol 5,0 %(m/m) a 300 bar, 40° C.

Tempo (min)	Extrato		Vimblastina		% VBL extraída	VBL/extrato (µg/g)
	Média (g)	DesvPad	Média (µg)	DesvPad		
0	0,0000	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,0730	0,0219	26,92	9,57	28,18	368,74
20	0,1073	0,0221	33,27	8,74	34,82	309,94
30	0,1420	0,0231	40,21	7,46	42,09	283,15
40	0,1717	0,0197	48,73	5,48	51,00	283,85
50	0,2037	0,0224	58,56	4,43	61,30	287,54
60	0,2270	0,0246	66,27	2,51	69,36	291,93
70	0,2470	0,0292	76,05	6,24	79,60	307,89
80	0,2630	0,0302	82,12	6,04	85,95	312,23
90	0,2797	0,0286	85,97	7,31	89,99	307,42
100	0,2923	0,0281	89,15	8,94	93,32	304,97
110	0,3033	0,0281	92,06	10,74	96,36	303,51
120	0,3143	0,0286	94,76	12,14	99,18	301,45
130	0,3167	0,0304	95,54	12,73	100,00	301,70

Tabela 3.7: Rendimento e porcentagem de vimblastina nos extratos obtidos por extração a alta pressão com CO₂ e etanol 9,0 %(m/m) a 300 bar, 40° C

Tempo (min)	Extrato		Vimblastina		% VBL extraída	VBL/extrato (µg/g)
	Média (g)	DesvPad	Média (µg)	DesvPad		
0	0,0000	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,0797	0,0172	28,01	9,97	25,23	351,57
20	0,1380	0,0159	36,25	12,38	32,65	262,69
30	0,1910	0,0108	51,56	10,97	46,44	269,93
40	0,2403	0,0093	66,35	10,19	59,76	276,06
50	0,2743	0,0115	78,64	10,16	70,83	286,65
60	0,2990	0,0161	87,52	11,08	78,84	292,71
70	0,3167	0,0159	93,95	11,16	84,63	296,70
80	0,3297	0,0159	98,91	10,25	89,10	300,04
90	0,3467	0,0186	103,91	9,70	93,60	299,74
100	0,3577	0,0215	106,10	8,03	95,57	296,65
110	0,3680	0,0240	108,60	7,55	97,83	295,12
120	0,3777	0,0268	110,78	8,15	99,78	293,32
130	0,3797	0,0264	111,02	7,99	100,00	292,40

Os resultados encontrados de 292,40, 301,70 e 291,85 µg/g de vimblastina por massa de extrato (Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7) mostram a eficiência de misturas de etanol e dióxido de carbono para a obtenção de vimblastina a partir de *C. roseus*. Quando estes resultados são comparados (Tabela 3.8) ao estudo de Choi e colaboradores (2002) que utilizaram uma massa reduzida de planta (200 mg) em um equipamento em escala laboratorial, esta tese utilizou 8 g de planta em uma planta piloto de extração a altas pressões, eles obtiveram 37,53 µg/g utilizando misturas de CO₂-metanol-trietilamina a 80° C e 340 bar, solventes de alto risco ocupacional e de maior toxicidade. Esta comparação permite concluir que o aumento da massa de planta não afeta a eficiência da extração com dióxido de carbono a altas pressões e que a vimblastina é mais solúvel em misturas de CO₂ e etanol que em CO₂-metanol-trietilamina.

Também é possível realizar uma comparação entre métodos de extração. Verma *et al.* (2007) comparou métodos de extração de *C. roseus*, para soxhlet utilizando metanol a extração obteve apenas traços de vimblastina não quantificados, utilizando soxhlet com diclorometano obtiveram 29,4 µg/g, para extração por fluido supercrítico e metanol a 450 bar 40° C 77,8 µg/g e para extração sólido-líquido com ácido sulfúrico em metanol 156,8 µg/g, o melhor resultado do artigo apresentado. Realizando um paralelo entre esta tese e o melhor resultado encontrado de extrações de fitoquímica tradicional os resultados apresentados aqui superam em 92,41%.

Tabela 3.8: Comparativo entre os resultados de extração de vimblastina obtidos por esta tese e outros estudos.

Método	Solvente	Concentração	T (°C)	P (bar)	Ref.
SFE	CO ₂ +Etanol 2,0%	291,85 µg/g	40	300	-
SFE	CO ₂ +Etanol 5,0%	301,70 µg/g	40	300	-
SFE	CO ₂ +Etanol 9,0%	292,40 µg/g	40	300	-
SFE	CO ₂ +Metanol+Trietilamina	37,53 µg/g	80	340	Choi <i>et al.</i> , 2002
SFE	CO ₂ +Metanol	77,8 µg/g	40	450	Verma <i>et al.</i> , 2007
Soxhlet	Metanol	- µg/g	66	-	Verma <i>et al.</i> , 2007
Soxhlet	Diclorometano	29,4 µg/g	40	-	Verma <i>et al.</i> , 2007
Extração Sólido Líquido	Ácido Sulfúrico+Metanol	156,8 µg/g	25	-	Verma <i>et al.</i> , 2007

Estes resultados indicam que a extração de vimblastina utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol a altas pressões é possível. Sendo uma tecnologia

limpa, barata e alternativa aos métodos tradicionais de fitoquímica. Se utilizada para extração em escala industrial será possível obter extratos mais concentrados reduzindo etapas de purificação e como a purificação em escala industrial utiliza cromatografia pode ser possível purificar em uma etapa vimblastina, vincristina e seus precursores para semi-síntese (vindolina e catarantina).

4. PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA

4.1. Sistemas de Liberação Modificada de Fármacos

O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos tem se tornado uma alternativa cada vez mais utilizada pelas indústrias farmacêuticas tão importante quanto a descoberta de novos fármacos. Por ser mais viável economicamente, por existir um conhecimento prévio dos fármacos, tais como segurança e perfis farmacocinéticos (Ashburn e Thor, 2004; Patridge *et al.*, 2016). O custo e tempo para o desenvolvimento destes sistemas de liberação modificada de fármacos é de aproximadamente US\$ 50 milhões em quatro anos, enquanto que para o desenvolvimento de um novo fármaco o custo médio é dez vezes maior, levando aproximadamente dez anos. O mercado de sistemas de liberação modificada de fármacos também está em desenvolvimento, passando de US\$ 75 milhões em 2001 para US\$ 121 bilhões em 2010, nos Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2013). Os sistemas de liberação de fármacos têm como objetivo alterar o perfil cinético de absorção e metabolismo dos medicamentos convencionais (comprimidos, cápsulas, soluções e outros).

Cada fármaco se comporta de forma específica no organismo, alterando suas doses terapêuticas, sítios de ação, cinética de absorção entre outros fatores. Para otimização da atividade do fármaco é necessária uma forma farmacêutica que

seja capaz de auxiliar o mesmo a transpor as barreiras e proteger o fármaco de degradação no organismo, então se utilizam sistemas de liberação de fármacos (Allen e Cullis, 2004; Liechty *et al.*, 2010).

O avanço da engenharia e tecnologia de materiais possibilitou o desenvolvimento de novos materiais para sistemas de liberação de fármacos com diferentes características, podendo ser biodegradáveis, biocompatíveis e degradáveis devido a estímulos externos entre outros. Em décadas passadas as formulações candidatas com maior aprovação em testes clínicos foram as micelas e lipossomas, enquanto que na década atual são os fármacos conjugados a polímeros e os sistemas de liberação de fármacos baseados em polímeros biodegradáveis (Zhang *et al.*, 2013). Uma grande variedade de polímeros é estudada para estes sistemas, tanto polímeros sintéticos, quanto naturais ou híbridos. O polímero mais utilizado em estudos e o com mais medicamentos aprovados pelo FDA é o Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), tendo 11 produtos no mercado (Zhang *et al.*, 2013).

4.1.1. Polímeros Responsivos

Na última década foram criados diversos polímeros responsivos que se degradam a um estímulo fisiológico, como estímulos relativos ao meio (ex.: água), internos (ex.: enzimas) e externos (ex.: luz e magnetismo). Estas respostas são obtidas pela incorporação de ligações hidrolisáveis ou oxidáveis em diferentes arquiteturas poliméricas (Deshayes e Kasko, 2013).

4.1.1.1. *Polímeros Responsivos a Estímulos Relativos ao Meio*

Os polímeros responsivos a estímulos relativos ao meio respondem a condições que estimulam a sua degradação. Estes estímulos incluem a água, pH e temperatura. Através destes estímulos a liberação do fármaco pode ocorrer de duas formas: a quebra do polímero (água e pH) ou a mudança de solubilidade do meio (temperatura).

O pH no corpo humano não é constante e isto possibilita o desenvolvimento de polímeros responsivos a pH específicos (Tabela 4.1). Os polímeros responsivos a pH são submetidos a hidrólise catalisada por ácidos ou bases, que quebram as ligações covalentes do material polimérico, ou a variação de pH pode resultar na ionização do polímero, alterando a sua solubilidade. Neste caso o polímero não é degradado a nível molecular, mas sofre modificações estruturais físicas. Os polímeros frequentemente utilizados como responsivos a pH utilizam ligações acetal/cetal, ortoéster, carbamato, hidrazona, imina e outros como iniciadores da degradação (Deshayes e Kasko, 2013; Sebra *et al.*, 2006).

Tabela 4.1: Variação de pH em diferentes tecidos do corpo humano.

Tecido/Órgão/Compartimento	pH
Sangue	7,4
Tecido tumoral (Extracelular)	6,5 - 7,2
Lisossoma	4,5 – 5,0
Intestino	5,0 – 8,0
Estomago	1,0 – 3,0
Endossoma (inicial)	6,0 – 6,5
Endossoma (final)	5,0 – 6,0

Adaptado de Deshayes e Kasko, 2013.

Os materiais responsivos à temperatura são estudados devido a temperatura fisiológica ser geralmente estável (37° C) e diferente da temperatura de ambientes controlados (~ 20° C). Polímeros termo-responsivos são submetidos a uma mudança de fase quando existe a variação de temperatura, que pode induzir a uma súbita mudança do estado de solvatação. Novas pesquisas (Hervault *et al.*, 2016; Kakwere *et al.*, 2016) alteram a temperatura corporal de forma que o polímero inicie a degradação, aquecendo ou resfriando locais, podendo ser utilizados ultrassons, micro-ondas, radiofrequência ou até banhos frios ou quentes. Os hidrogéis são os polímeros de maior interesse entre os materiais responsivos à temperatura.

O estímulo comumente utilizado em sistemas de liberação de fármacos é a água, abundante no corpo humano (aproximadamente 60%). Este tipo de degradação ocorre pela hidrólise das ligações da cadeia polimérica. A hidrólise ocorre quando uma molécula de água se incorpora na matriz polimérica causando uma quebra de cadeia. Existem diversas classes de polímeros degradados por hidrólise: polianidridos, poliésteres, poliuretanos, policarbonatos e poliamidas. Os grupos funcionais são de grande importância na liberação modificada de fármacos, para liberações prolongadas durante semanas se utilizam ésteres e para liberações mais rápidas anidridos, sendo o PLGA o representante mais utilizado dos ésteres.

4.1.1.1.1 Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)

Degradado por estímulos relativos ao meio, o PLGA (Figura 4.1) é um poliéster formado pela combinação dos polímeros dos ácidos láctico e glicólico. Ele é

frequentemente utilizado tanto em pesquisa quanto comercialmente, em sistemas de sistemas de liberação de fármacos e *scaffolds* para engenharia de tecidos e sustentação de tecidos (Anderson *et al.*, 2012).

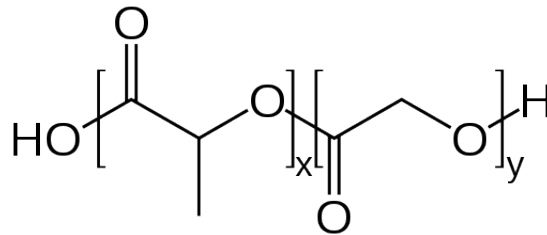


Figura 4.1: Monômeros do PLGA, ácido lático e ácido glicólico.

A liberação de fármacos veiculada por PLGA pode ser sustentada por horas ou até meses. Segundo Fredenberg *et al.* (2011), a liberação de fármacos de matrizes de PLGA é decorrente de quatro mecanismos de liberação: (1) difusão através de poros, (2) difusão através do polímero, (3) bombeamento osmótico e (4) erosão (Figura 4.2).

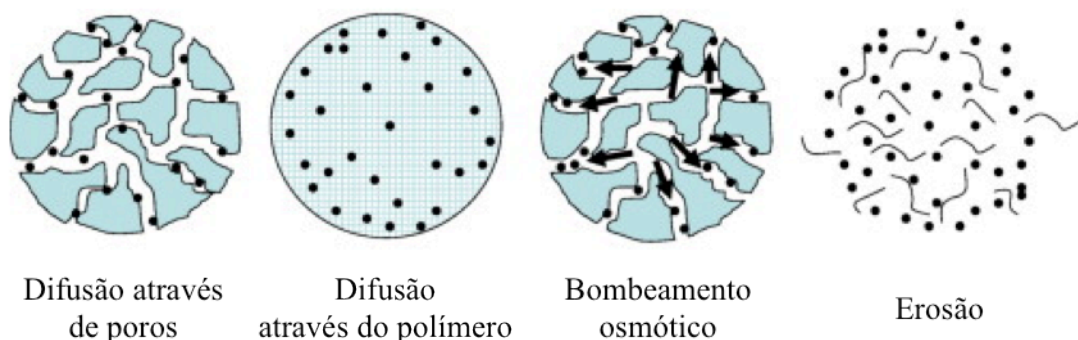


Figura 4.2: Mecanismos de degradação e liberação de fármacos de matrizes de PLGA (Adaptado de: Fredenberg *et al.*, 2011).

A difusão do fármaco através de poros é a forma mais comum de liberação para biofármacos (ex.: proteínas) em matrizes de PLGA, quando as

moléculas de alta massa molecular e hidrofílicas difundem através da matriz polimérica. Este mecanismo é dependente da estrutura e dos processos de abertura e fechamento dos poros do polímero. O coeficiente desta difusão é dependente do coeficiente de difusão de um líquido nos poros, da porosidade e da tortuosidade dos poros, devendo estes serem contínuos a partir do fármaco até a superfície dos sistemas de liberação de fármacos (Fredenberg *et al.*, 2011; Faisant *et al.*, 2002).

A difusão de fármacos através de matrizes de PLGA depende da mobilidade e densidade da cadeia polimérica. Utilizando um fármaco pequeno e hidrofóbico esta forma de liberação é facilitada, porque quando ocorre o intumescimento do sistema PLGA-fármaco, o fármaco se difunde do interior da matriz até a superfície, sendo em seguida liberado (Fredenberg *et al.*, 2011).

A liberação de fármacos do PLGA por erosão ocorre quando o fármaco é liberado do sistema na medida em que polímero se degrada. Esta forma de liberação se caracteriza pelos perfis idênticos de liberação do fármaco e degradação do polímero, considerando-se um fármaco homogeneamente distribuído no sistema. O PLGA tem como característica o rápido intumescimento, o que acaba restringindo este mecanismo a liberação de fármacos com PLGA de baixa massa molecular e de pequeno tamanho, não sendo a erosão o mecanismo de liberação dominante (Fredenberg *et al.*, 2011; Faisant *et al.*, 2002).

4.1.1.2. *Polímeros Responsivos a Estímulos Internos*

O corpo humano é um sistema reativo, com diferentes concentrações de agentes reativos em diferentes partes do organismo, existindo diferenças significativas entre tecidos lesados e tecidos saudáveis. Sendo enzimas e oxidação utilizadas como estratégias para degradação de polímeros por estímulos internos (Deshayes e Kasko, 2013).

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas em meio intracelular e extracelular. Naturalmente existem enzimas específicas para a degradação de polímeros naturais, como o colágeno (colagenase), e enzimas inespecíficas. Estas enzimas inespecíficas são o alvo para a síntese de novos materiais poliméricos, onde são incorporadas sequências de aminoácidos específicas, degradando o material no local e no momento desejado.

A degradação polimérica por oxidação se dá por agentes oxidantes presentes no organismo, sendo classificados como espécie reativa de oxigênio (ex.: peróxido de hidrogênio) e espécie reativa de nitrogênio (ex.: óxido nítrico). O estresse oxidativo é associado a diferentes patologias como câncer, Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (Berg *et al.*, 2004). Este desequilíbrio redox pode ser utilizado como desencadeador da degradação polimérica. Os polímeros comumente utilizados como responsivos a oxidação são os polisulfuretos.

4.1.1.3. *Polímeros Responsivos a Estímulos Externos*

Os polímeros responsivos a estímulos externos têm sido de grande interesse nas pesquisas de biomateriais para a liberação controlada de fármacos,

pela grande variedade de formas de desencadear a degradação e, conseguinte, liberação do fármaco. Entre as formas mais estudadas de degradação existe a fotólise, a elétrica e a magnética. Destas, a fotólise é a estratégia de liberação controlada de fármacos que apresenta grandes avanços e pesquisas (Kloxin *et al.*, 2009; Griffin *et al.*, 2013).

A fotólise é uma estratégia promissora por poder ser utilizada na presença de células vivas sem comprometer a viabilidade ou bioatividade celular. Na liberação de fármacos por fotólise uma fonte luminosa, em um comprimento de onda específico, é incidida na matriz polimérica, quebrando as ligações covalentes. Quando estes polímeros são utilizados em presença de células vivas os comprimentos de onda, o tempo de incidência e intensidade são limitados para que não afetem a viabilidade celular. As luzes geralmente utilizadas são ultravioletas (UV) de comprimentos de onda altos, já que os de baixa intensidade causam danos celulares e possíveis danos ao material genético. A fotólise é singular por liberar o fármaco apenas no local e no momento da incidência luminosa (Deshayes e Kasko, 2013).

4.1.2. Nanosistemas no tratamento do câncer

A nanotecnologia é um campo de estudo multidisciplinar e com atual destaque pelo grande número de pesquisas desenvolvidas (Haley e Frenkel, 2008). O termo nanotecnologia foi estabelecido para classificar pesquisas de cunho tecnológico com materiais em pequena escala, 200 nm (Lövestam *et al.*, 2010).

Existem diversos exemplos de pesquisas utilizando nanomateriais com objetivos farmacêuticos, entre eles lipossomas, nanopartículas de ouro, nanopartículas poliméricas, fármacos ligados a proteínas, nanocristais e nanopartículas de sílica. Estes podem ser divididos em três gerações de acordo com a forma que foram desenvolvidos: (1) não especificamente orientados, (2) vetorizados ativamente e (3) multifase (Serda *et al.*, 2011; Peer *et al.*, 2007).

A primeira geração é a dos nanosistemas não especificamente orientados, sendo a liberação lipossomal a forma utilizada com maior sucesso na clínica possuindo diversos representantes comerciais, entre eles a doxorubicina lipossomal utilizada no tratamento de câncer de mama, de ovário e sarcoma de Kaposi. O Doxil[®] foi o primeiro nanosistema para liberação de fármacos aprovado pelo FDA. Por sua pequena dimensão (<300 nm), o Doxil[®] utiliza o efeito EPR (*enhanced permeability and retention*) para transpor passivamente os vasos e ficar retido e acumulado no tumor, evitando ou reduzindo a perfusão de doxorubicina para o tecido saudável (Peer *et al.*, 2007).

A segunda geração de nanosistemas para uso farmacológico são os desenvolvidos para vetorização ativa, utilizando moléculas específicas do metabolismo dos tumores como alvos para liberação, como ácido fólico, anticorpos monoclonais ou antígenos de membrana. Esta estratégia de liberação apresenta uma melhora significativa da biodistribuição dos nanosistemas (Serda *et al.*, 2011; Peer *et al.*, 2007). A aprovação pelo FDA do Brentuximab Vedotin[®] (2011) e do sucesso do Abraxane[®] (aprovado pelo FDA em 2005) demonstra a efetividade

destes sistemas. O Abraxane[®] é um medicamento do conjugado de paclitaxel e albumina, desenvolvido com o objetivo de retirar o Cremophor[™], excipiente farmacêutico altamente tóxico, da formulação tradicional do paclitaxel. A albumina, além de aumentar a solubilidade do paclitaxel em água, evita a ligação do paclitaxel às proteínas plasmáticas e auxilia na transcitose endotelial, pela ligação a uma glicoproteína de superfície celular (gp60). A gp60 liga-se a caveolin-1, uma proteína intracelular, com a consequente formação de vesículas intracelulares. Após a degradação da albumina o fármaco é liberado. A caveolina-1 está presente em diversas neoplasias como de mama, pulmão e de próstata, o que explica o porquê da albumina ser acumulada em alguns tumores e, também, facilitando o acúmulo intratumoral de fármacos e nanosistemas ligados à albumina (Miele *et al.*, 2009; Stinchcombe, 2007).

A terceira geração de nanosistemas representa uma mudança de estratégia para a superação de barreiras fisiológicas até o tumor. Uma vez que único agente não pode transpor a infinidade de barreiras existentes, esses nanosistemas são compostos de diversas classes de materiais com distintas funções, combinados em um único vetor para conseguir interações colaborativas. Estes nanosistemas são desenvolvidos utilizando materiais dos sistemas de primeira e segunda gerações (Serda *et al.*, 2011).

Este capítulo propõe a fabricação de nanosistemas para liberação de vimblastina de primeira geração utilizando três PLGA como matrizes. Sendo analisados tamanho de partícula, potencial zeta, perfis de liberação e atividade antitumoral frente a células HEP G2.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Materiais

Acetato de etila (Merck, Alemanha), acetato de amônio (Merck, Alemanha), acetonitrila (J.T. Baker, Estados Unidos), vimblastina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), vimblastina (Libbs, Brasil), dimetilsulfoxido (DMSO) (Merck, Alemanha), Poli(ácido lático-co ácido glicólico) 50:50 (PLGA) terminado em ácido carboxílico 46 kDa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), Poli(ácido lático-co ácido glicólico) 50:50 100 kDa (PURAC, Alemanha), Poli(ácido lático-co ácido glicólico) 85:15 200 kDa (PURAC, Alemanha) e álcool polivinílico (PVA) (Merck, Alemanha).

4.2.2. Produção de Nanopartículas de PLGA

50,0 mg de cada PLGA foram dissolvidos em DMSO (200 μ L) e acetato de etila por 72 horas. A nanoemulsão da fase orgânica e a fase aquosa (PVA 3% em água) foi realizada utilizando três ciclos de vortex e ultrassonicação por sonda. Em seguida a nanoemulsão foi vertida em uma solução de PVA 0,3% (m/m). Após 18 horas as partículas foram centrifugadas a 25000 rcf, lavadas com água três vezes e coletadas após liofilização. Para produção de nanopartículas contendo vimblastina foram adicionados 3,0 mg de vimblastina liofilizada na fase orgânica da emulsão. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.2.3. Liberação de vimblastina “*in vitro*”

A liberação de vimblastina *in vitro* foi realizada conforme estudo de Mukerjee e Vishwanatha (2009). 3,5 mg de nanopartículas foram solubilizadas em 35 mL de tampão fosfato (pH 7,4). 1 mL de cada solução foi dividida em microtubos de reação e incubadas sob agitação moderada a 37° C e retiradas amostras em 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 e 168 horas. Após o intervalo de tempo predeterminado as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante filtrado em filtros de 200 nm e injetados no HPLC/UV para quantificação de vimblastina.

4.2.4. Determinação de viabilidade celular “*in vitro*”

As nanopartículas foram adicionadas em diferentes concentrações a placas de cultura com densidade uniforme de células de hepatocarcinoma humano (Hep G2). Estas placas foram incubadas a 37° C com umidade controlada e 5% de CO₂. A avaliação de viabilidade e proliferação celular foi realizada através de contagem celular (Liang e Kiick, 2014; Silva, 2015).

4.2.5. Determinação de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

As determinações de tamanho de partícula e potencial zeta foram realizadas em um Zetasizer Nanoseries ZS. Para a determinação de tamanho de partícula foram adicionados 1 mL de uma solução 0,1 mg/mL de nanopartículas em água em uma cubeta de quartzo (ZEN 2112). O equipamento foi estabilizado por 120 segundos e foi determinado o tamanho de partícula. Para o potencial zeta foi

realizado o mesmo procedimento em uma cubeta DTS 1060 e determinado o potencial zeta.

4.3. RESULTADOS

As nanopartículas de PLGA produzidas pelo método de nanoemulsão e evaporação (Tabela 4.2) obtiveram tamanho médio de 124,3 nm até um máximo de 180,75 nm e índice de polidispersão máximo de 0,11. O potencial zeta variou de -12,10 até -4,69 mV. As nanopartículas contendo vimblastina obtiveram valores maiores de potencial zeta que suas matrizes sem o fármaco. Esta diferença pode ser devido a capacidade de ionização da vimblastina.

Tabela 4.2: Resultados de rendimento (m/m), tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes nanopartículas de PLGA produzidas por nanoemulsão.

Amostra	Rendimento % (m/m)		Tamanho (nm)		PDI*	Potencial Zeta (mV)	Concentração de vimblastina nas nanopartículas
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão			
PLGA 8515 200kDa	67,91	2,39	136,85	1,06	0,07	-9,01	-
PLGA 5050 100kDa	74,14	3,47	151,35	23,12	0,11	-5,18	-
PLGA 5050 54kDa	67,95	12,74	124,30	2,97	0,06	-12,00	-
PLGA 8515 200kDa+Vimblastina	54,31	1,94	123,70	6,93	0,05	-6,33	36,43 µg/mg
PLGA 5050 100kDa+Vimblastina	52,55	0,00	149,05	8,70	0,10	-5,28	31,01 µg/mg
PLGA 5050 54kDa+Vimblastina	54,17	4,1	180,75	5,30	0,11	-11,40	30,75 µg/mg

*PDI: Índice de Polidispersão

Já foram relatadas na literatura (Verdeiro *et al.*, 2013; Sande *et al.*, 2013) diversos resultados de produção de nanopartículas de PLGA por nanoemulsão, o resultado obtido mostrou a eficiência deste método, que apesar de os PLGAs terem massas moleculares diferentes. Os resultados obtidos foram próximos aos

resultados obtidos por Verdeiro *et al.* (2013) 116,90 a 128,37 nm de diâmetro e potencial zeta de -21 mV.

A concentração de vimblastina dispersa nas nanopartículas foram de 36,46 µg/mg para o PLGA 8515 200 kDa, para o PLGA 5050 100kDa de 31,01 µg/mg e 30,75 µg/mg para a amostra de PLGA 5050 56 kDa. Este método de produção de nanopartículas permite que o fármaco esteja disperso nas nanopartículas de diferentes formas, determinando assim os principais mecanismos de liberação (Verdeiro *et al.*, 2013; Mukerjee e Vishwanatha, 2009). Quando a liberação é rápida existe um indicativo que a maior parte do fármaco disperso está na superfície das nanopartículas, sendo sua liberação controlada por mecanismos de desorção e difusão. Em casos de liberação prolongada por diversos dias, a liberação ocorre por mecanismos de difusão e consequente degradação do polímero. O tamanho de partícula também tem um papel fundamental no perfil de liberação do fármaco. Em sistemas biológicos as nanopartículas têm sua distribuição em tumores facilitada e uma maior internalização.

O perfil do percentual de liberação de vimblastina em relação ao total incorporado as nanopartículas (Figura 4.3) realizada em tampão PBS (pH 7,4) indica que o método de produção e incorporação de vimblastina nas nanopartículas favoreceu sua dispersão próximo a superfície das nanopartículas. Liberando 87,82 – 92,92 % nos primeiros 30 minutos de liberação e de 91,69 % a 96,49 % nas primeiras 24 horas (Tabela 4.3 e Tabela 4.4). Em 7 dias a liberação média de vimblastina foi de 95,55%. O PLGA 8515 200kDa liberou 95,52%, o PLGA 5050 100 kDa 93,80% e o PLGA 5050 54kDa 97,34%. Esta liberação veloz indica que os mecanismos favorecidos para a liberação de vimblastina foram a desorção do

fármaco da superfície da matriz polimérica e a difusão. A liberação foi dividida em dois mecanismos principais iniciados pela desorção, contabilizado por 95,20 % para o PLGA 8515 200 kDa, 90,43 % para o PLGA 5050 100 kDa e 96,46 % para o PLGA 5050 54 kDa, Seguidos por uma etapa de difusão, onde o fármaco contido no interior das partículas atravessa a barreira da matriz polimérica respeitando o coeficiente de difusão.

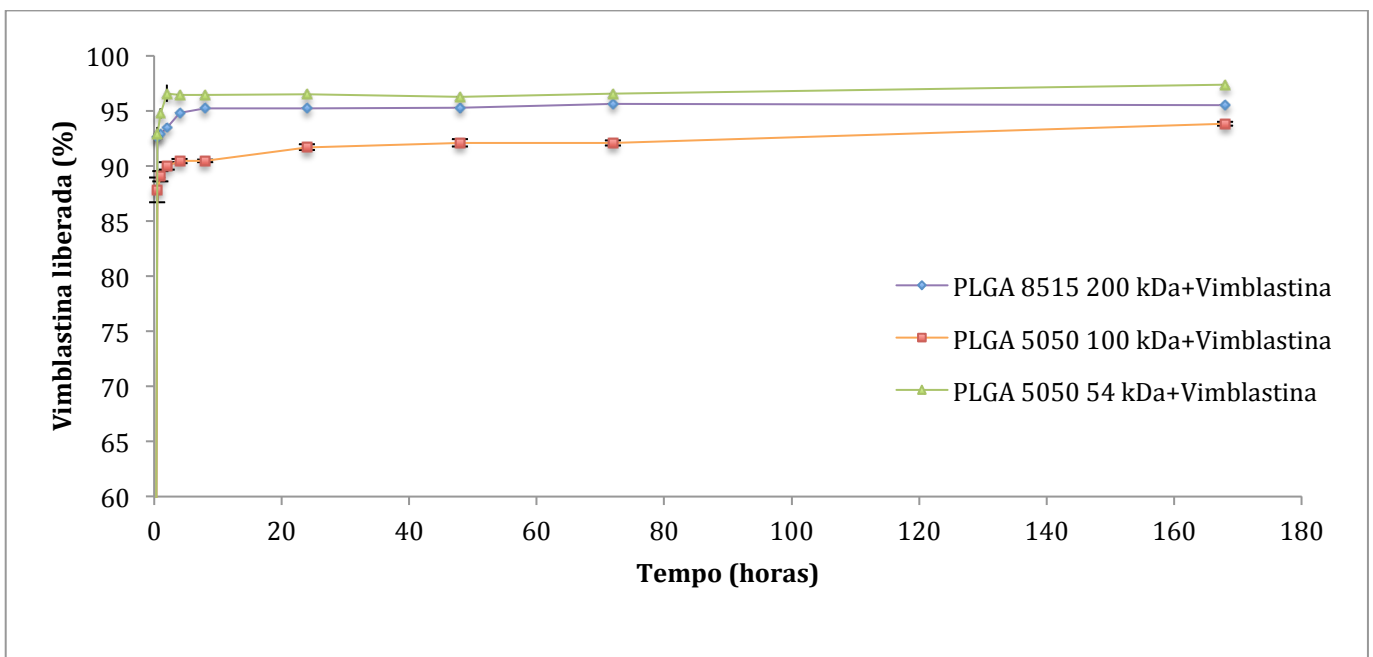


Figura 4.3: Perfil de liberação de vimblastina (%) das nanopartículas de PLGA 8515 200 kDa, PLGA 5050 100 kDa e PLGA 5050 54 kDa

Tabela 4.3: Resultados de liberação de vimblastina por cento em razão do tempo das diferentes nanopartículas de PLGA 8515 200 kDa, PLGA 5050 100 kDa e PLGA 5050 54 kDa produzidas por nanoemulsão.

Amostra	30 minutos	1 hora	2 horas	4 horas	8 horas	1 dia	2 dias	3 dias	7 dias
PLGA 8515 200kDa+Vimblastina	92,93%	92,88%	93,50%	94,79%	95,20%	95,25%	95,25%	95,62%	95,53%
PLGA 5050 100kDa+Vimblastina	87,82%	89,04%	90,02%	90,43%	90,45%	91,70%	92,10%	92,08%	93,81%
PLGA 5050 54kDa+Vimblastina	92,92%	94,76%	96,58%	96,43%	96,43%	96,50%	96,27%	96,57%	97,35%

Tabela 4.4: Desvios padrão dos resultados de liberação de vimblastina por cento em razão do tempo das diferentes nanopartículas de PLGA 8515 200 kDa, PLGA 5050 100 kDa e PLGA 5050 54 kDa produzidas por nanoemulsão apresentados na Tabela 4.3.

Amostra	30 minutos	1 hora	2 horas	4 horas	8 horas	1 dia	2 dias	3 dias	7 dias
PLGA 8515 200kDa+Vimblastina	0.24 %	0.17 %	0.38 %	0.04 %	0.14 %	0.19 %	0.46 %	0.06 %	0.03 %
PLGA 5050 100kDa+Vimblastina	1.12 %	0.46 %	0.35 %	0.19 %	0.12 %	0.27 %	0.34 %	0.23 %	0.18 %
PLGA 5050 54kDa+Vimblastina	0.63 %	0.48 %	0.77 %	0.25 %	0.15 %	0.29 %	0.05 %	0.04 %	0.10v

Os resultados apresentados na Tabela 4.5 e Figura 4.4 mostram que para as três formulações de nanopartículas de PLGA contendo vimblastina potencializaram a atividade do fármaco para as doses mais baixas, 1 e 5 µg/mL. As nanopartículas formuladas com o PLGA 8515 geraram as menores densidades celulares nas amostras de 1 e 5 µg/mL, aumentando significativamente a atividade do fármaco em comparação ao fármaco livre. Ambas amostras de PLGA 5050 obtiveram resultados semelhantes nas duas concentrações iniciais. Para a concentração de 25 µg/mL era esperado uma estabilização ou redução do número de células, mas houve um aumento para as amostras formuladas com o PLGA 5050 de 100 kDa.

O aumento da atividade de vimblastina pode ser explicado pelo fato das partículas agirem como um reservatório, protegendo-a de degradação e promovendo a liberação retardada, mesmo que sua maior parte seja liberada em poucas horas, estes fatores podem contribuir para a manutenção da atividade do fármaco. Os valores de potencial zeta apresentados pelas nanopartículas afetam o tráfego intracelular de nanopartículas, aumentando a atividade destas. A massa molecular dos diferentes PLGAs não influenciaram na viabilidade de células HEP G2.

Tabela 4.5: Tabela de viabilidade celular de células HEP G2 tratadas com diferentes concentrações de vimblastina e nanopartículas de PLGA contendo vimblastina.

Amostra	0 µg/mL	1 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
PLGA 8515 200kDa+Vimblastina	101,29 %	34,46 %	29,49 %	29,23 %	31,03 %
PLGA 5050 100kDa+Vimblastina	135,58 %	41,07 %	34,22 %	42,40 %	32,85 %
PLGA 5050 54kDa+Vimblastina	138,90 %	43,18 %	34,39 %	31,59 %	25,42 %
Vimblastina livre	100,00 %	54,81 %	51,95 %	33,90 %	19,87 %

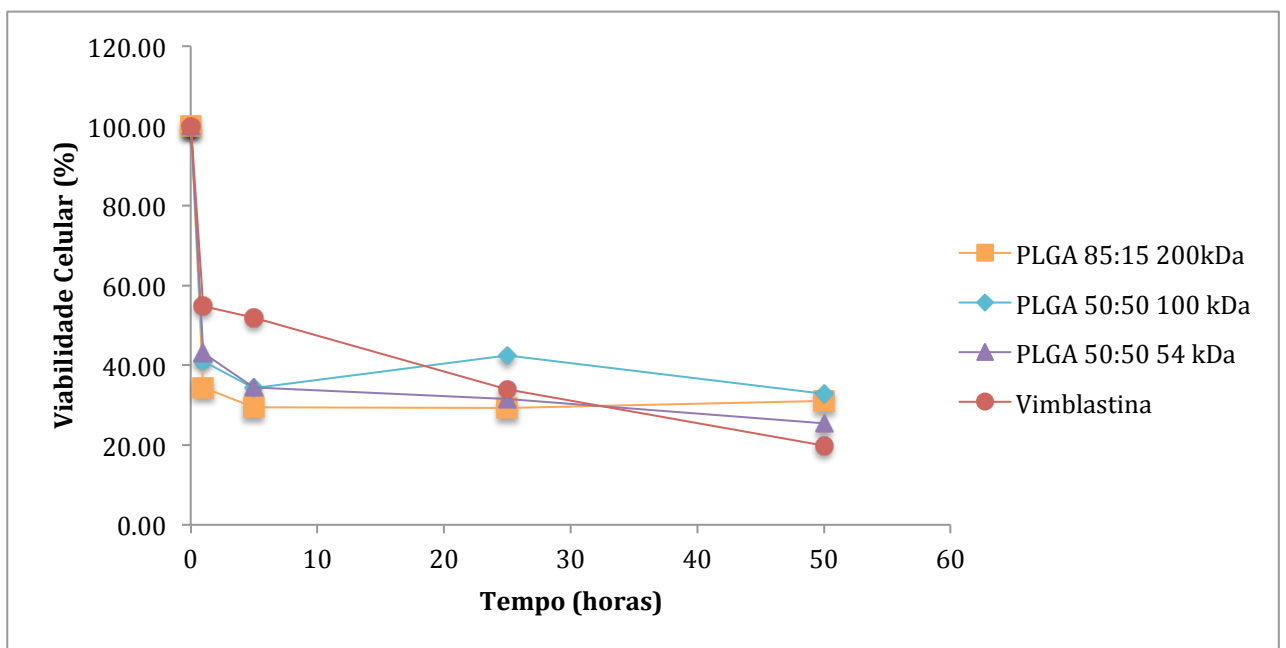


Figura 4.4: Gráfico de viabilidade celular de células HEP G2 tratadas com diferentes concentrações de vimblastina e nanopartículas de PLGA contendo vimblastina.

Os resultados de aumento de atividade de nanoformulações contendo vimblastina quando comparados ao fármaco livre, confirmam estudos de liberação modificada de outros fármacos relatados na literatura (Jin et al., 2009). Os resultados apresentados na tabela 4.5 em relação às nanopartículas de PLGA sem fármaco demonstram a não toxicidade das nanopartículas para as células estudadas.

O perfil de liberação (Figura 4.3) e o aumento de atividade (Figura 4.4) de vimblastina sugerem que, caso estas formulações sejam testadas *in vivo*, as

nanopartículas de PLGA podem auxiliar a carrear a vimblastina até o tumor utilizando o efeito EPR. Este é um estudo inédito de nanopartículas de PLGA contendo vimblastina realizando estudos de liberação e viabilidade celular. Baseado nestes resultados pode-se concluir que estes nanosistemas produzidos por esta tese podem ser promissores carreadores de vimblastina para tratamento de tumores de fígado. Como continuidade a esta tese o próximo capítulo abordará experimentos iniciais para o desenvolvimento de nanopartículas revestidas com glicopolímeros com o objetivo de potencializar a atividade das nanopartículas de PLGA contendo vimblastina.

5. PROPOSTA DE POLIMERIZAÇÃO DE GLICOPOLÍMEROS A PARTIR DE UM INICIADOR BASEADO EM PLGA

Como mencionado no capítulo anterior, os nanosistemas de liberação de fármacos de terceira geração buscam uma mudança de estratégia, unindo em um único vetor diferentes materiais tendo como alvo os tecidos alterados (Serda *et al.*, 2011). A estratégia proposta por este capítulo de produção de nanosistemas de terceira geração para liberação de fármacos em tumores é a utilização de polímeros de sacarídeos ligados a PLGA como estratégia de revestimento.

5.1.1. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são biopolímeros com unidades de açúcares ligados através de ligações glicosídicas (Figura 5.1). Polissacarídeos naturais foram adaptados para diversas aplicações como o aumento de viscosidade em líquidos, produção de cápsulas, formação de géis, entre outros, além de seus usos terapêuticos.

A síntese de polissacarídeos pode ser realizada através das ligações glicosídicas ou ligando os monômeros a uma cadeia polimérica principal, glicopolímeros (Figura 5.1). Devido às inúmeras dificuldades da síntese através das

ligações glicosídicas. Em função da baixa reatividade dos grupos álcoois dos sacarídeos e do baixo e difícil controle da estereosseletividade (fundamental em polissacarídeos), a alternativa mais viável para síntese de grandes quantidades de polímeros de forma controlada é a síntese de glicopolímeros (Lin e Kasko, 2013; Liau *et al.*, 2015).

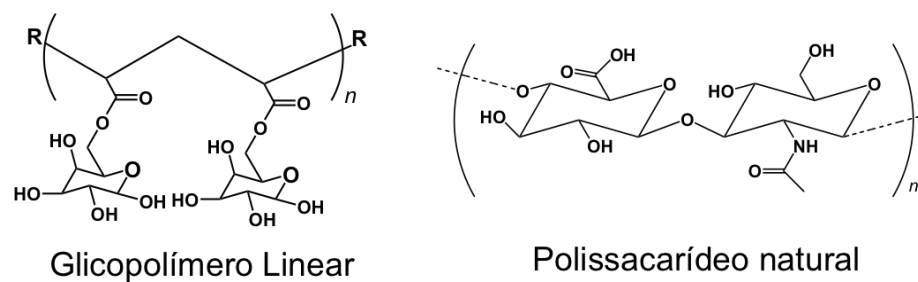


Figura 5.1: Exemplos de um glicopolímero e um polissacarídeo.

5.1.1.1. Glicopolímeros

A pesquisa sobre glicopolímeros se expandiu com diversos experimentos a partir de 1985. Atualmente as principais técnicas para polimerização de glicopolímeros são a Polimerização por Transferência Atômica Reversível (ATRP), Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT) e Polimerização Mediada por Nitróxido (NMP). Este estudo irá se basear principalmente em ATRP e RAFT.

RAFT e ATRP, polimerizações “vivas”, apresentam inúmeras possibilidades de novos polímeros, como diferentes topologias, composição variada, massa molar definida além de novas arquiteturas de cadeias.

As polimerizações radicalares controladas “vivas” estão entre os principais avanços da síntese de polímeros, permitindo a obtenção de polímeros em grande escala, baixo custo e alta variedade de monômeros. Nestas polimerizações existem baixas concentrações de espécies ativas radicalares e os radicais são convertidos em espécies dormentes, reduzindo a probabilidade de terminação. Não existindo as reações de terminação, este sistema pode ser considerado “vivo”, permitindo assim um maior controle sobre a massa molecular (Lin, 2014).

As polimerizações via RAFT utilizam como agentes de polimerizações compostos tiocarbonílicos, os quais reagem com um mecanismo de adição e fragmentação em equilíbrio (Figura 5.2). Os polímeros obtidos via RAFT possuem em seus finais de cadeia partes remanescentes das cadeias dos agentes de RAFT, possibilitando modificações pós-polimerizações como a ligação com novos polímeros ou superfícies (Liau *et al.*, 2015).

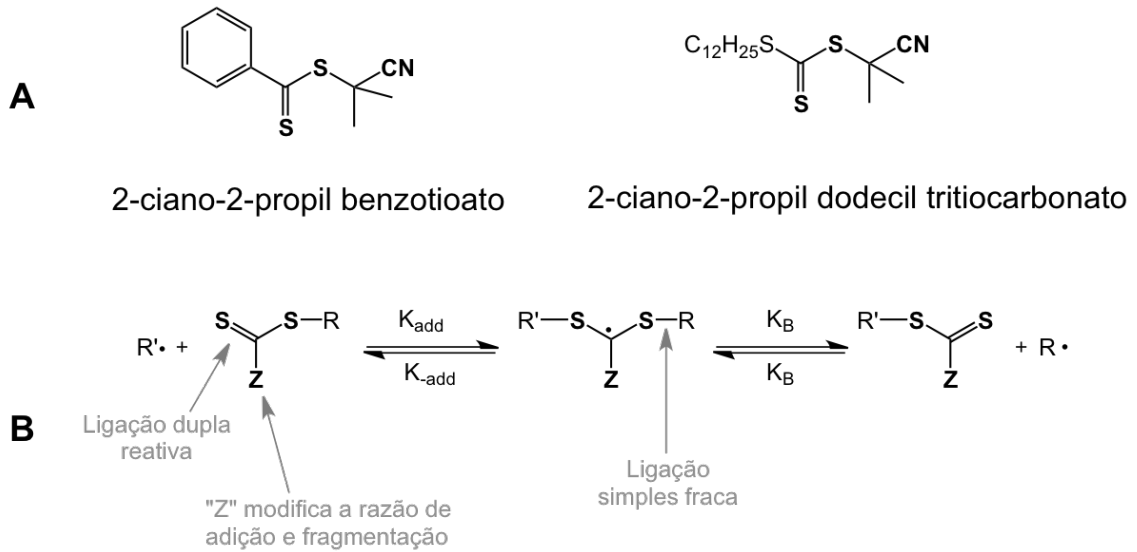


Figura 5.2: (A) Exemplos de agentes de RAFT e (B) mecanismo de polimerização via RAFT.

Adaptado de: Moad *et al.* (2013)

Como mencionado anteriormente, o equilíbrio entre espécies dormentes e ativas são fatores importantíssimos para polimerizações “vivas”. As polimerizações via ATRP utilizam como espécie dormente um composto halogenado e a ativação é realizada por um metal de transição, coordenado por um ligante. O mecanismo de polimerização se inicia com o metal de transição M_x se coordenando com o halógeno e promovendo sua cisão. Assim, a cadeia orgânica se transforma na espécie ativa da polimerização. O metal é oxidado a M_{x+1} e o radical livre inicia sua propagação até a espécie ativa reagir com o metal oxidado, interrompendo a reação. O composto halogenado retorna ao seu estado dormente e o metal retorna a sua forma M_x (Figura 5.3) (Lin e Kasko, 2013).

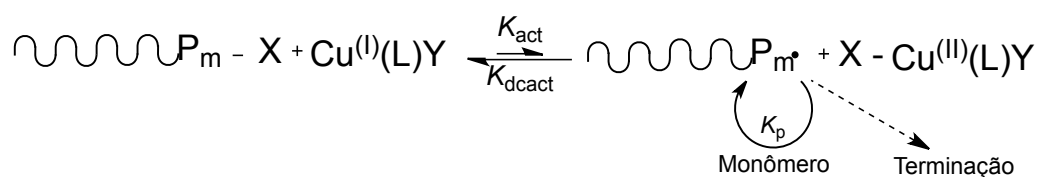


Figura 5.3: Mecanismo de polimerização via ATRP Adaptado de: Peng *et al.*, 2011

5.2. Formação de Corona Proteica em Nanopartículas

É conhecido que nanopartículas, quando em contato com fluidos biológicos, adsorvem biomoléculas, em sua maioria proteínas, gerando uma nova interface entre as nanopartículas e as células. Esta nova interface regula o reconhecimento entre a nanopartícula e seu sítio de ação, podendo esta perder sua atividade ou vetorização. Já foi demonstrado que a corona proteica reduz a adesão de nanopartículas a membranas celulares, reduzindo sua atividade (Lesniak *et al.*, 2012).

Existem diversas estratégias para modificação de topografia de nanopartículas para a redução da formação de corona proteica. Entre as mais utilizadas destaca-se o revestimento de PEG (polietilenoglicol) e a adição de proteínas específicas na superfície das nanopartículas. As nanopartículas revestidas com PEG são frequentemente tidas como inertes e furtivas, mas estudos (Bertrand *et al.*, 2014; Deshayes e Kasko, 2013) demonstram que a frequente aplicação deste material inicia a formação de respostas imunes do organismo a ele, gerando a rejeição ou a formação de cápsulas fibrosas.

Este capítulo propõe como alternativa o revestimento de nanopartículas por glicopolímeros que mimetizem os polissacarídeos presentes em membranas de eritrócitos reduzindo a formação de corona proteica e a toxicidade dos nanosistemas. A parte experimental inicial deste capítulo foi realizada durante período sanduiche no KaskoLab, laboratório situado na *University of California, Los*

Angeles (UCLA) e uma segunda etapa no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) e no Laboratório de Óleo Resinas (LOR), ambos vinculados a PUCRS.

5.3. MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1. Materiais

Metanol (Merck, Alemanha), acetato de amônio (Merck, Alemanha), acetonitrila (J.T. Baker, Estados Unidos), vimblastina (Libbs, Brasil), Manose (Merck, Alemanha), ácido acético (Merck, Alemanha), ácido bromídrico (HBr) (Merck, Alemanha), diclorometano (Merck, Alemanha), trietilamina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), cloreto de acrilóila (Merck, Alemanha), metóxido de sódio (Merck, Alemanha), resina DOWEX 50WX8 200-400 Mesh (Acros Organics, Estados Unidos), galactose (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), acetona (Merck, Alemanha), ácido sulfúrico (Merck, Alemanha), sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck, Alemanha), bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiámid (EDC) (Acros Organics, Estados Unidos), 4-(dimetilamino) piridina (DMAP) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), biotina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), N,N,N,N,N'-pentametildietilenotriamina (PMDETA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), cloreto de cobre (CuCl) (Acros Organics, Estados Unidos), tolueno (Fisher, Estados Unidos), dimetilsulfoxido (DMSO) (Merck, Alemanha), 2,2' azobis(2-metilpropionitrila) (AIBN) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), ácido-2-propanóicoditiolenoato (RAFT CTA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), Poli(ácido láctico-co ácido glicólico) (PLGA) terminado em ácido carboxílico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), álcool polivinílico (PVA) (Merck, Alemanha), etanolamina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 2-cloro-1-propanol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e dimetilformamida (DMF) (Fisher, Estados Unidos)

5.3.2. Monômero Manose Acrilato

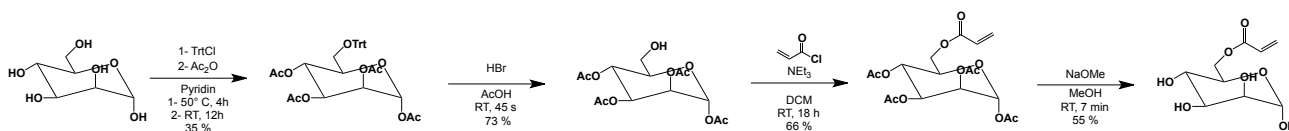


Figura 5.4: Esquema da síntese de 6-acriloxi β -manopirranose.

A síntese de 6-acrilixi manopirranose foi realizada em quatro etapas (Figura 5.4). Inicialmente a hidroxila ligada ao carbono número 6 foi protegida com um grupamento tritil e as demais com grupamentos acetatos. Em seguida o grupo tritil foi retirado e substituído pelo grupamento acriloxi e os grupos acetatos removidos.

5.3.2.1. 6-tritil-1,2,3,4-tetraacetato β -manopirranose

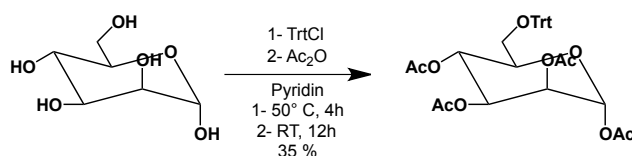


Figura 5.5: Esquema da síntese de 6-tritil-1,2,3,4- tetraacetato β -manopirranose.

Em um balão de 500 mL foram adicionados 20 g de manose (111 mmol) em 200 mL de piridina. Após a solubilização da manose, adicionou-se 32,5 g de cloreto de trifetilmetileno (117 mmol) e aqueceu-se até 50° C por quatro horas. Então, 103 mL de anidrido acético (1,08 mol) foram adicionados e, sob agitação constante, reagiu por 18 horas. Em evaporador rotativo a solução foi concentrada e precipitada

em água (5° C). Os cristais coletados foram lavados com água e precipitados novamente em éter, tendo um rendimento de 35 % (Lin e Kasko, 2013).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5,89 (d, H-1), 5,55 (dd, H-2), 5,41 (t, H-4), 5,11 (dd, H-3), 3,69 (m, H-5), 3,38 (dd, H-6a), 3,21 (dd, H-6b), 2,28, 2,17, 2,01, 1,79 (s, 12H, 4 CH_3).

5.3.2.2. 1,2,3,4-tetraacetato β -manopiranosose

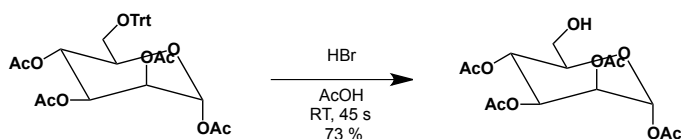


Figura 5.6: Esquema da síntese de 1,2,3,4- tetraacetato β -manopiranosose.

24 g de 6-tritil-1,2,3,4-tetraacetato β -manopiranosose (40,6 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (104 mL). Após completa dissolução, foram adicionados 10 mL de ácido bromídrico e agitado imediatamente e vigorosamente por 45 segundos (Lin e Kasko, 2013).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5,91 (d, H-1), 5,53 (dd, H-2), 5,30 (t, H-4), 5,18 (dd, H-3), 3,81 (m, H-5), 3,67 (m, H-6a, b), 2,25, 2,14, 2,05 (s, 12H, 4 CH_3).

5.3.2.3. 6-acriloxi-1,2,3,4-tetraacetate β -manopiranosose

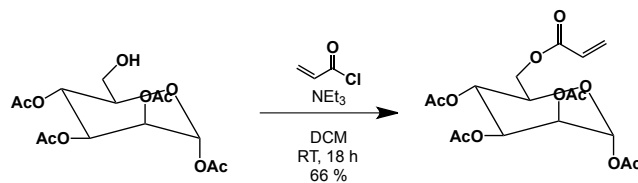


Figura 5.7: Esquema da síntese de 6-acryloxy-1,2,3,4- tetraacetato β -manopirranose.

1,2,3,4-tetraacetato β -manopirranose (4.27 g, 12,2 mmol) foram dissolvidos em diclorometano, a solução foi desoxigenada por N_2 e adicionados 3,42 mL (24,4 mmol) de trietilamina. Em banho de gelo foram adicionados 1,86 mL de cloreto de acrilóila (22,9 mmol dissolvidos em diclorometano). A solução foi agitada por 18 horas e filtrada (Lin, 2013).

Em um funil de separação a solução orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl e seca com Na_2SO_4 . A solução foi concentrada em rotaevaporador e precipitada em éter e filtrada, tendo um rendimento final de 66 % (Lin e Kasko, 2013).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6,51 (d, $CH_2=CH$), 6,20 (m, $CH_2=CH$), 5,93 (d, H-1), 5,53 (dd, H-2), 5,36 (t, H-4), 5,18 (dd, H-3), 3,90 (m, H-5), 4,35 (d, H-6a, b), 2,25, 2,14, 2,05 (s, 12H, 4 CH_3).

5.3.2.4. 6-acrilóxi manopirranose

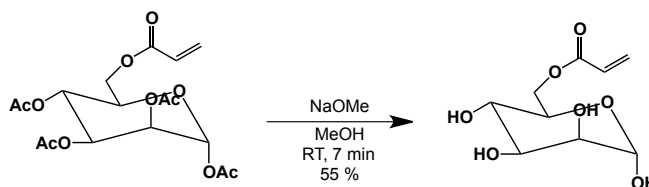


Figura 5.8: Esquema da síntese de 6-acrilóxi- β -manopirranose.

Em um vial foram adicionados 23 μL de metóxido de sódio (solução de 5,4 M em metanol) em 5 mL de metanol e em seguida 0,5 g de 6 acriloxi-1,2,3,4-tetracetato β -manopirranose (1,2 mmol) dissolvidos em 5 mL de diclorometano e agitados. Após 4 minutos se adicionou uma quantidade suficiente de resina Dowex 50WX8 200-400 mesh. A solução foi agitada por mais 30 minutos e filtrada (Lin e Kasko, 2013).

O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando metanol e diclorometano (0 – 40 %) as frações de R_f (fator de retenção) correspondente a 0,2 (CCD metanol diclorometano 25:75) foram coletadas com rendimento final de 55%.

^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 6,37 (d, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 6,13 (m, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,89 (m, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5,03 (s, H-1), 4,32 (o, H-6a, b), 3,91 (q, H-4), 3,81 (d, H-2), 3,73 (dd, H-5), 3,62 (t, H-3).

5.3.3. Monômero Galactose Acrilato

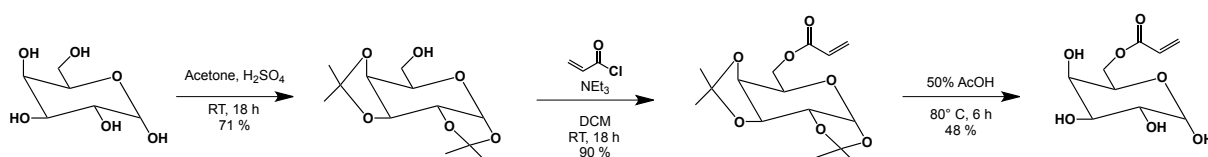


Figura 5.9: Esquema da síntese de 6-acriloxi galactopirranose.

A síntese de 6-acrilixi galactopirranose foi realizada em três etapas (Figura 4.8). Inicialmente as hidroxilas ligadas aos carbonos números um, dois, três e quatro

foram protegidas por grupamentos isopropilidenos. Em seguida a galactose protegida foi acrilada e os grupos isopropilidenos removidos.

5.3.3.1. 1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose

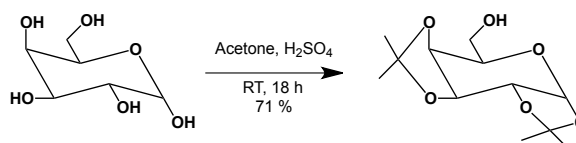


Figura 5.10: Esquema da síntese de 1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose

Uma mistura heterogênea de galactose (5 g, 27,7 mmol) foi agitada por um dia em 50 mL de acetona e ácido sulfúrico (0,25 mL). O produto foi filtrado e a galactose precipitada foi reciclada e adicionada novamente à mistura acetona e ácido sulfúrico. Após 3 ciclos o filtrado foi neutralizado com bicarbonato de sódio e concentrado. O concentrado foi diluído em diclorometano e lavado com duas soluções: primeiro uma solução concentrada de bicarbonato de sódio e em seguida uma solução de cloreto de sódio. A solução orgânica foi concentrada novamente e destilada por destilação fracionada a vácuo (135° C), resultando em um líquido incolor com rendimento de 71% (Lin, 2013).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5,56 (d, H-1), 4,65 (dd, H-3), 4,37 (dd, H-2), 4,26 (dd, H-4), 3,91 (m, H-6a, b), 3,80 (m, H-5), 1,30 – 1,57 (s, 4 CH_3).

5.3.3.2. 6-acriloxi-1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose

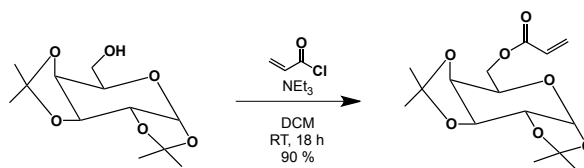


Figura 5.11: Esquema da síntese de 6-acriloxi-1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose

A 1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose (11,7 g, 45,2 mmol) foi dissolvida em diclorometano. A solução foi desoxigenada com N_2 e adicionados 11,3 mL (81,4 mmol) de trietilamina. Em banho de gelo foram adicionados 5,5 mL de cloreto de acrilóila (67,8 mmol dissolvidos em diclorometano). A solução foi agitada por 18 horas e filtrada (Lin, 2013).

Em um funil de separação a solução orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl e seca com Na_2SO_4 . A solução foi concentrada em rotaevaporador e precipitada em éter, tendo um rendimento final de 90 % (Lin e Kasko, 2013).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6,48 (d, $CH_2=CH$), 6,20 (m, $CH_2=CH$), 5,83 (d, $CH_2=CH$), 5,58 (d, H-1), 4,67 (dd, H-3), 4,46 (m, H-4, H-5, H-6a, b), 4,23 (dd, H-2), 1,28 – 1,60 (s, 4 CH_3).

5.3.3.3. 6-Acrlóxi-1,2,3,4-Di-isopropilideno galactopiranosose

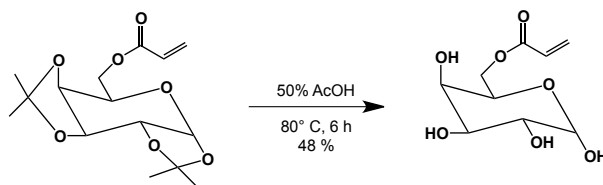


Figura 5.12: Esquema da síntese de 6-acriloxi-1,2,3,4-Di isopropilideno galactopiranosose

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 21 g (66,8 mmol) de 6-Acryloxy-1,2,3,4-Di-isopropylidene galactopyranose e dissolvido em 100 mL de ácido acético. Em seguida foram adicionados 100 mL de água e aquecido a 80° C por seis horas. O ácido acético foi removido em um rotaevaporador e o produto precipitado em acetona. O precipitado foi cristalizado em metanol com rendimento de 48% (Lin, 2013).

^1H RMN (300 MHz, D₂O): δ 6,34 (d, CH₂=CH), 6,09 (m, CH₂=CH), 5,88 (d, CH₂=CH), 5,13 (d, H-1), 4,20 (m, H-5, H-6a, b), 3,92 (dd, H-4), 3,71 (o, H-2, H-3).

5.3.4. Síntese do Monômero Glicose Acrilato

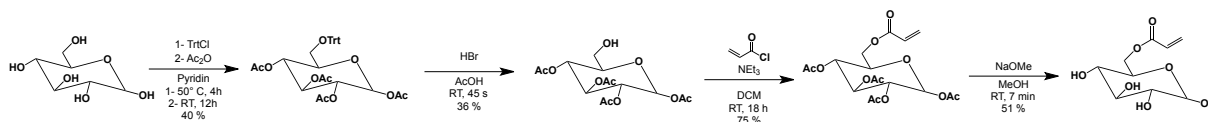


Figura 5.13: Esquema da síntese de 6-acriloxi glicopiranosose

A síntese de 6-acrilixi glicopiranosose foi realizada em quatro etapas (Figura 4.12). Inicialmente a hidroxila ligada ao carbono número seis foi protegida com um

grupamento tritil e as demais com grupamentos acetatos. Em seguida o grupo tritil foi retirado e substituído pelo grupamento acriloxi e os grupos acetatos removidos.

5.3.4.1. 6-tritil-1,2,3,4-tetracetato Glicopirranose

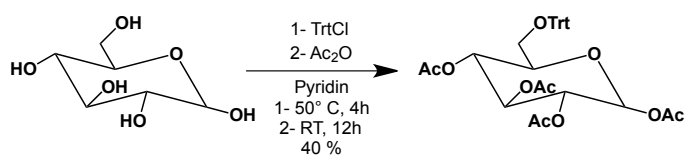


Figura 5.14: Esquema da síntese de 6-tritil-1,2,3,4-tetracetato Glicopirranose.

Em um balão de 500 mL foram adicionados 20 g de glicose (111 mmol) em 200 mL de piridina. Após a solubilização da manose adicionou-se 32,5 g de cloreto de trifetilmetileno (117 mmol) e aqueceu-se até 50° C por quatro horas. Então, 103 mL de anidrido acético (1,08 mol) foram adicionados e, sob agitação constante, o sistema reagiu por 18 horas.

Em evaporador rotativo a solução foi concentrada e precipitada em água a 5° C. Os cristais coletados foram lavados com água e precipitados novamente em éter, tendo um rendimento de 40 %.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7,31 (m, 15H), 5,75 (d, H-1), 5,32 (m, H-2, H-3 e H-4), 3,63 (m, H-5), 3,40 (d, H-6a), 3,18 (dd, H-6b), 2,22, 2,15, 2,02, 1,76 (s, 12H, 4 CH_3).

5.3.4.2. 1,2,3,4-tetracetato Glicopiranoose

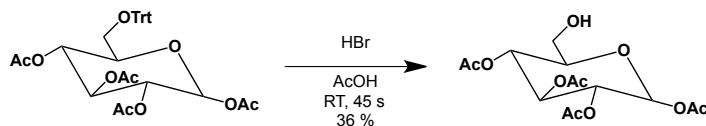


Figura 5.15: Esquema da síntese de 1,2,3,4-tetracetato Glicopiranoose.

22 g de 6-tritil-1,2,3,4-tetracetato glicopiranoose (32,1 mmol) foram dissolvidos em ácido acético (104 mL). Após completa dissolução, foram adicionados 10 mL de ácido bromídrico (33% em ácido acético) e agitado imediatamente e vigorosamente por 45 segundos. Rendimento de 36%.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5,90 (d, H-1), 5,45 (t, H-2), 5,25 (t, H-3), 5,02 (t, H-4), 4,23 (m, H-5), 3,30 (d, H-6a), 2,93 (dd, H-6b), 2,25, 2,18, 2,06, 1,82 (s, 12H, 4 CH_3).

5.3.4.3. 6-acriloxi-1,2,3,4-tetracetato Glicopiranoose

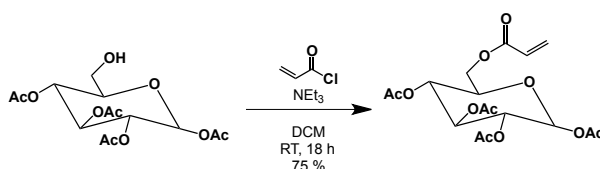


Figura 5.16: Esquema da síntese de 6-acriloxi-1,2,3,4-tetracetato Glicopiranoose.

1,2,3,4-tetracetato glicopirranose (4,27 g; 12,8 mmol) foram dissolvidos em diclorometano, a solução foi desoxigenada utilizando N_2 e adicionados 3,42 mL (24,4 mmol) de trietilamina. Em banho de gelo foram adicionados 1,86 mL de cloreto de acrilóila (22,9 mmol dissolvidos em diclorometano). A solução foi agitada por 18 horas e filtrada.

Em um funil de separação a solução orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaCl e seca com Na_2SO_4 . A solução foi concentrada e precipitada em éter, tendo um rendimento final de 75%.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6,42 (d, $CH_2=CH$), 6,05 (m, $CH_2=CH$), 5,80 (d, H-1), 5,75 (d, H-1), 5,55 (t, H-2), 5,35 (t, H-3), 5,22 (t, H-4), 4,35 (m, H-5), 3,32 (d, H-6a), 2,83 (dd, H-6b), 2,35, 2,19, 2,09, 1,86 (s, 12H, 4 CH_3).

5.3.4.4. 6-acrilóxi Glicopirranose

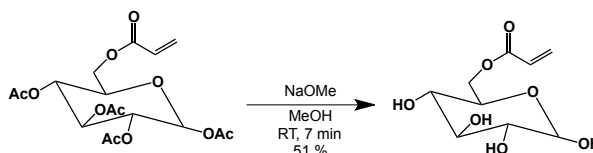


Figura 5.17: Esquema da síntese de 6-acrilóxi Glicopirranose

Em um vial foram adicionados 23 μ L de metóxido de sódio (solução de 5,4 M em metanol) em 5 mL de metanol e em seguida 0,5 g de 6-acrilóxi-1,2,3,4-tetracetato glicopirranose (1,2 mmol) dissolvidos em 5 mL de diclorometano e

agitados. Após 4 minutos se adicionou uma quantidade suficiente de resina Dowex 50WX8 200-400 mesh, A solução foi agitada por mais 30 minutos e filtrada.

O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando metanol e diclorometano (0 – 40%) as frações de Rf correspondente a 0,2 (CCD metanol diclorometano 25:75) foram coletadas com rendimento final de 51%.

^1H RMN (300 MHz, D₂O): δ 6,37 (d, CH₂=CH), 6,13 (m, CH₂=CH), 5,89 (m, CH₂=CH), 5,03 (s, H-1), 4,32 (o, H-6a, b), 3,91 (q, H-4), 3,81 (d, H-2), 3,73 (dd, H-5), 3,62 (t, H-3).

5.3.5. Síntese do iniciador baseado em biotina

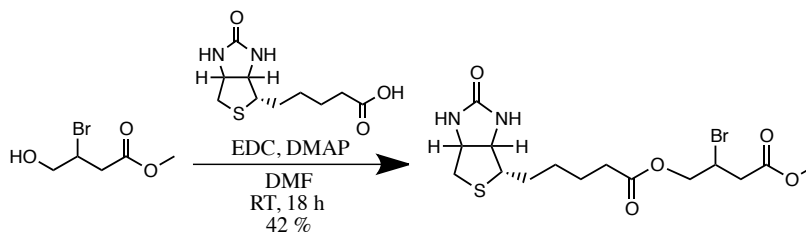


Figura 5.18: Esquema da síntese de iniciador de ATRP baseado em biotina

2-bromo-3-hidroxipropionato (500 mg, 2,70 mmol) foi adicionado a 5 mL de DMF, após total solubilização EDC (640 mg, 3,24 mmol) e DMAP (61 mg, 0,54 mmol) foram adicionados a um balão de fundo redondo. Depois de 15 minutos foi adicionada a biotina (650 mg, 2,70 mmol) em 5 mL de DMF e agitado por 18 horas a temperatura ambiente.

Após a reação o DMF foi reduzido por rotaevaporação, o produto foi precipitado em éter e coletado por filtração. Em seguida uma coluna cromatográfica a vácuo utilizando como fase móvel diclorometano e metanol (50 – 100%). Obtendo rendimento final de 42%.

^1H RMN (300 MHz, DMSO): δ 6,48 (s, H-1), 6,45 (s, H-2), 4,52 (m, H-11), 4,47 (m, H-12 e H-3), 4,12 (m, H-4), 3,61 (m, H-13 e H-14), 3,40 (m, H-6 e H-7) e 1,50 (m, H-7, H-8 e H-9).

5.3.6. Síntese do iniciador baseado em PLGA

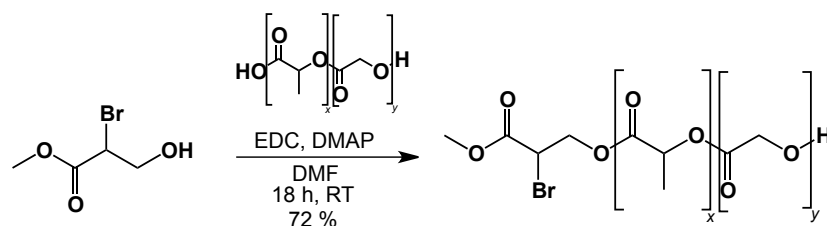


Figura 5.19: Esquema da síntese de iniciador de ATRP baseado em biotina

2-bromo-3-hidroxiopropionato (10,4 mg, 0,57 mmol) foi adicionado a 500 μL de DMF. Após total solubilização, EDC (8,1 mg, 0,52 mmol) e DMAP (1,0 mg, 0,06 mmol) foram adicionados a um balão de fundo redondo. Depois de 15 minutos foi adicionado o PLGA terminado em ácido carboxílico (2,024 mg, 0,44 mmol) em 3 mL de DMF e agitado por 18 horas a temperatura ambiente.

Após a reação o DMF foi evaporado e o produto ressolubilizado em diclorometano, precipitado em metanol e o produto coletado por filtração.

^1H RMN (300 MHz, DMSO): δ 5,45 (m, H-3 e H-6), 4,73 (m, H-2 e H4), 3,50 (d, H-1) e 3,12 (d, H-5).

5.3.7. Polimerização dos monômeros de açúcares a partir do iniciador baseado em PLGA

5.3.7.1. Polimerização dos monômeros de açúcares a partir do iniciador baseado em PLGA em tolueno

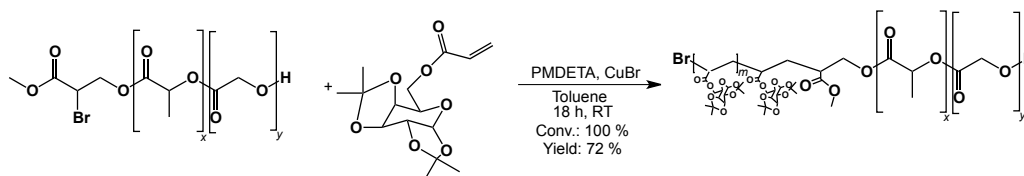


Figura 5.20: Esquema da polimerização via ATRP.

Em um tubo de *schlenk* foram adicionados o iniciador baseado em PLGA (99 mg, 0,021 mmol), galactose acrilato (16,9 mg, 0,540 mmol), CuBr (0,3 mg, 0,021 mmol) em 500 μL de tolueno, após 5 ciclos de congelamento, vácuo e descongelamento, foi adicionado PMDETA (0,9 μL , 0,043 mmol) em tolueno (500 μL), realizados mais 5 ciclos de congelamento, vácuo e descongelamento. Após agitação por 18 horas o produto foi analisado por RMN para verificação da porcentagem de conversão dos monômeros.

5.3.7.2. Polimerização dos monômeros de açúcares a partir do iniciador baseado em PLGA em DMSO

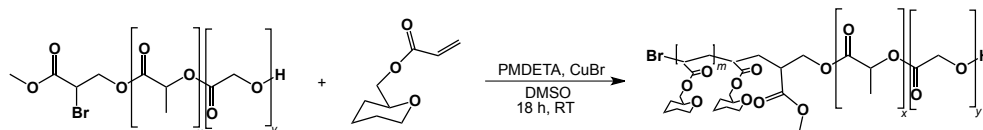


Figura 5.21: Esquema da polimerização via ATRP.

Em um tubo de schlenk foi adicionado o iniciador baseado em PLGA (1 eq.), o monômero de escolha (100 eq.), CuBr (1 eq.) em 500 μ L de DMSO, após 5 ciclos de congelamento, vácuo e descongelamento, foi adicionado PMDETA (2 eq.) em DMSO (500 μ L), realizados mais 5 ciclos de congelamento, vácuo e descongelamento. Após agitação por 18 horas o produto foi analisado por RMN para verificação da porcentagem de conversão dos monômeros.

5.3.8. Polimerização de Monômeros de Sacarídeos por RAFT

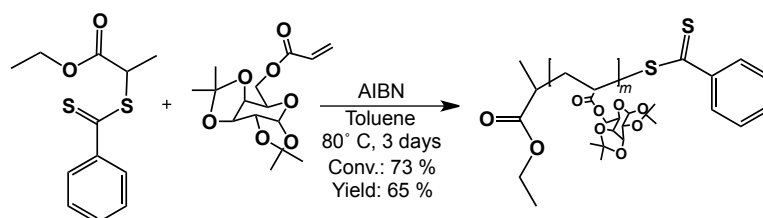


Figura 5.22: Esquema da polimerização via RAFT.

Em um tubo de schlenk foram adicionados o AIBN (0.5 mg, 1.01 mmol), o monômero (100 mmol – Grau de polimerização (GP) 100, 50 mmol – GP50 e 25 mmol – GP25), RAFT CTA (2.5 mg, 3.04 mmol) e 1000 μ L de tolueno. Após 5 ciclos de congelamento, vácuo e descongelamento o conteúdo foi agitado por 72 horas a 80° C. Os produtos foram analisados por RMN para verificação da porcentagem de conversão dos monômeros. Em seguida foi realizada a precipitação em metanol.

Foram sintetizados homopolímeros de galactose, glicose e manose com graus nominais de polimerização de 100, 50 e 25.

5.3.9. Desproteção dos grupos –OH dos polímeros de glicose e manose

Em um vial foram adicionados 23 μL de metóxido de sódio (solução de 5,4 M em metanol) em 5 mL de metanol e em seguida 0,5 g de cada polímero foram dissolvidos em 5 mL de diclorometano e agitados. Após 4 minutos se adicionou uma quantidade suficiente de resina Dowex 50WX8 200-400 mesh. A solução foi agitada por mais 30 minutos e filtrada. Os polímeros foram dialisados por 24 horas em água.

5.3.10. Desproteção dos grupos –OH dos polímeros de galactose

Em um vial foram adicionados 100 mg do polímero de galactose e dissolvido em 10 mL de ácido fórmico, após 2,5 horas adicionados 4 mL de água e agitados por três horas. Os polímeros foram dialisados por 24 horas em água.

5.4. Determinação de Formação de Corona Proteica em Nanopartículas

5.4.1. Ressonância Plasmônica de Superfície

Os polímeros sintetizados via RAFT desprotegidos foram solubilizados em 1 mL de água, em seguida foram adicionados 50 μL de etanolamina e um *chip* de ouro específico para o equipamento Biacore[®] T100. A solução foi agitada por 24 horas em

um agitador orbital. Após agitação o *chip* de ouro foi lavado com etanol e seco com argônio.

No equipamento Biacore T100 foram injetados 30 μ L de soro humano (10% em tampão PBS pH 7,4) por 60 segundos. O chip foi lavado com tampão PBS 7,4 por 5 minutos. Em seguida foi realizada a injeção de lectinas específicas para cada sacarídeo (30 μ L por 60 segundos) e o equipamento lavado novamente com tampão PBS 7,4.

5.4.2. Cromatografia de Permeação em Gel

As análises de cromatografia de permeação em gel foram realizadas em um cromatografo Waters 1515 utilizando THF como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min e utilizando quatro colunas Estiragel[®] ligadas em série. Para análise de massa molecular de polímeros foi realizada uma curva de calibração utilizando poliestireno detectado por um detector de índice de refração Waters 2415.

5.5. Resultados

5.5.1. Síntese dos iniciadores de ATRP

5.5.1.1. Síntese do iniciador baseado em biotina

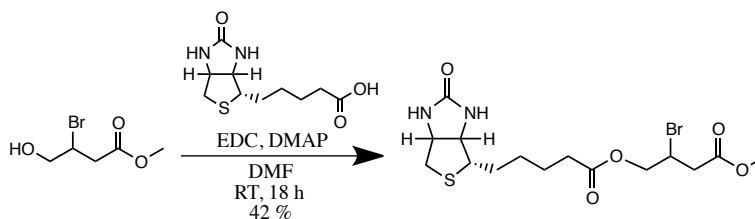


Figura 5.23: Esquema da síntese de iniciador de ATRP baseado em biotina.

A síntese do iniciador de ATRP (Figura 5.23), baseado em biotina, foi realizada para polimerização via ATRP dos glicopolímeros e futura ligação a *chips* de ouro funcionalizados com estreptavidina para uso em ressonância plasmônica de superfície. A síntese foi bem sucedida com 42% de rendimento, sendo recuperada massa de biotina não reagida com a possibilidade de reuso.

5.5.2. Polimerizações via ATRP a partir do iniciador baseado em biotina

Inicialmente foram realizadas diversas tentativas de realizar ATRP em água a partir do iniciador baseado em biotina e posteriormente utilizando um iniciador comercial em água, não obtendo sucesso em nenhuma tentativa. Como estes polímeros seriam utilizados nos experimentos de ressonância plasmônica de superfície a técnica de polimerização foi alterada para RAFT (Item 5.8.3).

5.5.3. Polimerizações via RAFT

Tabela 5.1: Rendimento e conversão dos polímeros obtidos via RAFT.

Grau de polimerização teórico	Rendimento	% de conversão
Galactose GP100	72%	95%
Galactose GP50	54%	77%
Galactose GP25	71%	92%
Glicose GP100	77%	86%
Glicose GP50	72%	88%
Glicose GP25	70%	81%
Manose GP100	73%	70%

As polimerizações realizadas via RAFT (Tabela 5.1) foram bem sucedidas, sendo realizadas polimerizações com diferentes graus de polimerização (25, 50 e 100). Após a desproteção dos grupos acetatos e isopropilidenos ainda era possível identificar picos característicos dos três sacarídeos polimerizados (Figura 5.24).

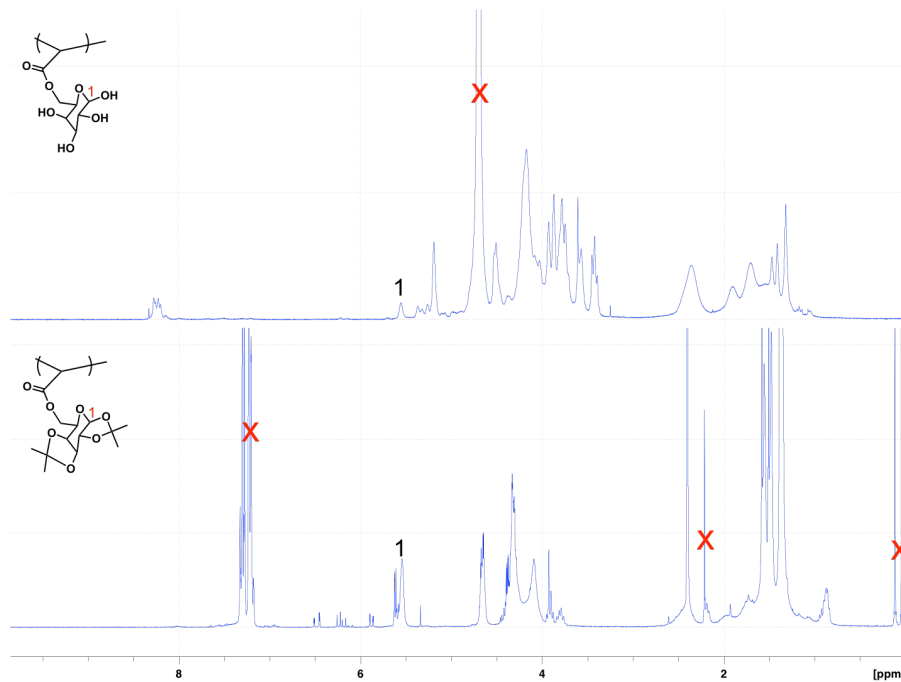


Figura 5.24: RMN do glicopolímero de galactose obtido por RAFT depois de ser desprotegido e antes de ser desprotegido.

5.5.4. Análise da formação de corona proteica por SPR

Como o objetivo destes glicopolímeros é proteger o sistema de liberação de fármacos e a forma de administração seria parenteral, foi proposto utilizar SPR para verificar a ligação dos glicopolímeros a proteínas plasmáticas.

Nesta técnica um alvo é ligado a superfície de um chip de ouro e um ligante é bombeado pelo sistema passando pelo alvo. A ressonância plasmônica de superfície

causa uma redução de intensidade de luz refletida e o equipamento a detecta e a mede, sendo esta proporcional à massa de ligante aderido ao alvo.

Existem diferentes chips utilizados em experimentos, entre eles o de estreptavidina a qual a biotina se liga. Para utilizar este chip sintetizou-se um iniciador baseado em biotina. Conforme o item 5.5.2, as polimerizações a partir do iniciador baseado em biotina não ocorreram, logo, foram sintetizados os glicopolímeros via RAFT para o uso de chips de ouro sem revestimento, Conjugando os tiois livres dos glicopolímeros ao ouro.

Durante a segunda injeção de soro humano (10% PBS pH 7,4) a microtubulação do equipamento Biacore® T100 foi obstruída não sendo observados sinais de ligação proteínas-glicopolímeros. Para não danificar o equipamento os experimentos foram interrompidos.

5.5.4.1. Síntese do iniciador baseado em PLGA

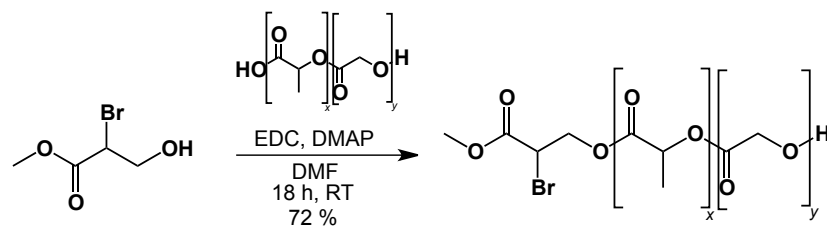


Figura 5.25: Esquema da síntese do iniciador baseado em PLGA

O iniciador baseado em PLGA não havia sido relatado na literatura (Figura 5.25). A análise por RMN apresenta os picos esperados da conjugação de ambas as

moléculas (Figura 5.26). Os 72% de rendimento após a realização de uma coluna cromatográfica para purificação também indicam que o 2-bromo-3-hidroxiopropionato está ligado à cadeia de PLGA.

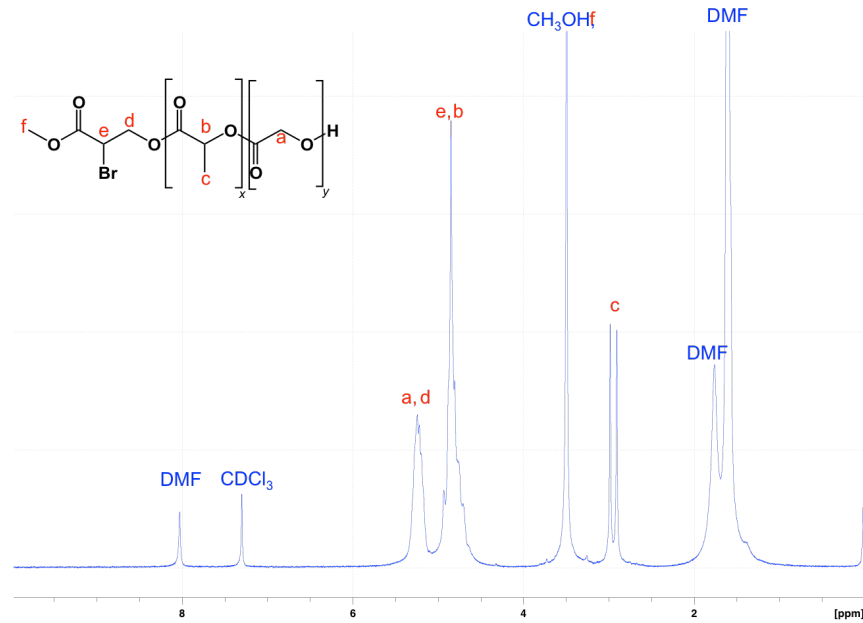


Figura 5.26: RMN do iniciador de ATRP baseado em PLGA.

5.5.5. Polimerizações via ATRP a partir do iniciador baseado em PLGA

Após varias tentativas sem êxito de polimerização via ATRP em água foram realizadas polimerizações em tolueno a 80° C a partir do iniciador baseado em PLGA. Estas polimerizações utilizando 6-Acryloxy-1,2,3,4-Di-isopropylidene galactopyranose tiveram 100% de conversão (Figura 5.27) e rendimento de 72%. Após a clivagem dos grupamentos de proteção das hidroxilas os picos característicos dos sacarídeos desapareceram. Como os grupamentos de proteção formam ésteres, o PLGA é formado por ésteres e o carbono número 6 é ligado a um éster, este comportamento no RMN sugere que a cadeia polimérica foi inteiramente

clivada. Surgindo assim a possibilidade da realização da polimerização via ATRP dos monômeros desprotegidos em DMSO, sem a etapa de desproteção.

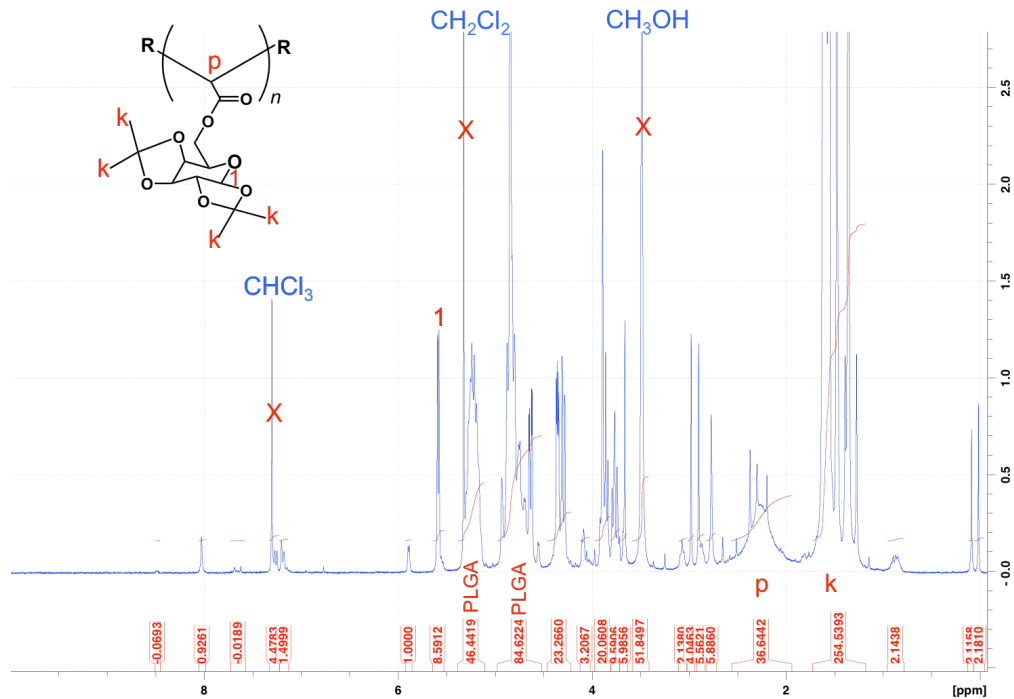


Figura 5.27: RMN do polímero sintetizado via ATRP antes e depois da desproteção com ácido acético.

Foram realizadas polimerizações para via ATRP a partir do iniciador baseado em PLGA, utilizando DMSO como meio e os monômeros de glicose e galactose desprotegidos. Após as quatro horas de polimerização as reações foram terminadas, retirando a atmosfera inerte e oxidando o metal de transição.

As análises por RMN não apresentam picos de acrilato e nem o pico atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono número um da glicose e da galactose. Porém, na análise do possível co-polímero de PLGA e poliglicose surgiu um novo pico em 6,45 ppm, o qual pode se atribuir ao hidrogênio ligado ao carbono número um da glicose deslocado. Para confirmação dos resultados foram realizadas análises por

cromatografia de permeação em gel da amostra do possível co-polímero de PLGA e poliglicose. A amostra de PLGA conjugada à cadeia com o halogeno sintetizada anteriormente apresentou um pico homogêneo de 63 kDa com índice de polidispersão de 1,58 e a amostra da polimerização apresentou um pico de 54 kDa e índice de polidispersão de 1,55. Esta diminuição de massa molecular indica que a polimerização da glicose não ocorreu.

Não existem relatos na literatura de ATRP de sacarídeos desprotegidos utilizando DMSO. Este solvente foi escolhido devido a compatibilidade solubilidade de todos compostos necessários para reação (PLGA, PMDETA, CuCl e os monômeros), apesar de não ser um meio reativo ideal.

No período de conclusão da tese foram publicados estudos realizados por outros grupos de pesquisa (Wilkins et al., 2014; Tengdelius et al., 2015 e An et al., 2015) que colaboram para proposta de utilizar glicopolímeros como estratégia furtiva para liberação de fármacos. Não foi encontrada atividade hemolítica dos glicopolímeros. As partículas contendo glicopolímeros não aderiram a eritrócitos, além da capacidade de terem células tumorais como alvo para endocitose mediada por receptores, comportamento reduzido em fibroblastos.

Como a polimerização via ATRP para este tipo de amostra se torna um processo complicador é sugerido que trabalhos futuros realizem as polimerizações via RAFT e por “*click chemistry*” se ligue o tiol livre do glicopolímero a um PLGA funcionalizado. Utilizando a alternativa de RAFT é possível obter nanopartículas furtivas de PLGA conjugado a glicopolímeros lineares. A vantagem da polimerização

via ATRP seria a, posterior, facilidade de modificar e customizar as cadeias de glicopolímeros e determinar possíveis relações de estrutura e atividade dos revestimentos.

6. CONCLUSÕES

As extrações iniciais de vimblastina a partir de *C. roseus* utilizando água e etanol como cossolventes de dióxido de carbono a 300 bar e a diferentes temperaturas mostraram a viabilidade do método de extração. Os experimentos posteriores utilizando etanol, devido sua seletividade para extração de vimblastina, sua volatilidade e ser atóxico, apresentaram resultados interessantíssimos. Quando comparados a métodos tradicionais de extração como a extração sólido-líquido o resultado encontrado foi de até 92,41% superior. Desta forma, conclui-se que a extração de vimblastina utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol a altas pressões é possível. Trata-se de uma tecnologia limpa, barata e alternativa aos métodos tradicionais de fitoquímica. Estes resultados possibilitam a prospecção de extrações em escala industrial, sendo possível obter extratos mais concentrados reduzindo etapas de purificação. Como a purificação em escala industrial utiliza cromatografia pode ser possível purificar em uma etapa vimblastina, vincristina e seus precursores para semi-síntese (vindolina e catarantina).

A produção de nanopartículas de PLGA contendo vimblastina demonstrou a reprodutibilidade do método de nanoemulsão garantindo a produção de nanopartículas homogêneas, com e sem fármaco. Os resultados de viabilidade celular apresentam que as três formulações de nanopartículas de PLGA contendo vimblastina potencializaram a atividade do fármaco para as doses mais baixas, 1 e 5

$\mu\text{g/mL}$, em relação ao fármaco livre. Estes relatos de nanopartículas de PLGA contendo vimblastina e estudos de liberação e viabilidade celular são inéditos na literatura. Com base nestes resultados pode-se concluir que estes nanosistemas são promissores carreadores de vimblastina para tratamento de tumores de fígado. Estas nanopartículas podem ser facilmente produzidas e utilizadas, visto que o PLGA já é aprovado pelo FDA e ANVISA como um excipiente farmacêutico.

Os estudos realizados de síntese de glicopolímeros apresentaram a síntese inédita de um iniciador de ATRP baseado em PLGA sem o uso de espaçadores de PEG, de fácil síntese e bom rendimento. Este iniciador pode, em futuros estudos, ser utilizado para a modificação de PLGA tanto para seu uso em nanopartículas como em próteses e outros produtos biomédicos. As sucessivas tentativas de polimerização de monômeros de sacarídeos via ATRP em água e DMSO leva a conclusão que esta metodologia não é a mais adequada para sínteses glicopolímeros conjugados a PLGA sem o uso de espaçadores de PEG, indicando que o uso de glicopolímeros lineares sintetizados via RAFT uma futura escolha ideal.

As extrações de vimblastina utilizando misturas de dióxido de carbono e etanol a altas pressões apresentadas nesta tese tem grande possibilidade de *scale up* e uso industrial em um curto espaço de tempo, podendo ter ainda como produtos outros alcaloides purificados na etapa de cromatografia a alta pressão, já estabelecido pela indústria farmacêutica. As nanopartículas de PLGA contendo vimblastina também podem em médio prazo virem a ser produzidas em alta escala, já existindo representantes contendo outros fármacos no mercado. A diferença do uso de vimblastina é sua baixa toxicidade e com efeitos adversos de fácil controle.

Como apresentado anteriormente o uso de glicopolímeros para sistemas de liberação de fármacos é relativamente novo, sendo estes materiais muito utilizados apenas para comprovação de teorias. Seu uso como agente furtivo é promissor, mas sua aprovação pelos órgãos reguladores poderá ser mais demorada, como a aprovação de novos fármacos, com tempo médio de 15 anos, espera-se que no futuro esta seja uma nova classe de nanosistemas furtivos para liberação de fármacos.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- *Scale up* de extrações a altas pressões utilizando etanol e dióxido de carbono;
- Purificação de vimblastina e outros alcaloides de *C. roseus* utilizando cromatografia à alta pressão, metodologia já estabelecida em indústrias farmacêuticas;
- Definição de uma nova metodologia limpa para purificação de vimblastina e outros alcaloides de *C. roseus*, como cromatografia supercrítica;
- Realização de experimentos de proliferação celular, citotoxicidade, indução a apoptose, senescência e autofagia de nanopartículas de PLGA formuladas com vimblastina;
- Realização de experimentos *in vivo* para avaliação de farmacocinética de nanopartículas de PLGA formuladas com vimblastina;
- Síntese de glicopolímeros por RAFT (como descrito nesta tese) e conjugação por “*click chemistry*” a uma cadeia de PLGA funcionalizado;
- Realização de experimentos de viabilidade celular para nanopartículas de PLGA conjugadas a glicopolímeros formuladas com vimblastina;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, TM; Cullis, PR. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, 303:1818–1822, 2004.

ALMEIDA, RN; Neto, RG; Barros, FMC; Cassel, E; et al. Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol+water as co-solvent. **Chemical Engineering and Processing**, 70:95-102, 2013.

AN, J., Zhang, X., Guo, Q. Glycopolymer modified magnetic mesoporous silica nanoparticles for MR imaging and targeted drug delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 482, 98-108, 2015.

ANDERSON, JM; Shive, MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64:72–82, 2012.

ASHBURN, TT; Thor, KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews: Drug Discovery**, 3:673-683, 2004.

BERG, D; Youdim, MB; Riederer, P. Redox Imbalance. **Cell Tissue Research**, 318:201-213, 2004.

BERTRAND N; Wu J; Xu X et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced drug delivery reviews**, 66:2-25, 2014.

BIBLE, E; Chau, DYS; Alexander, MR et al. Attachment of stem cells to scaffold particles for intra-cerebral transplantation. **Nature Protocols**, 4:1440-1453, 2009.

BOUFFET, E; Jakacki, R; Goldman, S et al. Phase II Study of Weekly Vimblastine in Recurrent of Refractory Pediatric Low-Grade Glioma. **Journal of Clinical Oncology**. 30:1358-1363, 2012.

BRUN, GW; Marín, A; Cassel, E et al. Crystallization of Caffeine by Supercritical Antisolvent (SAS) Process: Analysis of Process Parameters and Control of Polymorphism. **Crystal Growth and Design**, 12:1943–1951, 2012.

CARGNIN, ST; Vieira, PB; Cibulski, S et al. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. **Journal of Chromatography B**, 878:83-87, 2010.

CARVALHO JR., RN; Moura, LS; Rosa, PTV et al. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, 5:197-204, 2005.

CASSEL, E; Vargas, RMF; Brun, GW. Supercritical Extraction of Essential Oil from *Ilex paraguariensis* Leaves. **Natural Product Communications**, 3:373–378, 2008.

CASSEL, E; Vargas, RMF; Brun, GW et al. Supercritical Fluid Extraction of Alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**. 100:656 – 661, 2010.

CASSEL, E; Vargas, RMF; Bedinot, C. Unidade Piloto de Extração Supercrítica, **Brazilian Patent** n° PROV020110081175, 2011.

CHABNER, BA; Roberts Jr., TG. Chemotherapy and war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, 5:65-72, 2005.

CHOI, YH; Chin, YW; Kim, J et al. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. **Journal of Chromatography A**, 863:47-55, 1999.

CHOI, YH; Yoo, KP; Kim, J. Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Mass Analysis of Vinblastine from *Catharanthus roseus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 50:1294-1296, 2002.

CHONG CR; Sullivan Jr., DJ. New uses for old drugs. **Nature**, 448:645-646, 2007

COSTA, VP; Braga, MEM; Guerra, JP et al. Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. **The Journal of Supercritical Fluids**, 52:306-316, 2010.

DA PORTO, C; Decorti, D; Kikic, I. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. **Food Chemistry**, 112:1072-1078, 2009.

DESHAYES, S; Kasko, AM. Polymeric Biomaterials with engineered degradation. **Polymer Chemistry**, 51:3531-3566, 2013.

DESHPANDE, PB; Kumar, GA; Kumar, AR et al. Supercritical Fluid Technology: Concepts and Pharmaceutical Applications. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, 65:333-344, 2011.

DILLOW, AK; Dehghani, F; Hrkach et al. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 96:10244-10348, 1999.

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

FERLAY, J, Shin, HR; Mathers, C et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, 127:2893-2917, 2010.

FREDENBERG, S; Wahlgren, M; Reslow, M et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – A review. **International**

Journal of Pharmaceutics, 415:34-52, 2011.

GRIFFIN, DR; Kasko AM. Photodegradable Macromers and Hydrogels for Live Cell Encapsulation and Release. **Journal of American Chemical Society**, 134:13103-13107, 2012.

GRIFFIN, DR; Schlosser, JL, Nguyen, TH et al. Synthesis of Photodegradable Macromers for Conjugation and Release of Bioactive Molecules. **Biomacromolecules**, 14:1199-1207, 2013.

GOMIDE R. **Operações Unitárias**. São Paulo: Edição do Autor, 1983.

HALEY, B; Frenkel, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**, 26:57-64, 2008.

HERVAULT A; Dunn AE; Lim M et al. Doxorubicin loaded dual pH-and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. **Nanoscale**, 2016.

ISHIDA,T; Wang, X; Shimizu, T; Nawata, K; Kiwada, H. PEGylated liposomes elicit and anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. **Jornal of Controlled Release**, 122:349-355, 2007

JENNINGS, DW; Deutsch, HM; Zalkow, LH et al. Supercritical extraction of taxol from the bark of *Taxus brevifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, 5:1-6, 1992.

JIN, H; Xia, F; Jiang, C et al. Nanoencapsulation of lutein with hydroxypropylmethyl cellulose phthalate by supercritical antisolvent. **Product engineering and chemical engineering**, 17:672-677, 2009.

JONES, WE. Dimeric Indole Alkaloid Purification Process. **United States Patent** n°: 3932417, 1973.

JORDAN, MA; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature**

Reviews Cancer, 4:253-265, 2004.

KAKWERE H; Leal MP; Materia ME et al. Functionalization of Strongly Interacting Magnetic Nanocubes with (Thermo) Responsive Coating and Their Application in Hyperthermia and Heat-Triggered Drug Delivery. **ACS applied materials & interfaces**, 71:10132-10145, 2015.

KEISER, M.J.; Setola, V.; Irwin, J.J. et al. Predicting New Molecular Targets for Known Drugs. **Nature**, 462:175-185, 2009.

KLOXIN, AM; Kasko, AM; Salinas, CN et al. Photodegradable Hydrogels for Dynamic Tuning of Physical and Chemical Properties. **Science**, 324:59-63, 2009.

LAFAY-COUSIN, L; Holm, S; Qaddoumi, I et al. Weekly Vinblastine in Pediatric Low Grade Glioma Patients with Carboplatin Allergic Reaction. **Cancer**, 103:2636-2642, 2005.

LESNIAK A; Fenaroli F; Monopoli MP et al. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. **ACS nano**, 6:5845-5857, 2012.

LIANG, Y; Kiick, KL. Heparin-Functionalized Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Drug Delivery Applications. **Acta Biomaterialia**, 10:1588-1600, 2014.

LIAU, W; Bonduelle, C; Brochet, M; Lecommandoux, S; Kasko, AM. Synthesis, Characterization, and Biological Interaction of Glyconanoparticles with Controlled Branching. **Biomacromolecules**, 16:284-294, 2015.

LIECHTY, WB; Kryscio DR; Slaughter, BV et al. Polymer for Drug Delivery Systems. **Annual Reviews Chemical and Biomolecular Engineering**, 1:149–173, 2010.

LIN, K; Kasko A. Effect of Branching Density on Avidity of Hyperbranched

Glycomimetics for Mannose Binding Lectin. **Biomacromolecules**, 14:350-357, 2013.

LIN, Kenneth. **Synthesis of Glycopolymers for Biomedical Applications**. Los Angeles. 2014. 211 p. Tese de Doutorado em Bioengenharia, University of California, Los Angeles, Estados Unidos da América.

LÖVESTAM G; Rauscher H; Roebben G et al. Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes. **JRC Reference Reports**, 2010.

MIELE, E; Spinelli, GP; Miele, E et al. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**, 4:99-105, 2009.

MOAD G; Rizzardo E; Thang SH. RAFT polymerization and some of its applications. **Chemistry—An Asian Journal**, 8:1634-1644, 2013.

MOORE, WN; Taylor, LT. Gaining greater selectivity in the supercritical fluid extraction of digoxin from *Digitalis lanata* leaves. **Phytochemical Analysis**, 8:238-243, 1997.

MUKERJEE A; Vishwanatha JK. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. **Anticancer research**, 29:3867-3875, 2009.

PASQUALI, G; Goddijn, OJM; de Waal, A et al. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. **Plant Molecular Biology**, 18:1121-1131, 1992.

PATRIDGE, E; Gareiss P; Kinch MS; Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug discovery today**, 21:204–207, 2016.

PEER, D; Karp, JM; Hong, S et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, 2:751-760, 2007.

PENG, CH; Kong J; Seeliger F et al. Mechanism of halogen exchange in ATRP. **Macromolecules**, 44:7546-7557 2011.

SAHA, RN; Vasanthakumar, S; Bende, G et al. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. **Mol. Membr. Biol.**, 27:215-231, 2010.

Sande MA; des Rieux A; Fievez V et al. Development of PLGA-mannosamine nanoparticles as oral protein carriers. **Biomacromolecules**, 14:4046-4052, 2013.

SCOPEL, R; da Silva, CF; Lucas, AM; et al. Fluid phase equilibria and mass transfer studies applied to supercritical fluid extraction of *Illicium verum* volatile oil. **Fluid Phase Equilibria**, 417:203-211, 2016.

SEBRA, RP; Kasko, AM; Anseth, KS et al. Synthesis and photografting of highly pH-responsive polymer chains. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 119:127-134, 2006.

SERDA, RE; Godin, B; Blanco, E et al. Multi-Stage delivery nanoparticle systems for therapeutic applications. *Biochemical and Biophysic ACTA*, 1810: 317-329, 2011.

SHANKS, JV; Bhadra, R; Morgan, J et al. Quantification of Metabolites in the Indole Alkaloid Pathways of *Catharanthus roseus*: Implications for Metabolic Engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, 58:333-338, 1998.

Silva, Elisa Feller Gonçalves. **Rapamicina e Frutose-1,6-Bisfosfato diminuem a proliferação de células HEP/HEPG2 via aumento de radicais livres e apoptose.**

Porto Alegre. 2015. 44 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

SIMÁNDI, B; Sass-Kiss, A; Czukar, B et al. Pilot-scale extraction and fractional separation of onion oleoresin using supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, 46:183-188, 2000.

SINKO, P.J. **Martin Físico-Farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 809 p.

STEWART, BW; Kleihues, P. **World Cancer Report**. Lyon: IARC Press. 2003. 354 p.

STINCHCOMBE, TE. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel: a novel Cremophor-EL – Free formulation of paclitaxel. **Nanomedicine**, 2:415-423, 2007.

SVOBODA, GH; Neuss, N; Gorman, M. Alkaloids of *Vinca rosea* Linn. (*Catharanthus roseus* G. Don.) V: Preparation and Characterization of Alkaloids. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, 48:659-666, 1959.

SWEETMAN, S. **Martindale: The complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, 37ed. 2011.

TAYLOR, LT. **Supercritical Fluid Extraction**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 181 p.

TENGDELIUS M; Gurav D; Konradsson P et al. Synthesis and anticancer properties of fucoidan-mimetic glycopolymer coated gold nanoparticles. **Chemical Communications**, 518532-8535, 2015.

TOPAL, U; Sasaki, M; Goto, M et al. Chemical compositions and antioxidant properties of essential oils from nine species of Turkish plants obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 59:619-634, 2008.

VARGAS, RMF; Barroso, MST; Neto, RG et al. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO₂. **Industrial Crops and Products**. 50:430-435, 2013.

VERDEIRO P; Bonetti P; Colombo M et al. Intracellular drug release from curcumin-loaded PLGA nanoparticles induces G2/M block in breast cancer cells. **Biomacromolecules**, 14:672-682, 2013.

VERMA, A; Laakso, I; Seppänen-Laakso, T et al. A Simplificated Procedure for Indole Alkaloid Extraction from *Catharanthus roseus* Combined with a Semi-Synthetic Production Process for Vinblastine. **Molecules**, 12:1307-1315, 2007.

VERMA, A; Hartonen, K; Riekkola, ML. Optimisation of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *catharanthus roseus* using experimental design methodology – comparison with other extraction techniques. **Phytochemical Analysis**, 19:52-63, 2008.

VIANA, LM; Freitas, MR; Rodrigues, SV et al. Extraction of Lapachol from *Tabebuia avellanedae* wood with supercritical fluid: an alternative to soxhlet extraction? **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 20:317-325, 2003.

WANG, X; Ishida, T; Kiwada, H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in enhanced blood clearance of subsequent dose of PEGylated liposomes. **Journal of Controlled Release**, 119:236-244, 2007.

WILKINS LE; Phillips DJ; Deller RC et al. Synthesis and characterisation of glucose-functional glycopolymers and gold nanoparticles: study of their potential interactions with ovine red blood cells. **Carbohydrate research**, 405:47-54, 2015.

WHO. Press Release n° 223, 2013. (Disponível Online em: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf)

YANG, Q; Lai, SK. Anti-PEG immunity: emergence, characteristics, and unaddressed

questions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2015 (Artigo aceito para publicação).

ZHANG, Y; Chan, HF; Leong, KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65:104-120, 2013.

