

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**“Estudos fitoquímicos e avaliação da atividade
antitumoral de extratos vegetais de *Casearia sylvestris*
nanoencapsulados”**

Karen Cristina dos Santos

Dissertação de Mestrado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Estudos fitoquímicos e avaliação da atividade
antitumoral de extratos vegetais de *Casearia
sylvestris* nanoencapsulados”**

Karen Cristina dos Santos*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de MESTRE EM QUÍMICA na
área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA.

Orientador: Moacir Rossi Forim

*** bolsista CNPQ**

**São Carlos - SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237ef

Santos, Karen Cristina dos.

Estudos fitoquímicos e avaliação da atividade antitumoral de extratos vegetais de *Casearia sylvestris* nanoencapsulados / Karen Cristina dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
102 f.

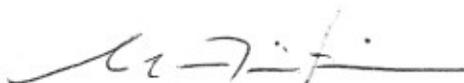
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química orgânica. 2. Próstata - câncer. 3. *Casearia sylvestris*. 4. Nanopartículas poliméricas. I. Título.

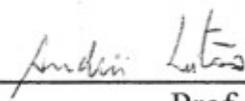
CDD: 547 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

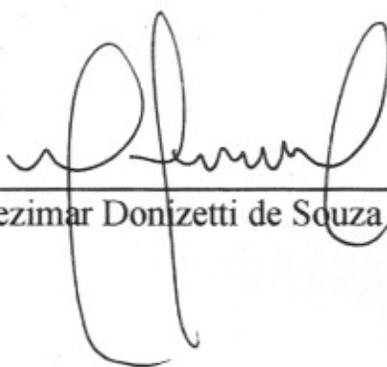
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata **Karen Cristina dos Santos**, realizada em 26 de março de 2013:*



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Prof. Dr. Andrei Leitão



Dr. Gezimar Donizetti de Souza

*Dedico este trabalho a minha amada mãe,
que lutou, sorriu , chorou mas nunca deixou a amargura tomar conta
do seu coração;
que sempre foi forte, sem perder a ternura.
Que me ensinou os caminhos de uma vida honrada, sempre tendo
caráter e palavra firme;
que me ensinou a ser adulta, mantendo os meus sonhos de criança.
Com ela aprendi a ter fé, aprendi a aceitar os defeitos das pessoas.
Aprendi que o amor tem que ser incondicional.
E mesmo quando me afastei de tudo que me ensinou,
com amor e sabedoria divina, novamente me mostrou o caminho
correto.
E se cheguei até aqui, ela é a grande responsável.
Te amo, mamãe.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter renovado minhas forças quando achava que as tinha perdido, por ter criado caminhos onde eu não enxergava mais saída e principalmente pelo privilégio de viver.

Agradeço a minha família, pelo apoio e por entender minha ausência nas longas horas de trabalho no laboratório nos finais de semana.

Agradeço a minha grande amiga, confidente e companheira Leticia pelo apoio emocional pelas infinitas horas perdidas me dando ânimo quando as coisas davam errado, pelos dias que passou corrigindo e me auxiliando na escrita desta dissertação e principalmente pela paciência dispensada em meus momentos de nervosismo.

Ao meu orientador Professor Dr. Moacir Rossi Forim, pela orientação, por ter me acolhido em seu grupo, pela paciência, perseverança e por ter acreditado em mim na realização deste gratificante trabalho.

Ao professor Dr. Andrei Leitão, por abrir as portas de seu laboratório de ensaios celulares (LabECel-NEQUIMED), pelo conhecimento transferido e pela amizade; realmente foi uma apoio fundamental na realização deste trabalho.

Ao professor Thiago Venâncio, pelas análises de RMN, dicas e conselhos dispensados durante a realização deste trabalho.

Aos professores do grupo de Produtos Naturais da UFSCar por todos os ensinamentos durante a realização deste projeto.

Aos professores do DQ/UFSCar, por todo o conhecimento a mim transferido, por todas as colaborações, a todos os funcionários que direta e indiretamente tornou possível o bom desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos: Fabiana, Bruno, Eveline, Patrícia, Inajá, Bárbara e muitos outros pelas contribuições a este trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pela disposição de ajudar sempre que necessário, pela amizade e bom relacionamento durante esse período de convivência.

Às secretarias do PPG por estarem sempre dispostas a ajudar, desempenhando suas atividades com responsabilidade. Aos órgãos de fomento CAPES e CNPQ, pela bolsa e demais auxílios concedidos para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Classes de agentes carcinógenos.....	6
TABELA 1.2: Grupos substituintes das casearinas e casearvestrinas	14
TABELA 3.1:Formulação de nanopartículas, contendo Fração Acetato de etila proveniente do extrato de folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	36
TABELA 3.2: Formulação de Nanopartículas, contendo extrato rico em casearinas proveniente do extrato de folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	36
TABELA 4.1: Dados de RMN de ¹ H da catequina e comparação com dados da literatura.	50
TABELA 4.2: Dados de RMN de ¹³ C da catequina e comparação com dados da literatura.	51
TABELA 4.3: Dados de deslocamentos de RMN de ¹ H do marcador de referência e comparação com a literatura com um composto similar - argutin D - (WHISTSON et al., 2010).	53
TABELA 4.4: ANOVA do modelo de regressão linear para curva de calibração do marcador de referência.	62
TABELA 4.5: Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão e exatidão para determinação do marcador de referência provenientes de folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	62
TABELA 4.6: Massa do marcador de referência contida em 1mg de extratos vegetais de <i>Casearia sylvestris</i>	64
TABELA 4.7: Efeito de interação sobre pH; potencial zeta e eficiência de recuperação para o planejamento fatorial A.....	70
TABELA 4.8: Efeito de interação sobre pH; potencial zeta e eficiência de recuperação para o planejamento fatorial B.....	73
TABELA 4.9: Efeito de interação sobre pH; potencial zeta e eficiência de recuperação para o planejamento fatorial C.	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Transformação de uma célula normal em célula neoplásica (ALMEIDA et al., 2005)	2
FIGURA 1.2: Fármacos utilizados no tratamento de carcinoma de próstata (1) finasterida, (2) flutamida, (3) nilutamida e (4) bicalutamida.....	4
FIGURA 1.3: Estrutura química da Camptotecina (A) e seus análogos Topotecano (B) e Irinotecano (C).....	8
FIGURA 1.4: Estrutura química do Paclitaxel (D) e do Docetaxel (E).....	9
FIGURA 1.5: Estrutura química da Combretastina A-1 (F) e Combretastina A-4 (G)..	9
FIGURA 1.6: Estrutura química da Podofilotoxina (H) e seus derivados semi-sintéticos Etoposídeo (I) e Tenoposídeo (J).....	10
FIGURA 1.7: <i>Casearia sylvestris</i> Swartz, encontrada no cerrado brasileiro, assim como suas flores e frutos (TABAGIBA, 2012).	11
FIGURA 1.8: Estrutura química básica da casearina (K) e outros diterpenos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> , 15-hidróxi-3-clerodano-2-ona (L) e ácido Hardiwickiic (M). ...	13
FIGURA 3.1 : Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	26
FIGURA 3.2: Fracionamento do Extrato rico em casearinas proveniente das folhas de <i>Casearia sylvestris</i>	27
FIGURA 3.3: Fluxograma do fracionamento da fração Acetato de etila e isolamento do diterpeno utilizado como marcador de referência (M.Ref.).....	28
FIGURA 3.4: Fluxograma do fracionamento da fração Acetato de etila e isolamento do composto catequina (Cateq.).	29
FIGURA 3.5: Variáveis utilizadas nos planejamentos fatoriais A, B e C.	34
FIGURA 3.6: Esquema do método de nanoprecipitação.....	35
FIGURA 4.1: Metabólitos secundário isolados de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> , Catequina (A), marcador de referência (B).....	48
FIGURA 4.2: Espectro de RMN de ¹ H do marcador de referência (CDCl ₃ , 400 MHz).	52

FIGURA 4.3: Proposta estrutural do marcador de referência (A) e o composto descrito na literatura (B) (Argutin D).....	54
FIGURA 4.4: Ampliação dos sinais referentes aos hidrogênios olefínicos e carbinólicos.	55
FIGURA 4.5: Ampliação da região dos hidrogênios das posições 18 e 19.	56
FIGURA 4.6: Ampliação da região de metilas olefínicas, ligadas a grupos carboxila e a carbonos sp^3	57
FIGURA 4.7: Estrutura do isômero constitucional (A) e estrutura proposta do marcador de referência (B).....	57
FIGURA 4.8: Espectro de massa típico, no modo negativo, com destaque para o marcador de referência, correspondendo a m/z 681.....	58
FIGURA 4.9: Cromatograma de eluição gradiente do marcador de referência ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$).....	59
FIGURA 4.10: Cromatogramas típicos do marcador de referência (A), nanopartículas vazias (B), fração acetato de etila (C) e extrato rico em caseínas (D).	60
FIGURA 4.11: Curva de calibração do marcador de referência (A), gráfico do fator de resposta (B) e gráfico de análise de resíduo (ANOVA) (C), para todos os níveis de concentração da curva de calibração.....	61
FIGURA 4.12: Cromatograma típico da fração acetato de etila, com destaque pra o marcador de referência em 20,7 minutos.	64
FIGURA 4.13: Esquema do sistema vesiculado da nanocápsula e matriz polimérica maciça da nanoesfera.	65
FIGURA 4.14: Valores obtidos das variáveis dependentes (pH, potencial zeta, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento) referente as suspensões coloidais.	68
FIGURA 4.15: Gráfico de efeito de interação da quantidade de polímero e presença do óleo sobre a eficiência de encapsulamento.....	70
FIGURA 4.16: Gráfico de efeito de interação da quantidade de polímero e tipo de extrato vegetal sobre o potencial zeta.....	73

FIGURA 4.17: Gráfico de efeito de interação da quantidade de polímero e concentração do extrato vegetal (fração acetato de etila) sobre a eficiência de encapsulamento.	75
FIGURA 4.18: Imagem de nanopartículas, não sendo possível detectar a presença de estruturas nanométricas bem definidas e sim apenas superfícies irregulares.	77
FIGURA 4.19: Fotomicrografias de nanopartículas, secas sobre a presença do adjuvante Aerosil® 200, onde se observa partículas micrométricas, constituídas por partículas bem menores com tamanho que varia de 300 a 600nm.....	78
FIGURA 4.20: Coversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazolium em azul de formazan.	79
FIGURA 4.21 : Curva de análise de tolerância de DMSO para as linhagens Balb-c e DU145.	81
FIGURA 4.22: Determinação da curva dose-resposta do quimioterápico Doxorubicina, utilizado como controle positivo.....	82
FIGURA 4.23: Curva de dose –resposta da fração acetato de etila para as linhagens Balb-c e DU145.	82
FIGURA 4.24 : Curva de dose-resposta do extrato rico em casearinas para as linhagens Balb-c e DU145.....	83
FIGURA 4.25: Análise da atividade do composto identificado como catequina para as linhagens Balb-c e DU145.....	84
FIGURA 4.26: Atividade citotóxica das formulações 11, 12 e 13 (formulações de nanopartículas vazias) utilizadas nas linhagens celulares Balb-c e DU145, onde controle representa células sem presença de formulações de nanopartículas.	85
FIGURA 4.27: Atividade citotóxica das formulações 11; 1; 3; 5 e 7, nas linhagens celulares Balb-c e DU145.....	87
FIGURA 4.28: Atividade citotóxica das formulações 12; 2; 4; 6 e 8, nas linhagens celulares Balb-c e DU145.....	88
FIGURA 4.29: Atividade citotóxica das formulações 13; 9 e 10, utilizadas nas linhagens celulares Balb-c e DU145.	89

RESUMO

ESTUDOS FITOQUÍMICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS VEGETAIS DE *CASEARIA SYLVESTRIS* NANOENCAPSULADOS. O termo câncer refere-se a neoplasias que são caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que apresentam algum tipo de mutação genética. O câncer de próstata é a neoplasia com maior incidência em homens. Em sua fase inicial, a neoplasia de próstata é hormônio dependente, dessa forma a terapia atual é baseada no bloqueio da biossíntese de hormônios, porém após o período inicial do tratamento as células neoplásicas voltam a crescer desordenadamente se tornando resistente ao tratamento. Apesar de existirem fármacos em triagens clínicas, ainda se faz necessária a procura de moléculas que exibem atividade contra células neoplásicas prostáticas. Os produtos naturais possuem grande importância no tratamento do câncer. Devido ao seu antigo histórico de efeitos benéficos a saúde humana e principalmente a sua atividade citotóxica sobre células neoplásicas a planta estudada foi a *Casearia sylvestris*. Porém a insolubilidade e biodisponibilidade baixa em meios aquosos dificulta a utilização destes compostos. Na tentativa de diminuir essa limitação, sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos têm sido reconhecidos como veículos promissores. As nanopartículas poliméricas têm sido utilizadas para superar problemas de solubilidade, biodisponibilidade e direcionamento para células alvo (tumor). O objetivo desse trabalho foi o preparo de formulações de nanopartículas poliméricas contendo extrato vegetal de *C. sylvestris* e avaliação da atividade citotóxica em linhagens de células saudáveis e carcinoma de próstata. Para isso, foram desenvolvidos 3 planejamentos fatoriais 2^2 , para análise dos parâmetros: estabilidade em solução, eficiência de encapsulamento e recuperação. As nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, e a estabilidade a eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento foram satisfatórias. Nos ensaios biológicos em células, as formulações de nanopartículas apresentaram seletividade de até 23 % entre células saudáveis e neoplásicas, diminuindo a viabilidade de células de carcinoma de próstata em 45 %. Dessa forma, extratos vegetais de *C. sylvestris* mostraram ser ativos em células neoplásicas, e nanopartículas poliméricas podem ser sistemas de liberação promissores no tratamento de carcinoma de próstata.

Palavras-chave: câncer de próstata, *Casearia sylvestris*, nanopartículas poliméricas.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDIES AND EVALUATION OF THE ANTITUMORAL ACTIVITY OF NANOENCAPSULATED VEGETABLE EXTRACTS OF CASEARIA SYLVESTRIS. The term cancer refers to neoplasias that are characterized by uncontrolled growth of cells that have some kind of genetic mutation. Prostate cancer is the cancer with the highest incidence in men. In its initial phase, the prostate cancer is hormone dependent, so current therapy is based on blocking the biosynthesis of hormones, but after the initial treatment, neoplastic cells grow back inordinately becoming resistant to treatment. Although there are drugs in clinical trials, it's still necessary the search for molecules that exhibit activity against prostate cancer cells. Natural products have a great importance in cancer treatment. Due to its past history of beneficial effects on human health and especially its cytotoxic activity on cancer cells, the plant *Casearia sylvestris* was studied. However, the insolubility and low bioavailability in aqueous media hamper the use of these compounds. In an attempt to reduce this limitation, nanostructured systems for drug delivery have been recognized as promising vehicles. Polymeric nanoparticles have been used to overcome problems of solubility, bioavailability and aiming the target cells (tumor). The purpose of this work was the preparation of formulations of polymeric nanoparticles containing plant extract of *C. sylvestris* and evaluation of cytotoxic activity in cell lines and healthy prostate carcinoma. Thus, 3 factorial 2^2 designs were developed, and parameters as solution stability, recovery and encapsulation efficiency were considered. The nanoparticles were prepared by the method of nanoprecipitation, and the stability, recovery and encapsulation efficiency were satisfactory. In biological tests, the nanoparticles formulations showed selectivity up to 23 % on healthy and neoplastic cells, decreasing the viability of prostate carcinoma cells by 45%. Therefore, plant extracts of *C. sylvestris* shown to be active in cancer cells, and polymeric nanoparticle delivery systems may be promising in the treatment of prostate carcinoma.

Keywords: prostate cancer, *Casearia sylvestris*, polymeric nanoparticles.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 - Neoplasias (Câncer)	2
1.2 - Neoplasia de Próstata	3
1.3 - Agentes Carcinógenos e Fatores de Risco	4
1.4 - Produtos Naturais	7
1.5 - <i>Casearia sylvestris</i> Swarts.....	10
1.6 - Nanopartículas Biopoliméricas	15
1.7 - Nanopartículas Biopoliméricas em Terapias de Câncer	17
2 - OBJETIVOS	20
2.1 - Objetivo Geral.....	20
2.2 - Objetivos Específicos	20
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
3.1 - Estudo Fitoquímico	22
3.1.1 - Materiais	22
3.1.1.1 - Material Cromatográfico	22
3.1.1.1.1 - Reveladores.....	23
3.1.1.1.2 - Solventes	23
3.1.1.2 - Equipamentos.....	24
3.1.2 - Coleta do Material Vegetal.....	25
3.1.3 - Preparo e Fracionamento dos extratos	25
3.1.3.1 - Extrato Etanólico	25
3.1.3.2 - Extrato Rico em Casearinas.....	27
3.1.4 - Isolamento de Metabólitos Secundários de <i>Casearia sylvestris</i>	28
3.1.4.1 - Fracionamento do extrato etanólico	28
3.1.5 - Desenvolvimento e validação do método analítico via CLAE	29
3.1.5.1 - Validação analítica	30
3.1.5.2 - Preparo das Soluções de Trabalho	30

3.2 - Preparação e caracterização das Nanopartículas Poliméricas em Suspensões Coloidais	31
3.2.1 - Materiais	31
3.2.1.1 - Material para preparação de nanopartículas	31
3.2.1.2 - Solventes.....	31
3.2.2 - Equipamentos	32
3.2.3 - Preparação de Nanopartículas em Suspensão Coloidal.....	33
3.2.3.1 - Planejamento Fatorial.....	33
3.2.3.2 - Método Experimental de Produção de Nanopartículas Poliméricas .	34
3.2.4 - Caracterização físico-química das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas.....	37
3.2.4.1 - Determinação do Potencial Zeta	37
3.2.4.2 - Determinação do pH.....	37
3.2.4.3 - Análise quantitativa das suspensões coloidais.....	37
3.2.4.3.1 - Determinação do teor total do marcador de referência nas suspensões coloidais	38
3.2.4.3.2 - Determinação do teor de marcador de referência encapsulado	38
3.2.4.4 - Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura	39
3.3 - Ensaio Biológicos.....	40
3.3.1 - Materiais	40
3.3.1.1 - Linhagens de Células	40
3.3.1.2 - Meio de Cultura	40
3.3.1.3 - Reagentes	40
3.3.1.4 - Materiais Diversos	41
3.3.2 - Equipamentos	42
3.3.3 - Preparo do Meio de Cultura – DMEM (10%FBS).....	42
3.3.4 - Crescimento celular	42
3.3.5 - Ensaio Celulares	43

3.3.5.1 - Ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	43
3.3.5.1.1 - Dose-Resposta do Dimetilsulfóxido (DMSO)	44
3.3.5.1.2 - Dose-Resposta da Doxorubicina (DOX)	44
3.3.5.1.3 - Dose-Resposta da fração acetato de etila, extrato rico em casearinas e catequina	44
3.3.5.2 - Determinação de Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo	45
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
4.1 - Estudo Fitoquímico	48
4.1.1 - Substâncias isoladas e identificadas.....	48
4.1.1.1 - Determinação Estrutural.....	49
4.1.1.1.1 - Flavonóide	49
4.1.1.1.2 - Diterpenóide.....	51
4.1.2 - Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE.....	58
4.1.3 - Validação Analítica.....	59
4.1.3.1 - Seletividade	59
4.1.3.2 - Linearidade, Limite de Detecção e Quantificação	60
4.1.3.3 - Exatidão e precisão	62
4.1.3.4 - Limite de Detecção e Quantificação	63
4.1.4 - Quantificação do marcador de referência nos extratos vegetais	63
4.2 - Suspensões Coloidais de Nanopartículas Poliméricas.....	65
4.2.1 - Preparação das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas ...	65
4.2.2 - Planejamento Fatorial	67
4.2.3 - Caracterização físico-química das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas.....	67
4.2.3.1 - Análise morfológica das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	77
4.3 - Ensaios Biológicos.....	79
4.3.1 - Avaliação da atividade citotóxica	79

5 - CONCLUSÃO	92
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO I.....	102

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Neoplasias (Câncer)

As neoplasias, popularmente conhecidas como câncer, são patologias antigas, com relatos em humanos datados de 3.000 a.C em papiros egípcios se referindo a tumores de mama. Séculos depois na Grécia antiga 360 a.C, Hipócrates diferenciou os tumores malignos de benignos (REDDY et al., 2003).

Atualmente, o termo câncer se refere a neoplasias que são caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que apresentam algum tipo de mutação genética, podendo ser também chamadas de células transformadas ou células que sofreram carcinogênese (Figura 1.1). As neoplasias correspondem a um conjunto de mais de 100 doenças associadas a vários sistemas do corpo humano. Essas células transformadas podem adquirir características metastásicas, assumindo a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes do seu local de origem (ALMEIDA et al., 2005).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, tendo um número anual de aproximadamente 6 milhões de casos, perdendo apenas para doenças cardiovasculares (SRIVASTAVA et al., 2005). Estima-se que no Brasil somente no ano de 2012, 520 mil novos casos de neoplasias foram diagnosticados. Entre elas, as neoplasias de pele não melanômica, próstata, mama e pulmão foram os mais comuns (INCA, 2012).

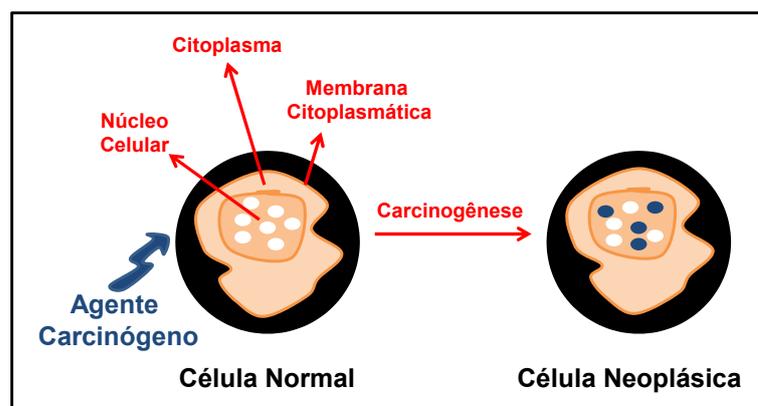


FIGURA 1.1: Transformação de uma célula normal em célula neoplásica (ALMEIDA et al., 2005)

1.2 - Neoplasia de Próstata

O câncer de próstata é a neoplasia com maior incidência em homens, sobretudo na faixa etária acima dos 40 anos. De acordo com levantamentos do DATASUS-INCA, entre 2002 a 2010 esta patologia afetou aproximadamente 13% da população masculina (INCA, 2012). O quadro atual tende a crescer, devido ao aumento da expectativa de vida da população. O mesmo levantamento descreve um aumento no número de casos de neoplasia na população brasileira no período de 1980 a 2010. Entre os diferentes tipos de neoplasias diagnosticadas neste período o câncer de próstata apresentou o maior aumento percentual geral variando de 7,3 para 13,8% (INCA, 2012).

A próstata é um órgão importante para a fertilidade masculina, sendo responsável pela produção de partes dos componentes do líquido seminal. A próstata se torna disfuncional aumentando seu tamanho, sendo este um quadro clínico conhecido como hiperplasia prostática benigna (TIWARI et al., 2005). Em geral, essa patologia é de fácil tratamento, podendo ser realizada por meio da farmacoterapia ou intervenção cirúrgica. Além disso, o quadro patológico deve ser constantemente monitorado observando algumas alterações malignas, que configura o câncer de próstata. Em sua fase inicial, a neoplasia de próstata é hormônio dependente, isto é, multiplica-se a partir da ação dos hormônios testosterona e principalmente, diidrotestosterona no receptor andrógeno (GAO et al., 2005). Dessa forma a terapia atual é baseada no uso de finasterida, a fim de bloquear a biossíntese de diidrotestosterona e de antagonistas do receptor andrógeno, com alguns fármacos não esteroidais como flutamida, nilutamida, bicalutamida (TRAN et al., 2009) ilustrados na Figura 1.2.

Apesar de existir centenas de fármacos em triagens clínicas, como MDV3100 e YM155, que já apresentaram resultados prévios promissores, ainda se faz necessária a procura de moléculas que exibem atividade contra células neoplásicas prostáticas (CLINICAL TRIALS, 2012).

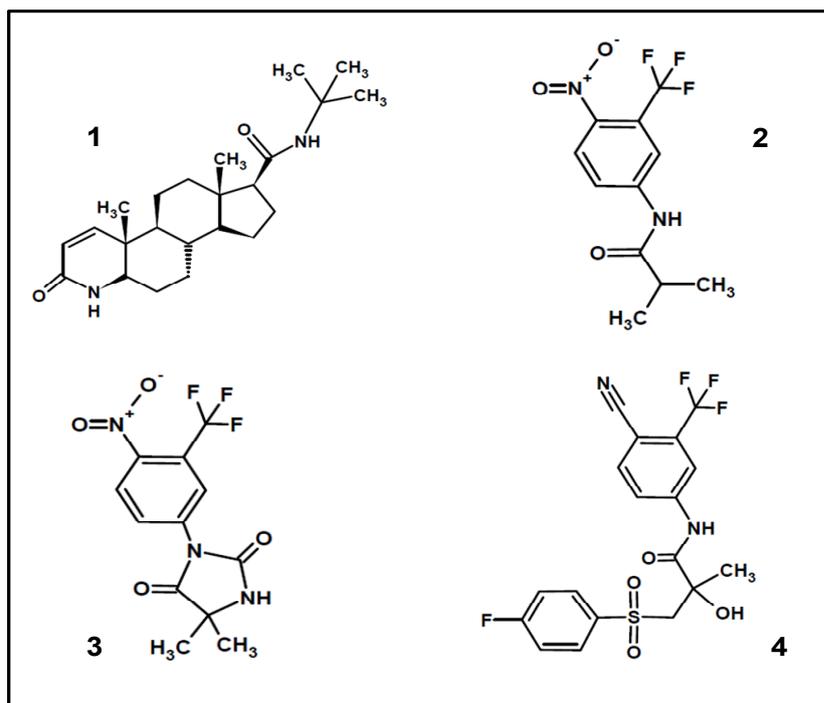


FIGURA 1.2: Fármacos utilizados no tratamento de carcinoma de próstata (1) finasterida, (2) flutamida, (3) nilutamida e (4) bicalutamida.

1.3 - Agentes Carcinógenos e Fatores de Risco

A vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pelo ambiente tem motivado um aumento significativo no número de estudos sobre lesões e alterações genéticas, induzidas por substâncias químicas, físicas e biológicas (BRAMBILLA & MARTELLI, 2009).

Nos seres vivos, o material genético é definido por uma ordem específica de nucleotídeos na molécula de DNA. Porém, as bases nitrogenadas que compõem esta molécula frequentemente estão expostas a agentes naturais ou artificiais, que podem provocar alterações estruturais ou composição química, denominadas mutações (ZAHA et al., 2003). A maior parte dos agentes mutagênicos exibe um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores como: modificações de bases, quebra de filamentos e incorporações de bases modificadas. Essas alterações provocam respostas por parte do organismo. Algumas dessas modificações podem ser corrigidas, mas outras são irreversíveis, onde o material genético é duplicado gerando fitas de DNA alteradas. (PRESTON et al., 1987).

Alterações irreversíveis no DNA são o ponto de partida da carcinogênese, ou seja, a conversão de uma célula normal em uma célula maligna.

Este processo é geralmente lento, podendo demorar anos para que uma célula modificada de origem a um tumor clinicamente detectável. O início da carcinogênese se dá através da exposição de células a agentes carcinógenos repetidamente, sendo que a progressão clínica é caracterizada pela proliferação descontrolada e contínua de células modificadas ou malignas, evoluindo para manifestações clínicas e metástase (LOUREIRO et al., 2002).

Atualmente diversas substâncias potencialmente mutagênicas ou carcinogênicas estão presentes no cotidiano em diferentes contextos, como: radiação, vírus, hábitos alimentares e sociais, medicamentos, agrotóxicos, além da poluição típica de grandes centros urbanos (DOLL & PETO, 1998). A maioria dos carcinógenos apresenta uma propriedade em comum, são eletrofílicos altamente reativos que reagem em regiões nucleofílicas na célula, ou seja, regiões ricas em elétrons. Evidências apontam o DNA como alvo primário. Nessas ligações são formados os adutos de DNA sendo que a base de DNA mais suscetível a esse tipo de ataque é a guanina. Tais adutos podem levar a mutações iniciando o processo de carcinogênese (CALVIELLO, 2006). Os carcinógenos podem ser divididos em várias classes, como mostrados na Tabela 1.1. Os genotóxicos são aqueles que alteram a estrutura primária do DNA, os pró-carcinógenos são compostos que necessitam de ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos. Por último os carcinógenos epigenéticos não alteram a sequência primária do DNA, e sim os eventos relacionados à proliferação e diferenciação celular (REDDY et al., 2003).

Evidências demonstram que os cânceres humanos resultam da exposição a fatores ambientais como fumo e dieta, comportamento sexual e reprodutivo, infecções e exposições ocupacionais, além de fatores genéticos. Pelo menos 35% dos cânceres são causados pela dieta. Porém, nos casos de câncer de cólon, hábitos alimentares chegam a ser responsáveis por 80% dos casos. Quando se adiciona álcool e tabagismo a essa dieta a percentagem sobe drasticamente. Além disso, a predisposição genética é responsável por 20% da incidência de câncer. Logo, a grande maioria dos casos de câncer está associada a fatores ambientais, somados a comportamentos de risco adquiridos pelo indivíduo (REDDY et al., 2003).

TABELA 1.1: Classes de agentes carcinógenos.

Classe	Exemplos
Carcinógenos Genotóxicos	
Primários, agentes alquilantes diretos	Dimetilsulfato, β -propiolactonel, etileno imina, safrol
Pró-carcinógenos	
Hidrocarbonetos aromáticos Policíclicos	Benzo[a]pireno
Nitrosaminas	Dimetilnitrosamina
Hidrazina	1,2-Dimetilhidrazina
Inorgânico	Cádmio, plutônio
Carcinógenos Epigenético	
Promotores	Ésteres de forbol, sacarina, ácidos biliares
Hormônios	Estrógenos
Imunossupressores	Análogos da purina
Cocarcinógenos	Catecol
Não-classificados	
Proliferadores de Peroxissoma	Ésteres de ftalato

Fonte: REDDY et al., 2003

1.4 - Produtos Naturais

É considerado produto natural todo composto gerado essencialmente pela biossíntese de determinada planta, micro-organismo ou animal, sendo fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas biossintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações em seu benefício próprio em muitas áreas, entre elas, na produção de fármacos. Do analgésico morfina ao antibiótico penicilina, passando pelo anticâncer paclitaxel (Taxol[®]), estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou derivados (COSTA-LOTUFO et al.,2009).

Entre 1981 e 2010, das 1.130 novas substâncias químicas aprovadas como fármacos (*US Food and Drug Administration*, FDA), 27% foram produtos naturais ou derivados destes. Ainda, no mesmo período, outros 22% foram derivados de moléculas sintéticas que mimetizam os produtos naturais. Mesmo com o grande interesse em modelagem molecular, química combinatória e técnica de síntese química por instituições de pesquisa e indústria farmacêutica, os produtos naturais, particularmente, as plantas medicinais, permanecem como uma importante fonte de novos agentes terapêuticos contra doenças infecciosas, câncer, imunomodulação, dislipidemias, e etc. (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Aproximadamente 74% dos principais produtos medicinais obtidos de produtos naturais foram descobertos através da orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular. A utilização de diversas plantas na medicina popular representa uma investigação pré-clínica que não pode ser ignorada ou desprezada. O Brasil dispõe de uma imensa biodiversidade, que contém grande potencial químico e relativa facilidade de coleta (BRAZ FILHO, 2010).

A biodiversidade dos biomas brasileiros pode e necessita ser estudada para a descoberta de novas plantas medicinais. A interação entre plantas e seus predadores naturais também pode ser utilizada como suporte para a descoberta de substâncias ativas e, por sua vez, orientar as investigações farmacológicas. Portanto a investigação, isolamento e determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo vegetal representam importância fundamental para o desenvolvimento da própria química de produtos naturais e contribuem para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país. A diversidade estrutural de substâncias isoladas da flora brasileira, e o potencial relevante desse

arsenal químico podem se revelar como solução para inúmeros problemas de saúde pública (BRAZ FILHO, 2010).

Ainda hoje a elucidação de componentes ativos presentes nas plantas, e seus mecanismos de ação, continua sendo um dos maiores desafios para química de produtos naturais e ciências farmacêuticas (GEBHARDT, 2000). As plantas contêm inúmeros constituintes que, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes e estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (WATTENBERG, 1985).

Os produtos naturais também possuem grande importância no tratamento do câncer e, de fato, muitas das novas aplicações clínicas de metabólitos secundários oriundos de plantas e seus derivados têm sido relacionadas ao combate do câncer (BUTLER, 2004). De todas as drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2010, 41% são produtos naturais ou derivados e outros 22% são substâncias sintéticas inspiradas em moléculas naturais (NEWMAN & CRAGG, 2012).

O alcalóide natural camptotecina (Figura 1.3), foi primeiramente isolado do caule da planta ornamental *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) (WALL et al., 1966). Com uma excelente atividade citotóxica, a camptotecina inibe a topoisomerase I, agindo inicialmente contra tumores de pâncreas e de cólon (STAKER et al., 2002). Todavia a camptotecina apresentou efeitos adversos severos (SRIVASTAVA et al., 2005). A manipulação estrutural produziu análogos da camptotecina solúveis em água, incluindo o Topotecano (Hycamptin[®]) (Figura 1.3) e o Irinotecano (Camptosar[®]) (Figura 1.3), aprovados para o uso clínico (ORMROD & SPENCER, 1999).

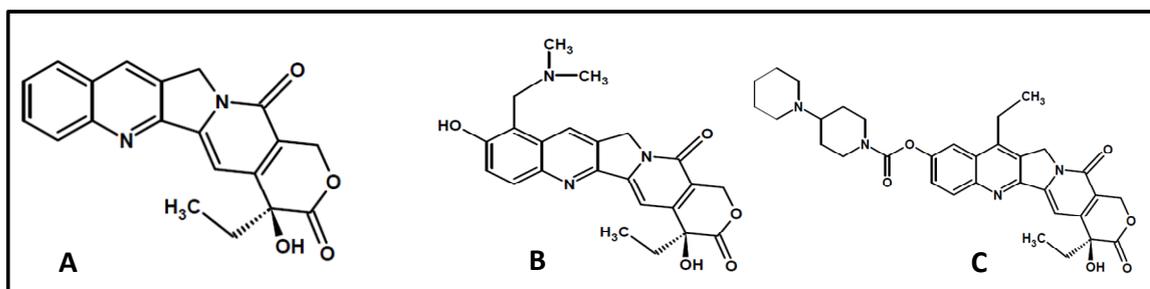


FIGURA 1.3: Estrutura química da Camptotecina (A) e seus análogos Topotecano (B) e Irinotecano (C)

O Paclitaxel (Taxol[®]) (Figura 1.4), um diterpenóide complexo polioxygenado, isolado da casca de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), apresentou resultados promissores em cânceres de pulmão, ovário, mama e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, sendo aprovado pelo FDA para tratamento de metástase de carcinoma de ovário (EISENHAUER & VERMORKEN, 1998). Porém, apresenta uma baixa biodisponibilidade devido a sua pouca solubilidade em meio aquoso (HORTWIZ, 2004). Posteriormente um análogo estrutural conhecido como Docetaxel (Taxotere[®]) (figura 1.4) com propriedades farmacológicas melhoradas foi disponibilizado no mercado (BISSERY, 1991), sendo usado no tratamento de pacientes com metástase avançada de câncer de mama e de pulmão (PADZUR et al.,1993).

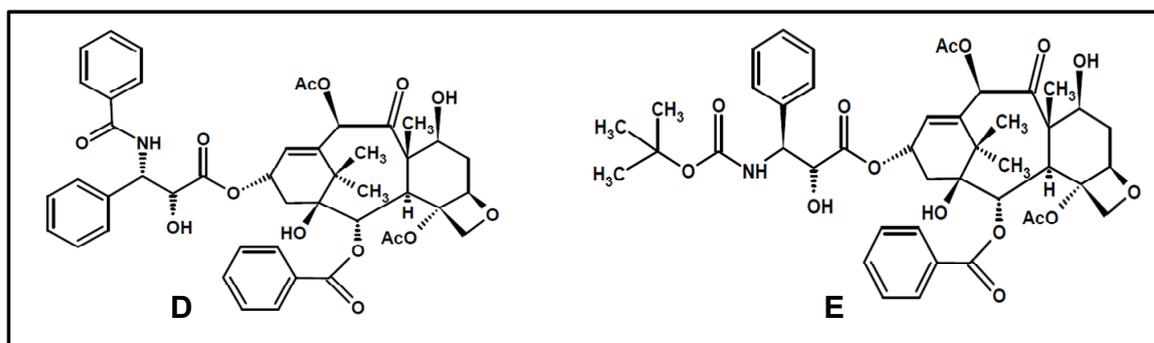


FIGURA 1.4: Estrutura química do Paclitaxel (D) e do Docetaxel (E).

As Combretastinas A-1 e a A-4 (Figura 1.5), encontradas na casca da árvore africana *Cobretum caffrum*, são derivadas de estilbeno possuindo dois anéis separados por uma ligação dupla de carbono, sendo que a mais potente a CA-4[cis-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(3'-hidroxo-4'-metoxifenil)eteno], apresentou alta atividade contra uma variedade de linhagens celulares de câncer (EL-ZAYAT et al.,1993).

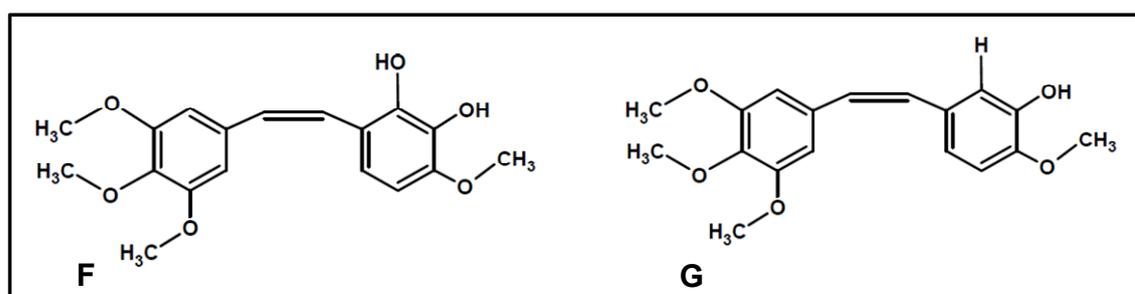


FIGURA 1.5: Estrutura química da Combretastina A-1 (F) e Combretastina A-4 (G).

A *Phodophyllum peltatum* (Berberidaceae), foi usada inicialmente por índios no tratamento de cânceres de pele e verrugas venéreas. Seu principal constituinte, a podofilotoxina (Figura 1.6), é um lignano bioativo, efetivo contra tumores de Wilms, pulmão, linfoma não-Hodgkin e vários cânceres genitais (SUBRAHMANYAN et al.,1998). Apesar disso, a sua aplicação foi frustrada por causar inúmeros efeitos colaterais. Posteriores modificações estruturais resultaram em duas drogas semi-sintéticas mais potentes e menos tóxicas: o etoposídeo (vepeside[®]) e o tenoposídeo (Vumon[®]) (Figura 1.6), que são prescritas no mundo inteiro para o tratamento de linfomas, leucemias agudas, teratomas, cânceres de ovário, pulmão, bexiga e cérebro (SCHACTER, 1996).

Como quimioterápicos eficazes derivados de produtos naturais ainda pode-se citar a vimblastina (Velban[®]) e a vincristina (Oncovin[®]), que são derivadas da *Catharantus roseus* e *Vinca rósea*, respectivamente (BRANDÃO et al., 2010).

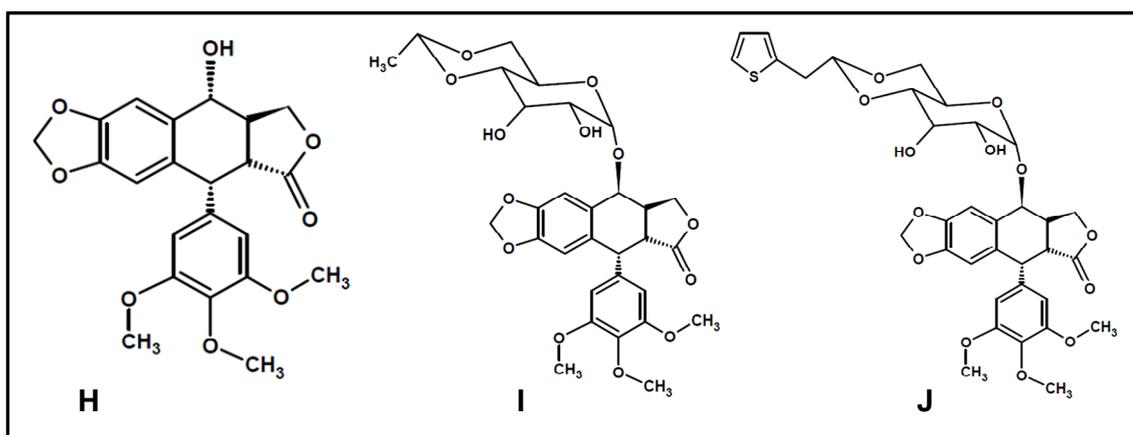


FIGURA 1.6: Estrutura química da Podofilotoxina (H) e seus derivados semi-sintéticos Etoposídeo (I) e Tenoposídeo (J).

1.5 - *Casearia sylvestris* Swarts

Casearia sylvestris Swarts (Figura 1.7), planta anteriormente pertencente à família Flacourtiaceae e mais recentemente reclassificada como integrante da família Salicaceae, é composta por 89 gêneros e 1300 espécies, sendo encontrada por toda a América Latina, tendo ocorrência em toda extensão brasileira (SILVA et al., 2009).

No território brasileiro o gênero *Casearia* é comumente encontrado nos estados de Amazonas a São Paulo (MAISTRO et al., 2004).

Suas estruturas vegetais são descritas pela presença de inclusões cristalinas e células glandulares repletas de óleos essenciais. Suas folhas são assimétricas, glabras ou ásperas, pecioladas, lanceoladas, serradas e alternas. As flores são pequenas e numerosas, de coloração esverdeada, actinomorfas, diclamídeas e hipóginas. Os frutos são cápsulas septícidas com sementes envolvidas por arilo vermelho, florescendo nos meses de junho a agosto. Seus frutos amadurecem a partir de setembro, permanecendo até novembro (ABSY & SCAVONE, 1973). A Figura 1.7 ilustra a planta *Casearia sylvestris* encontrada no cerrado brasileiro, assim como suas flores e frutos.

A *Casearia sylvestris* no Brasil é popularmente conhecida como “erva de bugre”, “erva de lagarto”, “chá de bugre”, “guaçatonga”, sendo este último, originado do tupi-guarani, que significa madeira ou cerne com riscos pretos, sugerindo o antigo uso desta planta por comunidades indígenas brasileiras (HOEHNE, 1939).

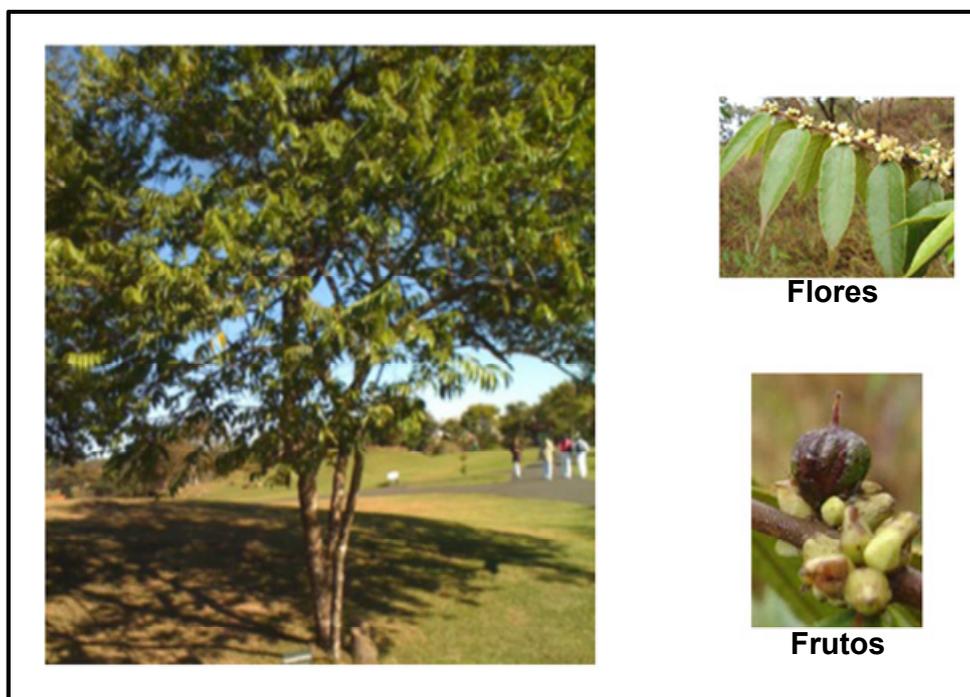


FIGURA 1.7: *Casearia sylvestris* Swartz, encontrada no cerrado brasileiro, assim como suas flores e frutos (TABAGIBA, 2012).

Há relatos do uso de *Casearia sylvestris* por povos indígenas no tratamento de lepra e outras doenças de pele (HEGNAUER, 1966). Diversas outras aplicações medicinais são atribuídas a *Casearia sylvestris*, algumas delas já comprovadas pela sociedade científica (BORGES et al, 2000).

Partes da planta exibem ação antipirética, anti-diarréica e contra herpes de contato. Na medicina popular é comum encontrar relatos do uso de extrato das folhas como antisséptico, cicatrizante e até mesmo anestésico tópico. Investigações clínicas apresentam cicatrização de lesão intra e extraorais causadas por herpes depois da aplicação de extrato de folhas de *Casearia sylvestris* (CAMARGO, 1993). Outros estudos mostraram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, justificando o uso popular no tratamento de pequenas ulcerações de pele e diarréia (HOEHNE, 1939).

ALMEIDA et al. (2000), relataram que o extrato alcoólico inibe a difusão do azul de Evans para a cavidade peritoneal e prolonga a fase aguda do processo inflamatório quando administrado na dose $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Várias pesquisas têm afirmado a atividade anti-inflamatória de extratos preparados a partir de folhas de *Casearia sylvestris*. Estes extratos são fontes de inúmeros compostos inibidores de fosfolipase A, sendo efetivos nas classes I e II de fosfolipases A_2 . Estudos também demonstram a inibição de atividade miotóxica de venenos de cobras do gênero *Bothrops sp* e outras miotoxinas, além de prevenir parcialmente a formação de edema (BORGES et al, 2000).

Folhas de *Casearia sylvestris* auxiliam no reparo de defeito femural preenchido com matriz óssea, provavelmente devido a presença de compostos fitoquímicos com ação anti-inflamatória, ação semelhante aos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, que promovem a inibição da síntese de prostaglandina, causando a diminuição da ativação de macrófagos, fibroblastos e formação de fibras de colágeno, com efeito inibitório sobre a osteogênese (SASSIOTO et al., 2004).

O grande interesse em *Casearia sylvestris* por parte da comunidade científica e, sobretudo da indústria farmacêutica, surgiu após o isolamento e identificação dos diterpenos clerodânicos. ITOKAWA et al. (1988) relataram a possível ação destes diterpenos no tratamento de câncer. Estudando as propriedades anticancerígenas destes compostos, estes autores observaram uma alta atividade antitumoral em ratos. A atividade antitumoral foi relacionada aos

diterpenos conhecidos por casearinas (Figura 1.8) (ITOKAWA et al., 1988, ITOKAWA., 1989, ITOKAWA et al.,1990, MORITA et al.,1990). Ao longo de todos esses anos, inúmeros compostos de *Casearia sylvestris*, foram descobertos e descritos na literatura. Atualmente existem 23 casearinas denominadas de acordo com as letras do alfabeto de A a X, e ainda outros diterpenos clerodânicos conhecidos como casearvestrinas (Tabela 1.2) e ainda outros 2 diterpenos conhecidos por 15-hidróxi-3-clerodano-2-ona e ácido Hardiwickiic mostrados na Figura 1.8 (SANTOS et al., 2008).

É importante ressaltar que as diferentes casearinas apresentam diferentes graus de atividade. Por exemplo, as casearinas A-F, apresentam atividade citotóxica em linhagens de células de sarcoma e fibroblastos. Porém a que se mostrou mais ativa foi a casearina C (ITOKAWA et al.,1990). De acordo com FERREIRA (2006), a casearina U apresentou maior potencial antitumoral que as casearinas L e O. Já as casearinas G, S, e T mostraram ação citotóxica seletiva em cepas mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* (CARVALHO et al.,1998).

Do ponto de vista farmacológico, a gama de variações em torno de um esqueleto básico encontrado nos diterpenos de *Casearia sp*, fornece modelos interessantes para o estabelecimento de relações entre estrutura e atividade destas substâncias (SANTOS et al., 2008). BALUNAS et al., 2006, aponta o gênero *Casearia* como um dos mais promissores na descoberta de compostos com atividade anticancerígena.

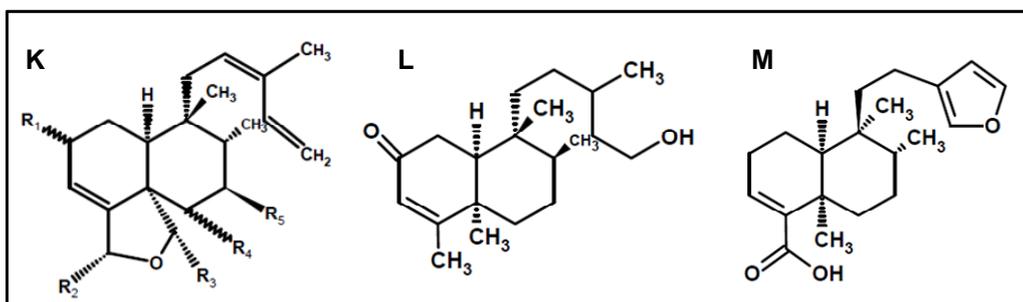


FIGURA 1.8: Estrutura química básica da casearina (K) e outros diterpenos isolados de *Casearia sylvestris*, 15-hidróxi-3-clerodano-2-ona (L) e ácido Hardiwickiic (M).

TABELA 1.2: Grupos substituintes das casearinas e casearvestrinas

Casearinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A (10)	α-OMe	OAc	OAc	α-OH	OBu
B (11)	α-OMe	OAc	OAc	α-OAc	OBu
C (12)	α-OH	OAc	OAc	α-OAc	ODc
D (13)	α-OH	OBu	OAc	α-OH	OBu
E (14)	α-OH	OEt	OAc	α-OH	ODc
F (15)	α-OH	OEt	OAc	α-OH	OBu
G (16)	α-OMe	OAc	OAc	H	OBu
H (17)	α-OH	OAc	OAc	H	OBu
I (18)	α-OH	OAc	OBu	H	OBu
J (19)	α-OMe	OBu	OAc	α-OH	OBu
K (20)	α-OAc	OAc	OAc	α-OH	OBu
L (21)	OBu	OBu	OAc	α-OAc	OH
M (22)	α-OH	OBu	OBu	α-OAc	OH
N (23)	α-Ome	OAc	OBu	α-OAc	OBu
O (24)	α-OMe	OBu	OAc	α-OAc	OBu
P (25)	α-OMe	OAc	OAc	α-OAc	OAc
Q (26)	α-OH	OAc	OAc	α-OAc	OBu
R (27)	=O	OAc	OAc	α-OH	OBu
S (28)	α-OMe	=O	OAc	H	OBu
T (29)	α-OMe	OAc	OAc	β-OAc	OBu
U (30)	α-OMe	OMe	OAc	α-OH	OBu
V (31)	α-OH	OMe	OAc	α-OH	OBu
X (32)	α-OBu	OBu	OAc	α-OH	H

Casearvestrinas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A (33)	β-isoOBu	OAc	OAc	α-OH	H
B (34)	β-OMeBu	OAc	OAc	α-OH	H
C (35)	β-OHex	OAc	OAc	α-OH	H

Fonte: BANDEIRA et al., 2005

Anexo I: estruturas dos grupos funcionais das casearinas.

1.6 - Nanopartículas Biopoliméricas

A nanotecnologia tem desempenhado um papel importante em diversas áreas do conhecimento científico, entre elas, na indústria farmacêutica com advento das nanopartículas biopoliméricas. As nanopartículas podem ser definidas como partículas sólidas coloidais, com tamanho inferior a $1\mu\text{m}$, que carregam substâncias ativas. Podem ser obtidas por diferentes métodos e geralmente apresentam tamanho entre 100 e 500nm (QUINTANAR-GUERREIRO et al.,1998).

No início da década de 70 foram desenvolvidos os principais métodos para a preparação de nanopartículas. As nanopartículas podem ser classificadas, segundo a sua composição e organização estrutural em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são constituídas por uma matriz polimérica estando a substância ativa retida ou adsorvida na matriz polimérica; já as nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, onde a substância ativa pode estar dissolvida no núcleo e/ou adsorvida na parede polimérica (SCHAFFAZICK et al.,2003).

Nas duas últimas décadas houve um aumento considerável na pesquisa e desenvolvimento de sistemas coloidais poliméricos, buscando novas propriedades e uma maior eficiência de fármacos. Entre as novas propriedades se procura aumento da especificidade, cinética de liberação controlada, aumento da biodisponibilidade, redução da toxicidade, etc (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Atualmente já existem mais de vinte terapias empregando nanopartículas já aprovadas clinicamente e muitas outras em desenvolvimento clínico e pré-clínico. Já é muito bem estabelecido que nanopartículas têm uma propriedade única, a biodistribuição. As nanopartículas, assim como as macromoléculas, preferencialmente acumulam-se em áreas altamente vascularizadas, através de efeitos de permeabilidade e retenção; isto permite que terapias de nanopartículas alcancem os alvos, como células de câncer e patologias inflamatórias. Outra propriedade favorável é o fato das nanopartículas serem capturadas pelo sistema fagocitário e então os resíduos são eliminados pelo sistema hepático, diferente do que acontece com a maioria das pequenas moléculas, que são eliminadas pelos rins. Essa característica de eliminação hepática pode ser favorável, uma vez que é potencialmente de baixa toxicidade. Além disso, é

importante observar que a baixa função renal é relativamente comum entre enfermos e idosos. A nefrotoxicidade induzida por fármacos tem sido um limitador de muitas terapias, inclusive terapias antitumorais (NAUGHTON, 2008).

Outra propriedade das nanopartículas é a sua baixa distribuição em órgãos normais como coração e pulmões. Para fármacos com alta toxicidade para estes órgãos, a liberação desses compostos via nanopartículas pode diminuir o perfil tóxico concomitante com uma liberação contínua e controlada (O'BRIEN et al., 2004).

Na literatura são descritos alguns métodos para a preparação de nanopartículas. Esses métodos podem ser classificados mais amplamente em polimerização interfacial de monômeros dispersos ou dispersão de um polímero pré-formado ou macromolécula. Nos métodos de polimerização estão as técnicas emulsão (orgânica e aquosa) e polimerização interfacial. Essas técnicas apresentam como desvantagens o emprego de polímeros não biodegradáveis, os quais geram subprodutos não totalmente biocompatíveis, além de resíduos tóxicos provenientes de monômeros, tensoativos e catalizadores empregados na reação (QUINTANAEGUERREIRO et al., 1998).

Na classificação de polímeros pré-formados encontram-se quatro principais métodos: emulsificação-evaporação, *salting-out*, emulsificação-difusão e nanoprecipitação. Comumente, essas técnicas empregam durante a preparação uma solução orgânica que constitui a fase interna das nanopartículas e a fase aquosa externa. Ambas as fases apresentam agentes estabilizadores da dispersão das nanopartículas. Outra similaridade entre as técnicas de polímero pré-formado é a baixa taxa de encapsulação de substâncias hidrossolúveis, sendo um sistema preferencialmente empregado para fármacos lipofílicos (SOPPIMATH et al., 2001). Para garantir o sucesso do método é de extrema importância a escolha do sistema polímero/solvente/não-solvente, já que este governa a formação das nanopartículas e conseqüentemente a eficiência de encapsulamento. O solvente e o não-solvente do polímero devem ser mutuamente miscíveis (FESSI et al., 1989).

O método baseado na precipitação de polímeros biodegradáveis pré-formados que mais se destaca é o de nanoprecipitação proposto por FESSI et al. (1988). Este é considerado um método simples, que tem a vantagem de não formar monômeros, evitando a presença de resíduos dos mesmos na formulação. Outra vantagem desse método é a obtenção de nanoesferas sem prévia emulsificação.

Este método foi aplicado com sucesso para inúmeros materiais poliméricos como o poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-ácido glicólico), poli(ϵ -caprolactona), polimetilmetacrilato e poliestireno. Essas nanopartículas são extensivamente estudadas para liberação de fármacos, devido a sua habilidade de “prender e liberar” uma alta gama de fármacos a vários tecidos e órgãos (MATTHEOLABAKIS et al., 2012).

1.7 - Nanopartículas Biopoliméricas em Terapias de Câncer

Os sistemas de liberação por nanopartículas poliméricas tem o potencial para superar limitações de drogas quimioterápicas como a baixa solubilidade, baixa seletividade, efeitos citotóxicos e desenvolvimento de resistência multidrogas (KONING & KRIJGER, 2007).

A biodistribuição de nanopartículas poliméricas pode também conduzir a novas aplicações terapêuticas como, por exemplo, o acúmulo preferencial de nanopartículas em células tumorais com mínima absorção de nanopartículas em tecidos normais que o circundam, sendo uma propriedade ideal para a quimio ou radioterapia (WERNER et al., 2012). Outra vantagem de nanopartículas poliméricas está em seu tamanho extremamente pequeno e a sua cobertura superficial apropriada para escapar do reconhecimento pelo citocromo P450 e/ou P-glicoproteína (P-gp), evitando assim a degradação do composto ativo pelo sistema fagocítico antes de chegar ao tumor alvo. Assim, nanopartículas poliméricas podem oferecer uma solução alternativa para liberação de fármacos anticâncer via oral através da barreira gastrointestinal (MU & FENG, 2002).

Os lipossomas foram as primeiras nanopartículas desenvolvidas como carreadores de fármacos anticâncer. Os primeiros estudos reportam lipossomas carregados com doxorrubicina a fim de melhorar a os perfis de biodistribuição, farmacocinética e a cardiotoxicidade do fármaco livre. Os lipossomas carregados com doxorrubicina aumentaram a atividade antitumoral, diminuindo a cardiotoxicidade (BYRNI et al., 2008).

Alguns fármacos antitumorais estão sendo nanoencapsulados, apresentando resultados promissores em avaliações pré-clínicas como, por exemplo, paclitaxel que quando nanoencapsulado em um copolímero (poli-ácido-

lático-metoxi-polietileno glicol , ou PLA-mPEG), aumentou a sua dose máxima tolerável em três vezes comparado ao fármaco livre e resultou em uma regressão tumoral em modelos animais (MATTHEOLABAKIS et al., 2012). Experimentos *in vivo* demonstraram que nanopartículas de ácido lático-co-ácido glicólico e D- α -tocoferol succinato polietileno glicol 1000 (PLA-TPGS) exibiu uma meia-vida de 20,6 vezes maior que a meia-vida do docetaxel quando administrada intravenosamente. A biodisponibilidade oral pode ser aumentada de 3,59% do docetaxel livre para 91,3% quando administrado via nanopartículas poliméricas PLA-TPGS (MAZZAFERRO et al., 2013).

A nanopartícula é vista como um dos grandes avanços da engenharia e criou grandes expectativas para melhorias na medicina, influenciando na maneira como as doenças são abordadas, especialmente para diagnóstico, monitoramento e tratamento. Isso é atribuído aos sistemas multifuncionais, devido a sua habilidade em detectar células cancerosas, carrear agentes citotóxicos e monitorar a resposta do tratamento. Essa habilidade dos nanosistemas em serem multifacetados guarda grande potencial para aplicações médicas. Havendo uma evolução no conceito de tratamento, onde anteriormente as terapias não eram específicas, sendo tóxicas e com efeitos em todo o organismo, para terapias altamente específicas com detecção do alvo e liberação localizada do agente quimioterápico e tratamento personalizado (GONÇALVES et al., 2012).

Com o avanço da nanotecnologia, os efeitos dos tratamentos anticâncer tendem a diminuir e promover uma melhor qualidade de vida aos pacientes e aumento a expectativa de vida (GONÇALVES et al., 2012).

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliação da atividade de metabólitos secundários de *Casearia sylvestris* nanoencapsulados sobre células de carcinoma de próstata DU 145 e células saudáveis Balb-c.

2.2 - Objetivos Específicos

- Coleta e preparo de extratos de *Casearia sylvestris*;
- Fracionamento, isolamento e identificação de constituintes químicos de *Casearia sylvestris*;
- Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para controle de qualidade de extratos de *Casearia sylvestris* submetidos ao nanoencapsulamento e ensaios biológicos.
- Desenvolvimento do método analítico para caracterização de nanopartículas quanto à taxa de recuperação, eficiência de encapsulamento e estudos de cinética de liberação;
- Preparação e caracterização de nanopartículas poliméricas pelo método de nanoprecipitação do polímero pré-formado;
- Estudos de atividade antitumoral contra células das linhagens Balb-c (células normais) e DU145 (células de carcinoma de próstata);

PROCEDIMENTO

EXPERIMENTAL

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Estudo Fitoquímico

3.1.1 - Materiais

3.1.1.1 - Material Cromatográfico

- Cromatografia em coluna aberta por adsorção (CCAA)
 - ✓ Sílica gel 60 (70-230 mesh) – Merck.
 - ✓ Sílica gel 60 (230-400 mesh) – Merck.
- Cromatografia em coluna aberta por exclusão (CCAEE)
 - ✓ Sephadex LH-20- Amershan Pharmacia Biotech AB.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
 - ✓ Coluna Phenomenex Gemini, C18,(\varnothing 5 μ m; 150 x 4,6 mm).
- Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)
 - ✓ Suportes de folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, \varnothing = 0,2mm – Merck.
- Extração em Fase Sólida (SPE)
 - ✓ Cartucho Phenomenex C18, modelo SPE-Strata C18-E, 100mg e 1cm³.

3.1.1.1.1 - Reveladores

- Solução de vanilina ácida
- Câmara de luz UV ($\lambda = 254$ e 365 nm)

3.1.1.1.2 - Solventes

- Solventes destilados do Departamento de Química da UFSCar
 - ✓ Metanol;
 - ✓ Etanol;
 - ✓ Acetato de etila;
 - ✓ Acetona;
 - ✓ Hexano;
 - ✓ Diclorometano;
 - ✓ Água destilada e MilliQ.
- Solventes grau HPLC (Merck, J.T. Becker e Pancreac)
 - ✓ Metanol;
 - ✓ Acetonitrila;
 - ✓ Isopropanol;

- Solventes deuterados Merck e Aldrich

- ✓ Metanol, (CD₃OD);
- ✓ Clorofórmio, (CDCl₃)

3.1.1.2 - Equipamentos

- ✓ Moinhos de tritura e homogeneização (Moinho TECNAL TE-631).
- ✓ Extrator por turbólise, fabricante IKA® e modelo RW20.
- ✓ Câmara de UV, cabine tipo Spectroline modelo CM-10 com luz tipo Spectroline modelo ENF-260C.
- ✓ Balança analítica, Sartorius Modelo BP210S
- ✓ Evaporador rotativo BUCHI, R-215 equipado com banho BUCHI modelo B-490 e recirculador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 4°C.
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência modular da Agilent série 1200, equipado com um degaseificador (G1322A), uma bomba quaternária (G1311A), um autoinjeter (G1329A), forno da coluna (G1316A) e detector UV (G1314B).
- ✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker DRX 9,8T, 400MHz e 100MHz para ¹H e ¹³C respectivamente – DQ/UFSCar.
- ✓ Centrífuga Eppendorf, 5810R.

- ✓ Bomba de Vácuo FISATOM, 825T.
- ✓ Estação de processamento (manifold à vácuo), AGILENT Technologies.
- ✓ Espectrômetro de massa com analisador por triplo quadrupolo API™ 2000 (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, USA), ionização por *electrospray* através de uma fonte turbolonSpray® (ESI-MS).
- ✓ Estufa para esterilização e secagem, GEHAKA, G4023D.

3.1.2 - Coleta do Material Vegetal

As amostras vegetais foram coletadas no cerrado da UFSCar, *campus* São Carlos-SP. Todas as amostras foram obtidas coletando somente folhas. Este procedimento visa não destruir a planta e a sustentabilidade do projeto. O ponto de coleta foi devidamente registrado através de dados de localização geográfica por satélite (Sul: 21°58' e 22°00'; Oeste: 47°51' e 47°54). Uma exsicata da amostra foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar sob os cuidados da Profa. Dra. Maria Inês salgado Lima. Este procedimento contribuirá para rastreabilidade dos dados bem como assegurar a reprodutibilidade de ensaios futuros.

3.1.3 - Preparo e Fracionamento dos extratos

3.1.3.1 - Extrato Etanólico

As folhas de *Casearia sylvestris*, logo após a coleta, foram encaminhadas ao Laboratório de Produtos Naturais (Departamento de Química UFSCar), sendo imediatamente secas em estufa de ar circulante à 40°C por 7 dias, sendo trituradas após este período, em um moinho tipo Willey.

Posteriormente, 492 g de material seco e triturado, foram submetidos a um processo de turbólise e deixado para macerar em solvente orgânico (álcool etílico P.A) a uma proporção de 5:1 entre solvente e massa seca. O procedimento foi realizado por 5 vezes sendo no final todo o extrato etanólico em solução agrupado e rotaevaporado, rendendo 132,8 g de extrato de aspecto semi sólido (pastoso). Entre cada etapa de maceração, o solvente era retirado por filtração e um novo solvente adicionado ao precipitado. O rendimento da extração foi calculado com base na diferença entre as massas de material seco utilizado e do extrato obtido.

O extrato etanólico (30 g) foi fracionado em coluna de sílica, sob vácuo, com eluição de solventes em ordem crescente de polaridade: Hexano, Acetato de Etila e Metanol como representado na FIGURA 3.1.

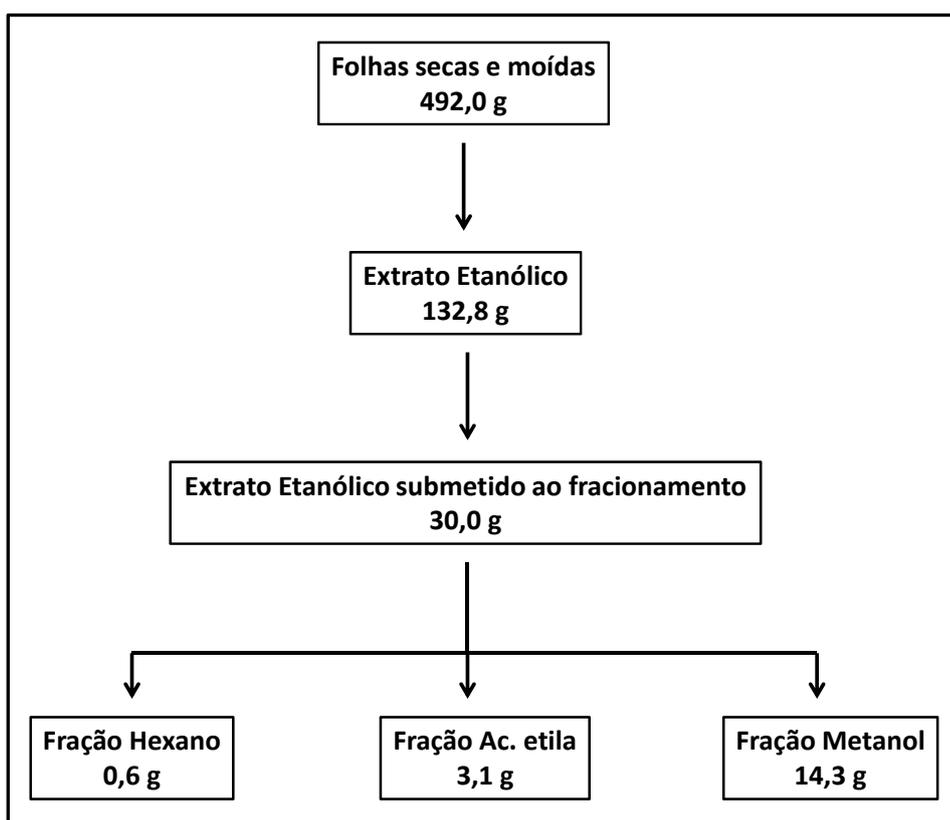


FIGURA 3.1 : Fracionamento do Extrato Etanólico das folhas de *Casearia sylvestris*.

A fração aceto de etila foi separada para uso futuro no preparo de nanopartículas poliméricas.

3.1.3.2 - Extrato Rico em Casearinas

O método seletivo para a extração de diterpenos descrito por BANDEIRA et al. (2005), foi modificado para o preparo de um extrato de *Casearia sylvestris* rico em casearinas.

As folhas secas e trituradas de *Casearia sylvestris*, (50 g), foram submetidas a um processo de turbólise por 2 minutos sob a presença de 750 mL de solução extratora composta por acetato de etila/hexano/isopropanol 91:08:01 (v/v), saturada com hidróxido de amônio. Posteriormente a turbólise extratora, a mistura permaneceu em repouso por 1 minuto e repetiu-se o processo de turbólise por 3 vezes. Em seguida a solução contendo o material vegetal foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm, por 30 minutos. Por último o sobrenadante foi coletado e colocado em frasco aberto para secar. Após a eliminação do solvente extrator, o extrato seco foi solubilizado em 50 mL de clorofórmio e particionado por extração líquido-líquido em 300 mL de água para a retirada do hidróxido de amônio. Em seguida, a fração orgânica foi coletada e seca, rendendo 1,5 g de extrato com aspecto semi sólido.

O extrato rico em casearinas foi submetido à cromatografia em coluna aberta (Sephadex LH-20) rendendo 18 frações, que foram agrupadas após análise por cromatografia de camada delgada (CCD) (FIGURA 3.2).

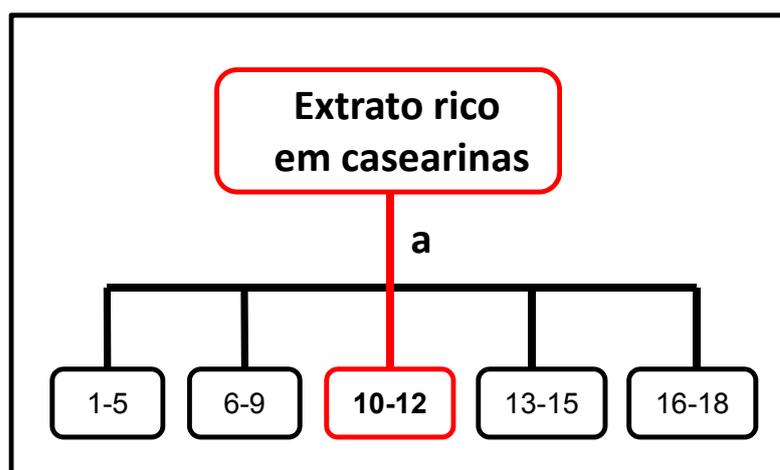


FIGURA 3.2: Fracionamento do Extrato rico em casearinas proveniente das folhas de *Casearia sylvestris*.

Simbologia:

a. Cromatografia em Sephadex LH-20, coluna de vidro (sephadex ultima h=90cm \varnothing =4,5cm), sistema isocrático de eluição: metanol 100%.

3.1.4 - Isolamento de Metabólitos Secundários de *Casearia sylvestris*

3.1.4.1 - Fracionamento do extrato etanólico

Inicialmente foi realizada uma análise do perfil químico das frações obtidas do extrato etanólico (3.1.3.1) através de análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e por RMN ^1H . As análises por CCD indicaram a fração Acetato de etila como a mais rica em metabólitos secundários e análises espectroscópicas de RMN ^1H mostraram sinais característicos de diterpenos. Com isto, no presente trabalho foi escolhida a fração Acetato de etila para o estudo, visando o isolamento de metabólitos secundários para serem empregados como marcadores de referência garantindo o controle de qualidade. Um resumo dos diversos fracionamentos para a fração Acetato de etila se encontra descrito nas Figuras 3.3 e 3.4.

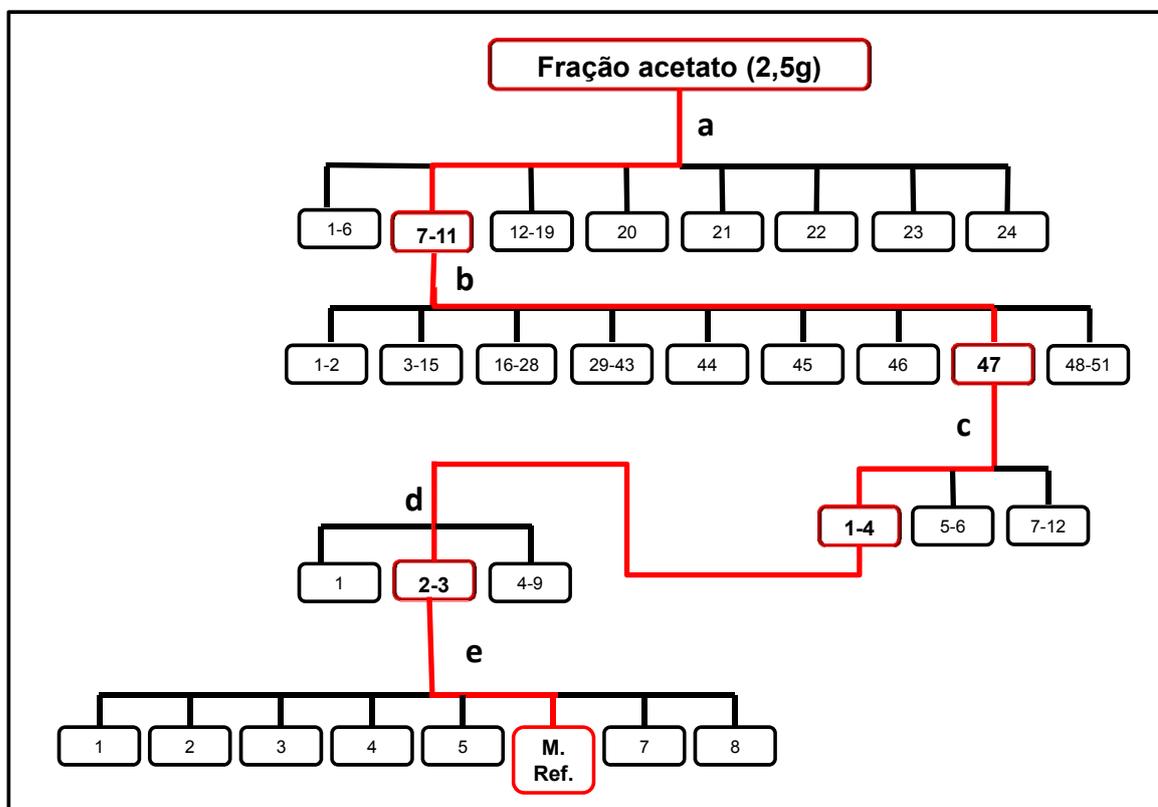


FIGURA 3.3: Fluxograma do fracionamento da fração Acetato de etila e isolamento de diterpeno utilizado como marcador de referência (M.Ref.).

Simbologia:

- a. Cromatografia em Sephadex LH-20, coluna de vidro (sephadex 6 , h = 45cm \varnothing = 1,5cm), sistema isocrático de eluição: metanol 100%.
- b. Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 30 cm , \varnothing = 3,5cm), sistema gradiente de eluição: Hexano 100%; Hexano/Acetona 9:1.
- c. Cromatografia em Sephadex LH-20, coluna de vidro (sephadex 8 , h = 45cm \varnothing = 1,5cm), sistema isocrático de eluição: metanol 100%.
- d. Cromatografia em Sephadex LH-20, coluna de vidro (sephadex 13 , h =90cm \varnothing = 4,5cm), sistema isocrático de eluição: metanol 100%.
- e. Extração em fase sólida, cartucho C-18, sistema gradiente de eluição: água/ acetonitrila/metanol 45:28:27 (v/v); água/ acetonitrila/metanol 30:35:35 (v/v); água/ acetonitrila/metanol 25:38:37 (v/v); água/ acetonitrila/metanol 20:40:40 (v/v); água/ acetonitrila/metanol 15:42:43 (v/v); água/ acetonitrila/metanol 10:45:45 (v/v); metanol 100%.

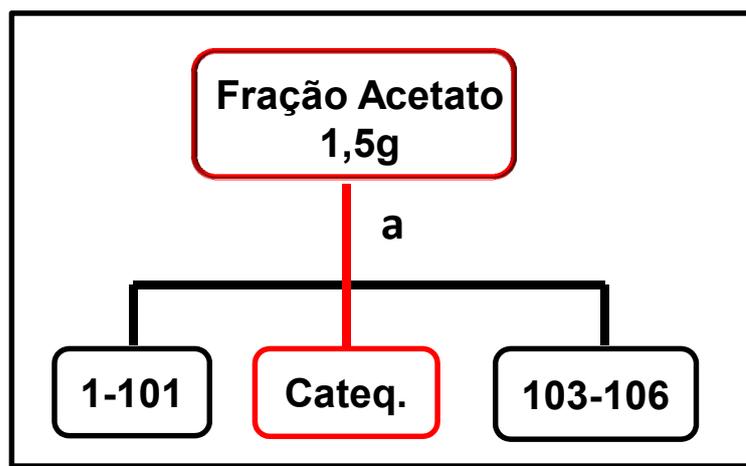


FIGURA 3.4: Fluxograma do fracionamento da fração Acetato de etila e isolamento do composto catequina (Cateq.).

Simbologia:

- a. Cromatografia por adsorção, sílica gel 60 (230-400 mesh), coluna de vidro (h = 23 cm , \varnothing = 4,5cm), sistema gradiente de eluição: hexano/aceto de etila 7:3 (v/v); hexano/aceto de etila 6:4 (v/v); hexano/aceto de etila 1:1 (v/v); hexano/aceto de etila 3:7 (v/v); acetato de etila 100 %; acetato de etila/metanol 7:3 (v/v); acetato de etila/metanol 1:3 (v/v).

3.1.5 - Desenvolvimento e validação do método analítico via CLAE

Um método analítico foi desenvolvido e validado, a fim de garantir o controle de qualidade dos extratos de *Casearia sylvestris* e das nanoformulações.

Para este fim foi utilizado o marcador de referência isolado a partir do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*, mencionado no item 3.1.4.1. O marcador de referência foi quantificado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em um cromatógrafo Agilent série 1200 (3.1.1.2). Utilizando o modo reverso de eluição, o gradiente da fase móvel ternária, composto de água, acetonitrila e metanol. Inicialmente, a proporção dos solventes foi de 34:44:22 (v/v)

respectivamente, até atingir a proporção de 0:53:47 (v/v) em 42 minutos, permanecendo nessas condições por 10 minutos antes de retornar as condições iniciais. A fase estacionária empregada foi uma coluna de fase reversa C18, Gemini (Phenomenex), (5 μm ; 150X4,6mm), à qual foi acoplada uma pré-coluna Phenomenex C18 (5 μm ; 4x3mm). O volume injetado foi de 20 μl , e a vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o comprimento de onda utilizado de 220 nm. As análises foram realizadas em temperatura controlada de $25,0 \pm 1,0$ °C.

3.1.5.1 - Validação analítica

Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de desempenho seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão, seguindo as especificações da ANVISA e recomendações do ICH - *Harmonised Tripartite Guideline*.

A seletividade foi considerada como a capacidade do método analítico em detectar os analitos de interesse na presença de outros componentes da amostra. A linearidade é definida como a capacidade do método analítico em fornecer resultados proporcionais a concentração do analito presente na amostra, dentro de uma faixa de concentração, na qual se pode correlacionar o valor de uma variável dependente (medida) por meio de uma variável independente (concentração), como consta no ICH - *Harmonised Tripartite Guideline*. O limite de detecção foi considerado como a menor concentração do analito de interesse presente na amostra, que quando submetido a todo o processo analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método. O limite de quantificação foi estabelecido como sendo a menor concentração do analito de interesse que pode ser medido. Já a precisão e a exatidão de um método analítico são os parâmetros que avaliam a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (CHASIN et al. 1998).

3.1.5.2 - Preparo das Soluções de Trabalho

A curva de calibração foi construída através de diferentes concentrações de marcador de referência em metanol; todas as concentrações foram feitas em triplicata. Estas diluições foram preparadas a partir de uma solução

de trabalho de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}(\text{m/v})$ de marcador de referência em metanol. Ainda a fim de garantir a precisão e exatidão do método, três outras concentrações foram utilizadas, sendo elas: 6, 50 e $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; cada solução foi feita em quintuplicata, a partir da solução trabalho de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}(\text{m/v})$ de marcador de referência em metanol.

A solução de trabalho foi feita da seguinte forma: uma massa de 1 mg de marcador de referência foi precisamente pesada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O marcador de referência foi solubilizado em metanol e armazenado em freezer, a temperatura de -20°C .

A partir da solução de trabalho foram preparadas, em triplicata, os pontos da curva de calibração nas seguintes concentrações: 5, 10, 20, 40, 60, 80 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.2 - Preparação e caracterização das Nanopartículas Poliméricas em Suspensões Coloidais

3.2.1 - Materiais

3.2.1.1 - Material para preparação de nanopartículas

- ✓ Polímero Poli- ϵ -caprolactona, tamanho 60000 Da (PCL – 704105), obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Monoestearato de Sorbitano (Span® 60, S-7010), obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Óleo mineral característico, obtido da LAPON.
- ✓ Polissorbato 80 (Tween® 80, P1754), obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

3.2.1.2 - Solventes

- ✓ Água ultrapura.

- Solventes grau HPLC (Merck, J.T. Becker e Pancreac)
 - ✓ Metanol;
 - ✓ Acetonitrila;
 - ✓ Acetona.

3.2.2 - Equipamentos

- ✓ Balança analítica Sartorius Modelo BP210S
- ✓ Evaporador rotativo BUCHI, R-215 equipado com banho BUCHI modelo B-490 e recirculador de água refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 4°C.
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência modular da Agilent série 1200, equipado com um degaseificador (G1322A), uma bomba quaternária (G1311A), um autoinjeter (G1329A), forno da coluna (G1316A) e detector UV (G1314B).
- ✓ Centrífuga Eppendorf, 5810R.
- ✓ Prancha de aquecimento IKA, modelo: R10 power
- ✓ Bomba peristáltica Pump Pro, modelo: TPM.
- ✓ Potencial Zeta Microtrac, modelo: Zetatrac.
- ✓ Potenciômetro Metrohm, modelo: 827 pH Lab.
- ✓ Purificador de água Milli-Q system (Millipore Corporation, Watford, UK)
- ✓ Speedvac composto por Bomba Labconco, Modelo: Cetrivap Cold Trap, concentrador Labconco, Modelo: Cetrivap

3.2.3 - Preparação de Nanopartículas em Suspensão Coloidal

3.2.3.1 - Planejamento Fatorial

Foram desenvolvidos 3 planejamentos fatoriais 2^2 , com o objetivo de otimizar o preparo das nanoformulações. Planejamentos fatoriais são comumente adotados em pesquisas farmacêuticas, com o intuito de analisar os efeitos das variáveis nas formulações e suas interações sobre as variáveis de resposta, retirando o máximo possível de informações de um número reduzido de experimentos.

Em cada planejamento fatorial foram estudados 2 variáveis em dois níveis diferentes (baixa e alta) que foram representados pelos valores -1 e +1 respectivamente.

No planejamento fatorial A as variáveis independentes foram: quantidade de polímero (PCL) sendo o nível baixo representado por 0,08 gramas e o nível alto representado por 0,2 gramas e a presença ou não de óleo na formulação onde 0,620 gramas e ausência de óleo representaram os níveis alto e baixo respectivamente. No planejamento fatorial B as variáveis independentes foram: quantidade de polímero (PCL) sendo o nível baixo representado por 0,08 gramas e o nível alto representado por 0,2 gramas e tipo de extrato vegetal, onde o nível mais alto (+1) é representado pelo extrato rico em casearinas e o nível mais baixo (-1) é representado pela fração acetato de etila proveniente do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*. Já no planejamento fatorial C, as variáveis independentes foram: quantidade de polímero (PCL) sendo o nível baixo representado por 0,08 gramas e o nível alto representado por 0,2 gramas e a quantidade de extrato vegetal onde 0,1 e 0,2 gramas representaram os níveis baixo e alto respectivamente. As variáveis independentes e os níveis alto (+1) e baixo (-1) para os três planejamentos fatoriais estão descritos na Figura 3.5.

Planejamento Fatorial A		
Variáveis	Nível Baixo (-1)	Nível Alto (+1)
Polímero (X ₁)	0,08 g	0,20 g
Óleo Mineral (X ₂)	0	0,62 g

Planejamento Fatorial B		
Variáveis	Nível Baixo (-1)	Nível Alto (+1)
Polímero (X ₁)	0,08 g	0,20 g
Tipo de Extrato Vegetal (X ₂)	Fração acetato de etila	Extrato rico em casearina

Planejamento Fatorial C		
Variáveis	Nível Baixo (-1)	Nível Alto (+1)
Polímero (X ₁)	0,08 g	0,20 g
Fração acetato de etila (X ₂)	0,1 g	0,2 g

FIGURA 3.5: Variáveis utilizadas nos planejamentos fatoriais A, B e C.

3.2.3.2 - Método Experimental de Produção de Nanopartículas Poliméricas

Para a obtenção das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas carregada ou não com a fração acetato proveniente do extrato etanólico descrito no item 3.1.3.1. e extrato rico em casearinas descrito no item 3.1.3.2, que foram provenientes de folhas de *Casearia sylvestris*, foi utilizado o método de dispersão de polímero pré-formado, nanoprecipitação descrito por FESSI et al. (1989). O método de nanoprecipitação consiste em primeiramente preparar uma fase orgânica de acetona contendo polímero, o extrato vegetal (composto ativo), óleo mineral (nanocápsula) ou não (nanoesfera) e um tensoativo de baixo peso molecular (Span[®] 60) previamente solubilizados, sob temperatura (45°C) e agitação na sequência a fase orgânica foi vertida numa vazão constante com o auxílio de uma bomba peristáltica sob uma fase aquosa constituída de água e Tween[®]80,

mantida sob agitação constante durante 10 minutos. Após a dispersão da fase orgânica sob a fase aquosa a suspensão foi mantida em repouso por 30 minutos. Por último o solvente orgânico e parte da água foram eliminados por rotaevaporação a 40°C e o volume final ajustado para 50 mL. A FIGURA 3.6. ilustra o procedimento empregado.

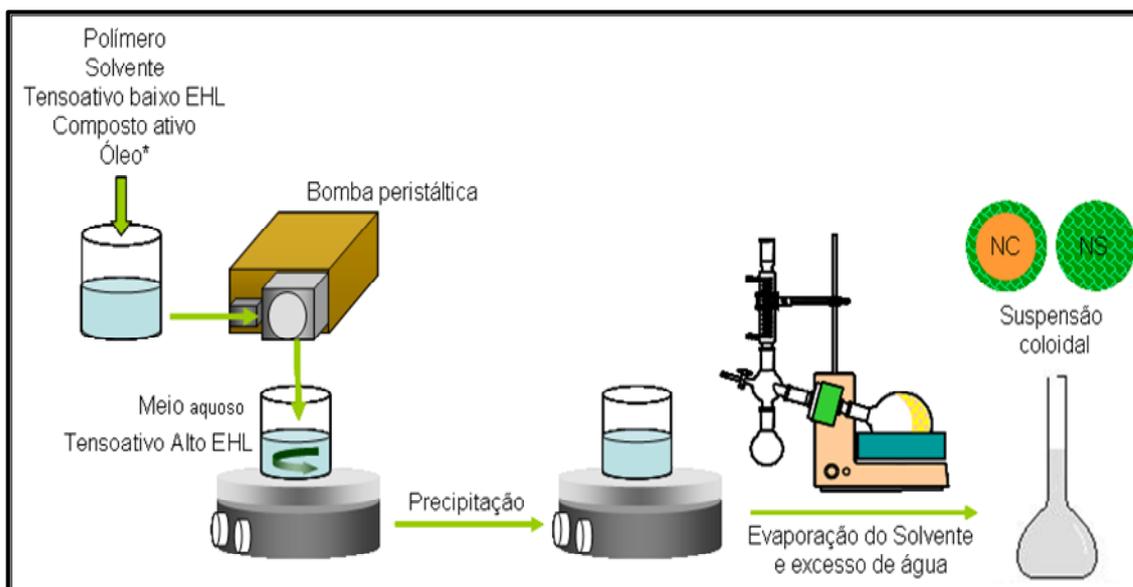


FIGURA 3.6: Esquema do método de nanoprecipitação.

*presença de óleo (formação de nanocápsulas)
Ausência de óleo (formação de nanoesfera)

Foram preparadas 13 formulações de nanopartículas, sendo 10 formulações preparadas para controle (sem extrato vegetal), como descritas nas Tabelas 3.1 e 3.2.

TABELA 3.1: Formulação de nanopartículas, contendo Fração Acetato de etila proveniente do extrato de folhas de *Casearia sylvestris*

Formulação	Polímero PCL (g)	Span® 60 (g)	Óleo Mineral (g)	Fração A. etila (g)	Acetona (mL)	Tween® 80 (g)	Água (mL)
1	0,080	0,154	0,620	0,1	53,4	0,154	106
2	0,200	0,154	0,620	0,1	53,4	0,154	106
3	0,080	0,154	0,620	0,2	53,4	0,154	106
4	0,200	0,154	0,620	0,2	53,4	0,154	106
12	0,200	0,154	0,620	0	53,4	0,154	106

TABELA 3.2: Formulação de Nanopartículas, contendo extrato rico em casearinas proveniente do extrato de folhas de *Casearia sylvestris*

Formulação	Polímero PCL (g)	Span® 60 (g)	Óleo Mineral (g)	Extrato Casearinas (g)	Acetona (mL)	Tween® 80 (g)	Água (mL)
5	0,080	0,154	0,620	0,1	53,4	0,154	106
6	0,200	0,154	0,620	0,1	53,4	0,154	106
7	0,080	0,154	0,620	0,2	53,4	0,154	106
8	0,200	0,154	0,620	0,2	53,4	0,154	106
9	0,080	0,154	0	0,2	53,4	0,154	106
10	0,200	0,154	0	0,2	53,4	0,154	106
11	0,200	0,154	0	0	53,4	0,154	106
13	0,080	0,154	0	0	53,4	0,154	106

3.2.4 - Caracterização físico-química das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas

3.2.4.1 - Determinação do Potencial Zeta

O Potencial Zeta foi determinado, utilizando um Microtrac (Zetatrac). As amostras pra análise foram preparadas diluindo 0,1mL de suspensão coloidal em 10,0mL de uma solução de NaCl 10 mM. As leituras foram feitas em triplicata e s resultados apresentados constam a média dos 3 valores.

3.2.4.2 - Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados diretamente nas suspensões coloidais, em triplicata através de um potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0.

3.2.4.3 - Análise quantitativa das suspensões coloidais

A quantificação do marcador de referência nas suspensões coloidais foi realizada por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência em duas análises distintas:

- a. Quantificação total do marcador de referência na suspensão coloidal;
- b. Quantificação do teor do marcador de referência encapsulado;

Para cada análise foi necessário desenvolver técnicas específicas de preparo de amostra. Os parâmetros instrumentais utilizados foram os mesmos desenvolvidos e validados (3.1.5). Entretanto, para a quantificação do marcador de referência nas suspensões coloidais a recuperação do método foi avaliada preparando suspensões coloidais com duas concentrações diferentes de marcador de referência. Depois de preparadas, as suspensões foram submetidas a todos os procedimentos de preparação para análise por CLAE. A recuperação foi determinada comparando o valor obtido experimentalmente com o valor nominal do marcador de referência.

3.2.4.3.1 - Determinação do teor total do marcador de referência nas suspensões coloidais

As suspensões coloidais (100 μL) foram tratadas com acetona (900 μL) para promover a dissolução das nanopartículas. Após homogeneização em agitador de tubos (tipo Vortex) e repouso por 2 horas, foi retirada uma alíquota de 500 μL da solução, transferida para tubo eppendorf de 2 mL e centrifugada por 30 minutos a 14.000 rpm. Após término da centrifugação, uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi retirada e seca. O material seco foi então resuspendido em 200 μL de metanol e analisado por CLAE. O procedimento operacional padrão do preparo da amostra pode ser resumido como:

- a. Homogeneizar a suspensão e transferir 100 μL para tubo eppendorf;
- b. Adicionar 900 μL de acetona;
- c. Homogeneizar a suspensão em Vortex;
- d. Deixar em repouso por 60 minutos;
- e. Homogeneizar novamente a suspensão em Vortex;
- f. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm;
- g. Retirar 200 μL do sobrenadante;
- h. Evaporar o solvente;
- i. Ressuspende com 200 μL de metanol;
- j. Transferir para *Vial* e analisar por Cromatografia Líquida.

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de marcador de referência e correspondem a média de três amostras.

3.2.4.3.2 - Determinação do teor de marcador de referência encapsulado

Para avaliar o teor de marcador de referência encapsulado, foi necessário quantificar seu teor livre, não encapsulado no meio de dispersão (meio aquoso). Através da técnica de centrifugação, promove-se a separação do material disperso (nanopartículas) e do meio de dispersão em duas fases heterogêneas. Assim, após a homogeneização da suspensão coloidal, transfere-se uma alíquota de 500 μL para tubo de centrífuga Spin (2,0 mL) com filtro Acetato de celulose 0,22 μm centrifugando por 40 minutos a 3.000 rpm. Após a separação das fases, uma

alíquota de 200 μL da fase aquosa é seca e ressuspensa com 200 μL metanol e analisado por CLAE sob parâmetros instrumentais descritos no item 3.1.5. O procedimento operacional padrão do preparo da amostra pode ser resumido como:

- a. Homogeneizar a suspensão e transferir 500 μL para tubo de centrifuga Spin (2,0 mL) com filtro Acetato de celulose 0,22 μm ;
- b. Centrifugar por 40 minutos a 8.000 rpm (20 °C);
- c. Retirar uma alíquota de 200 μL da fase aquosa e secar;
- d. Ressuspender o material seco com 200 μL de metanol.
- e. Transferir para *Vial* e analisar por Cromatografia Líquida.

O teor de marcador de referência nanoencapsulado pode ser obtido subtraindo do total de marcador de referência quantificado na suspensão coloidal, o teor demarcador de referência encontrado na fase aquosa. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de marcador de referência e correspondem a média de três amostras.

3.2.4.4 - Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise morfológica, superfície e forma, das nanopartículas foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura (Philips XL 30, 247 FEG). As amostras foram submetidas à análise morfológica após serem previamente metalizadas com ouro. As fotomicrografias foram obtidas utilizando uma voltagem de 5kV e aumentos entre 1000 a 50000 vezes. As análises foram realizadas no Departamento de Materiais da UFSCar.

3.3 - Ensaios Biológicos

3.3.1 - Materiais

3.3.1.1 - Linhagens de Células

- ✓ Linhagens DU145 e Balb-c, ambas células aderentes correspondendo a carcinoma de próstata e fibroblasto sadio respectivamente, foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro BCRJ/UFRJ. A linhagem DU145 corresponde a células metastásicas isoladas de um homem caucasiano de 70 anos, e a linhagem Balb-c foi isolada a partir de fibroblastos de camundongos da raça Balb.

3.3.1.2 - Meio de Cultura

- ✓ Meio Dulbecco DMEM em pó, com Glutamina (D0017), Cultilab Mat. Cultura Celular Ltda, Campinas S.P.

3.3.1.3 - Reagentes

- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO), D2650, 5 x 10mL, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Soro Fetal Bovino (FBS), F2442, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Tampão Fosfato Dubelco (PBS), com Cloreto de sódio, antibiótico e antimicótico, sem cálcio e magnésio, 001059, Cultilab Mat. Cultura Celular Ltda, Campinas S.P.
- ✓ Glucose, D9434, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

- ✓ Bicarbonato de Sódio, S5761, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Solução de Tripsina com 25% de EDTA, T4049, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Azul de Tripán, T6146, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 98,5% de pureza, L3771, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda
- ✓ Ácido Acético, 99,7% de pureza, 320099, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda
- ✓ Doxorrubicina, 97,5% de pureza, M5655, obtido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
- ✓ Guava ViaCount® Reagent, Lote 12-0125, obtido da Merck-Millipore.

3.3.1.4 - Materiais Diversos

- ✓ Frascos para cultura celular com filtro T25 e T75 (25 cm³ e 75 cm³, respectivamente), obtidos de TECNOPLASTIC PRODUCTS, Suíça.
- ✓ Placa de 96 poços para cultura de tecidos (Microtest™ 96), obtidos de BD FALCON, USA.
- ✓ Câmara de Neubauer, (0,0025 mm²), OPTIK-LABOR, Brasil.
- ✓ Sistema de filtração à vácuo, 500 mL (Stericup®), Millipore, USA.
- ✓ Membrana de filtração em PVDF, 0,22 µm de poro, 47mm de diâmetro, GVWPO4700, Millipore, USA.

3.3.2 - Equipamentos

- ✓ Citômetro de Fluxo, Guava EasyCyte 8HT, Millipore, Alemanha.
- ✓ Microscópio Invertido, Motik AE21, Quimis, Brasil.
- ✓ Capela de Fluxo Laminar, PA420, PACHANE, Brasil.
- ✓ Incubadora de CO₂, MCO-20AIC, SANYO SCIENTIFIC, Canadá.
- ✓ Fluorímetro, multi mode (microplate reader) Synerg HT, Biotek.
- ✓ Bomba de vácuo, Primatec.

3.3.3 - Preparo do Meio de Cultura – DMEM (10%FBS)

Para a preparação do meio de cultura foi utilizado meio Dulbecco DMEM em pó (Cultilab Mat. Cultura Celular Ltda Campinas-SP), 3,5 g de glucose e 1,5 g de bicarbonato de sódio, em 900 mL de água ultrapura. A mistura foi colocada em agitação, e após a diluição de todos os componentes verificou-se o pH da solução ajustando os valores entre 7,2 e 7,4. Na sequência o meio de cultura foi esterilizado através de filtração a vácuo com filtro de 0,22 µm. Posteriormente 100 mL de FBS foram adicionados e homogeneizados ao meio de cultura. Manteve-se o meio de cultura sob refrigeração, entre (6 ± 2 °C), até sua utilização.

3.3.4 - Crescimento celular

Inicialmente foi adicionado 1 mL de dispersão celular (1×10^6 cel.mL⁻¹) em um frasco para cultura celular T75, juntamente com 10 mL de meio de cultura DMEM-10% FBS, na sequência os frascos de cultura foram encubados à 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Todos os ensaios celulares foram realizados somente após o crescimento celular atingir entre 60-80% de confluência na superfície do

frasco. Todos os procedimentos envolvendo manipulação de células foram feitos em capela de fluxo laminar.

3.3.5 - Ensaios Celulares

Foram utilizados 2 protocolos distintos para os ensaios celulares sendo eles: ensaios de MTT e determinação da viabilidade celular por citometria de fluxo.

3.3.5.1 - Ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Para determinar os valores de viabilidade nas células Balb-c e DU145, frente a diferentes compostos, primeiramente foi realizado o processo de incubação e crescimento de células como descrito no item 3.3.4. Posteriormente as células foram ressuspensas com tripsina e submetida a centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Após ressuspensão, determinou-se o número de células por mililitro utilizando uma câmara Neubauer e microscópio. Após a contagem celular, a suspensão de células foram diluídas para 1×10^5 cel.mL⁻¹ e adicionada a placa de 96 poços e deixando incubar a 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas. Adicionou-se 100 µL do meio de cultura sem células aos poços que ficam no extremo da placa de 96 poços (coluna 1 e 12) e (fila A e H) para diminuir o efeito de borda.

Após a incubação, o meio de cultura foi retirado por sucção, usando uma bomba de vácuo. Em seguida 100 µL do meio de cultura contendo diferentes concentrações dos compostos foram adicionados em cada poço, e a placa incubada a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, cada poço recebeu 20 µL de uma solução de PBS com 5 mg.mL⁻¹ de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) deixando a placa novamente por 3 horas na incubadora de CO₂ ao abrigo da luz. Em seguida o sobrenadante contido nos poços foi retirado e 100 µL de agente solubilizante (10 g SDS, 100 mL DMSO e 0,6 mL de ácido acético glacial) adicionado. Novamente as placas foram incubadas por 1 hora, com a subsequente leitura de absorbância a 570 nm.

3.3.5.1.1 - Dose-Resposta do Dimetilsulfóxido (DMSO)

Devido à baixa solubilidade dos extratos e frações de origem vegetal em meio aquoso, foi necessária a busca por um veículo para auxiliar na solubilidade dos mesmos no meio de cultura. Optou-se por utilizar o DMSO estéril, já que os extratos e frações vegetais apresentaram excelente solubilidade neste solvente. Todavia, foi necessária a análise de tolerância das linhagens de células (DU145 e Balb-c) frente ao DMSO. As seguintes concentrações foram avaliadas: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 % (v/v). Este ensaio seguiu o protocolo descrito no item 3.3.5.1.

3.3.5.1.2 - Dose-Resposta da Doxorrubicina (DOX)

O quimioterápico Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo do bioensaio. Desse modo, a análise da dose-resposta da doxorrubicina frente às duas linhagens celulares estudadas no presente trabalho também foi necessária.

Neste ensaio, a Doxorrubicina foi diluída em meio DMEM-0,5% de DMSO, e as seguintes concentrações foram preparadas: 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ em massa correspondendo a 0,054; 0,543; 5,43 e 54,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O experimento seguiu o mesmo protocolo descrito no item 3.3.5.1.

3.3.5.1.3 - Dose-Resposta da fração acetato de etila, extrato rico em casearinas e catequina

As células da linhagem DU145 e Balb-c foram aderidas em placas de 96 poços e após 24 horas, como descrito no item 3.3.5.1, foram tratadas com fração acetato de etila, proveniente de um extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*, um composto isolado também da mesma fração denominado catequina e ainda com o extrato rico em casearinas proveniente da mesma planta. Para todos os experimentos as células foram tratadas com diferentes concentrações dos produtos em investigação, procurando avaliar o efeito dose-resposta para citotoxicidade. Para a Fração acetato de etila, as concentrações testadas foram: 0,3; 3,0; 33 e 333

$\mu\text{g.mL}^{-1}$. A Catequina e extrato rico em casearinas foram avaliadas nas concentrações de: 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.3.5.2 - Determinação de Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo

A determinação de viabilidade celular por citometria de fluxo seguiu o seguinte protocolo: Primeiramente realizou-se o processo de incubação e crescimento de células conforme descrito no item 3.3.4. Em seguida, as células foram ressuspensas com tripsina e submetidas à centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. Após a ressuspensão, determinou-se o número de células por mL utilizando um microscópio e contagem em câmara Neubauer; e realizou-se uma diluição da suspensão celular para $1 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$. Em seguida, 100 μL do meio de cultura contendo $1 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$ foram adicionados em cada poço. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C e 5 % CO_2 durante 24 horas. Com o objetivo de reduzir o efeito de borda, 100 μL do meio de cultura sem células foram adicionados aos poços que ficam no extremo da placa de 96 poços (coluna 1 e 12) e (fila A e H).

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado por sucção usando uma bomba de vácuo. Em seguida, 100 μL do meio de cultura contendo diferentes concentrações dos compostos em estudo foram adicionados em cada poço, sendo a placa novamente incubada a 37 °C, 5 % CO_2 por 24 horas. Após este segundo período de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado dos poços e 75 μL de tripsina foram adicionados. Novamente a placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C e 5 % CO_2 , promovendo a liberação das células aderidas ao fundo do poço. Após a perda da aderência celular, 25 μL de PBS com 20% (v/v) de FBS foram adicionados aos poços, com o objetivo de bloquear a ação da enzima tripsina. Em seguida, foram adicionados 100 μL de reagente Guava ViaCount® e a placa foi incubada por mais 5 minutos a 37 °C e 5 % CO_2 . Por último a viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo.

O reagente Guava ViaCount®, foi utilizado por promover a contagem celular absoluta e dados de viabilidade em suspensões celulares. O ensaio Guava ViaCount® distingue entre células viáveis e não viáveis, baseado na permeabilidade diferencial de corantes que se ligam ao DNA. A fluorescência de cada corante

permite distinguir tanto células viáveis quanto não viáveis em uma suspensão (Guava Technologies).

Para a determinação da viabilidade celular, as soluções preparadas com a fração acetato de etila, extrato rico em casearinas e catequina foram incorporadas no experimento seguindo o protocolo já descrito acima. Todos os experimentos foram realizados com diferentes concentrações de amostra, avaliando o efeito citotóxico. Para a Fração acetato de etila as concentrações testadas foram 0,03; 0,3; 3,0; 33 e 333 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Por sua vez as solução de Catequina e extrato rico em casearinas foram ensaiadas nas concentrações 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As células da linhagem DU145 e Balb-c também foram tratadas com diferentes concentrações das 13 nanoformulações poliméricas. As concentrações de nanopartículas utilizadas foram 0,5; 1,0 e 3,0% (v/v).

RESULTADOS E
DISCUSSÕES

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Estudo Fitoquímico

4.1.1 - Substâncias isoladas e identificadas

O estudo fitoquímico da Fração acetato de etila das folhas de *Casearia sylvestris* levou ao isolamento e identificação de 2 substâncias, sendo um flavonóide e um diterpeno (Figura 4.1).

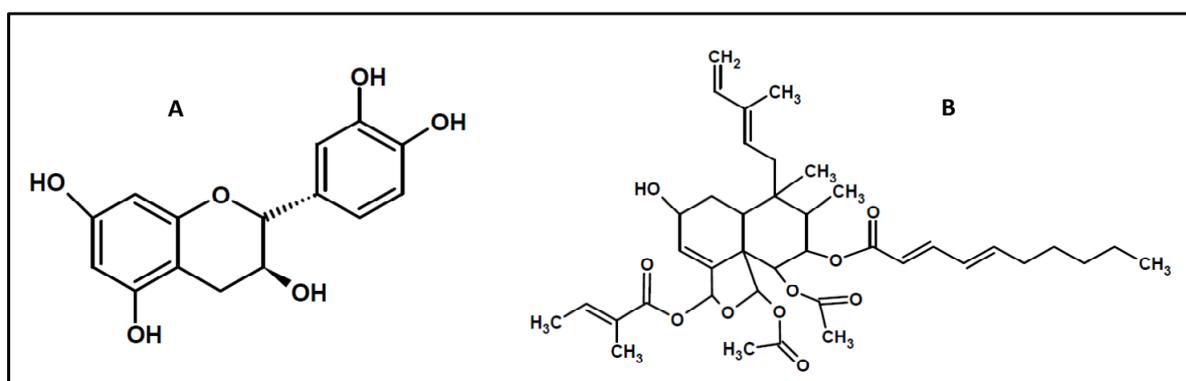


FIGURA 4.1: Metabólitos secundário isolados de folhas de *Casearia sylvestris*, Catequina (A), marcador de referência (B).

4.1.1.1 - Determinação Estrutural

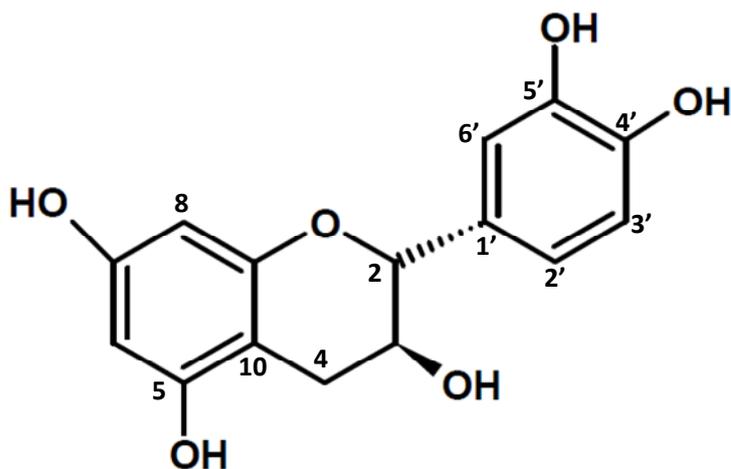
4.1.1.1.1 - Flavonóide

O flavonóide Catequina foi isolado da fração acetato de etila, proveniente do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*. Esta substância foi isolada como um sólido amorfo amarelo, e caracterizado através de espectros de RMN de ^{13}C e ^1H e pela comparação com dados na literatura (NEBO, 2008; NAHRTEDT et al., 1987).

O modo de oxidação do anel A foi definido através da análise do espectro de RMN de ^1H (Tabela 4.1), devido à presença de dois dupletos em δ 5,85 e 5,92 relativos a H-8 e H-6 com deslocamento químico e constante de acoplamento típico de acoplamento *meta*, em anéis aromáticos.

Os H-2', H-3' e H-6' foram atribuídos aos valores de deslocamento químico de sistemas aromáticos em δ 6,71 (*dd*; 1,8 e 8,1 Hz), δ 6,75 (*d*; 8,08 Hz) e δ 6,82 (*d*; 1,88 Hz) respectivamente. A análise das constantes de acoplamento se refere a um anel aromático C *meta* e *para* substituído. O H-2' (δ 6,71) apresenta uma constante de acoplamento orto de $J= 8,1$ HZ, referente ao acoplamento com o H-3'. O H-3' (δ 6,75 Hz) apresenta a mesma constante de acoplamento ($J= 8,1$ Hz). Contudo, o H-2' ainda apresenta uma segunda constante de acoplamento de $J= 1,8$ HZ característico de uma constante de acoplamento *meta* que ocorre com o H-6' (δ 6,82).

O anel B foi caracterizado pela presença de um duplete em δ 4,56 (*d*; 7,5 Hz), atribuído a H-2, que acopla com H-3 (δ 3,97, *m*). A configuração 2,3-*trans* foi determinada pela constante de acoplamento $J = 7,5$ Hz observada, entre H-2 e H-3 C-2 e pelo deslocamento químico de C-2 em δ 82,8. A presença do sinal referente à H-2, indicou a ausência da dupla ligação entre C-2 e C-3, e o sinal em δ 68,7 no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 4.2) foi atribuído ao carbono carbinólico em C-3.



Para os hidrogênios diasterotópicos H-4 α e H-4 β se observou um duplo dubleto em δ 2,84 (*dd*; 16,1 e 5,4 Hz), correspondente a H-4 α , devido ao seu acoplamento geminal com H-4 β ($J = 16,1$ Hz) e um acoplamento pseudo-equatorial-axial com H-3 ($J = 5,4$ Hz). O duplo dubleto em δ 2,50 ($J = 16,1$ e 8,2 Hz) foi atribuído ao H-4 β , devido ao seu acoplamento pseudo-diaxial com H-3 ($J = 8,2$ Hz).

Os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão de acordo com os dados da literatura para catequina (NAHRTEDT et al., 1987), como descritos nas Tabelas 4.1 e 4.2., respectivamente.

TABELA 4.1: Dados de RMN de ^1H da catequina e comparação com dados da literatura.

H	Catequina (Figura 4.1)	NAHRTEDT, 1987
	(400MHz, CDCl_3)	(400MHz, acetona- d_6)
2	4,56 (<i>d</i> , $J = 7,52$ Hz)	4,54 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz)
3	3,97 (<i>m</i>)	3,98 (<i>m</i>)
4	2,84 (<i>dd</i> , $J = 16,1$ e 5,4 Hz)	2,86 (<i>dd</i> , $J = 16,0$ e 5,4 Hz)
4	2,50 (<i>dd</i> , $J = 16,1$ e 8,2 Hz)	2,52 (<i>dd</i> , $J = 16,0$ e 8,5 Hz)
6	5,92 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)	6,02 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
8	5,85 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)	5,87 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
2'	6,71 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e 1,8 Hz)	6,7 a 6,9 (<i>m</i>)
3'	6,75 (<i>d</i> , $J = 8,0$ Hz)	6,7 a 6,9 (<i>m</i>)
6'	6,82 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)	6,7 a 6,9 (<i>m</i>)

TABELA 4.2: Dados de RMN de ^{13}C da catequina e comparação com dados da literatura.

C	Catequina (Figura 4.2)	NAHRTEDT, 1987
	(100MHz, CDCl_3)	(100MHz, acetona- d_6)
2	82,8	82,9
3	68,7	68,5
4	28,4	28,5
5	157,7	157,9
6	96,2	96,4
7	157,5	157,6
8	95,5	95,6
9	156,8	156,9
10	100,8	100,9
1'	131,7	132,3
2'	120,0	120,1
3'	116,0	116,2
4'	146,2	146,2
5'	146,1	146,2
6'	120,1	120,1

4.1.1.1.2 - Diterpenóide

O composto diterpênico isolado foi utilizado como marcador de referência e controle de qualidade dos extratos e nanoformulações submetidos a ensaios celulares. Este composto foi isolado da fração acetato de etila proveniente do extrato etanólico das folhas de *Casearia sylvestris*. O composto correspondeu a um sólido oleoso amarelado ocre. Sua estrutura elucidada através da comparação com dados da literatura, dados espectrométricos de massas e espectroscópicos por RMN ^1H (WHISTSON et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2008).

Na Figura 4.2 está representado o espectro de RMN de ^1H total do marcador de referência.

TABELA 4.3: Dados de deslocamentos de RMN de ^1H do marcador de referência e comparação com a literatura com um composto similar - argutin D - (WHISTSON et al., 2010).

H	Marcador de referência (400MHz, CDCl_3)	WHISTSON et al., (2010) (400MHz, CDCl_3)
1	2.06 <i>m</i> 2.00 <i>m</i>	2.07 <i>m</i> 1.98 <i>m</i>
2	4.58 <i>dl</i>	4.47 <i>t</i>
3	6.03 <i>dl</i>	6.01 <i>d</i>
4	-	-
5	-	-
6	4.37 <i>dl</i>	5.08 <i>d</i>
7	5.04 <i>dl</i>	3.66 <i>t</i>
8	1.62 <i>m</i>	1.77 <i>dd</i>
9	-	-
10	2.35 <i>dd</i>	2.37 <i>m</i>
11	1.61 <i>m</i> 1.25 <i>m</i> (se β) 2.30 <i>dd</i> (se α)	2.37 <i>m</i> 1.61 <i>m</i>
12	5.04 <i>d</i>	5.38 <i>d</i>
13	-	-
14	6.44 <i>dd</i>	6.26 <i>dd</i>
15	5.20 <i>d</i> 5.17 <i>d</i>	5.07 <i>d</i> 4.91 <i>d</i>
16	1.89 <i>sl</i>	1.64 <i>s</i>
17	0.89 <i>d</i>	1.04 <i>d</i>
18	6.58 <i>sl</i>	6.40 <i>t</i>
19	6.57 <i>sl</i>	6.55 <i>s</i>
20	0.87 <i>sl</i>	0.88 <i>s</i>
2'	5.01 <i>d</i> (11.2)	5.63 <i>d</i> (11.2)
3'	5.03 <i>d</i> (10.6)	6.63 <i>t</i> (11.2)
4'	6.60 <i>dd</i> (15.5 e 11.0)	7.30 <i>dd</i> (15.2 e 11.2)
5'	6.03 <i>m</i>	6.09 <i>ddd</i> (15.2, 7.7 e 7.2)
6'	2.29 <i>m</i>	2.14 <i>ddd</i> (14.7, 7.7 e 7.3)
7'	1.61 <i>m</i>	1.38 <i>ddd</i> (14.8, 7.6 e 7.3)
8'	1.25 <i>m</i>	1.23 <i>m</i>
9'	1.27 <i>m</i>	1.26 <i>m</i>
10'	0,84 <i>m</i>	0.84 <i>t</i>
2''	-	-
3''	5.60 <i>s</i>	-
4''	2.06 <i>s</i>	-
5''	2.05 <i>s</i>	-
18-OAc	-	2.04 <i>s</i>
19-OAc	2.00 <i>s</i>	1.91 <i>s</i>

Através de comparação com dados da literatura (WHITSON et al., 2010), referentes a trabalhos com o mesmo gênero *Casearia* sp e após análises dos espectros de RMN ^1H e massas obtidos, foi possível atribuir uma proposta estrutural para o marcador de referência (Figura 4.3 – A).

A Figura 4.3 representa a proposta estrutural do marcador de referência. A numeração atribuída à estrutura está de acordo com os sistemas padrões para terpenóides da classe dos clerodanos, sendo os grupos substituintes numerados de acordo com a literatura (Figura 4.3-B).

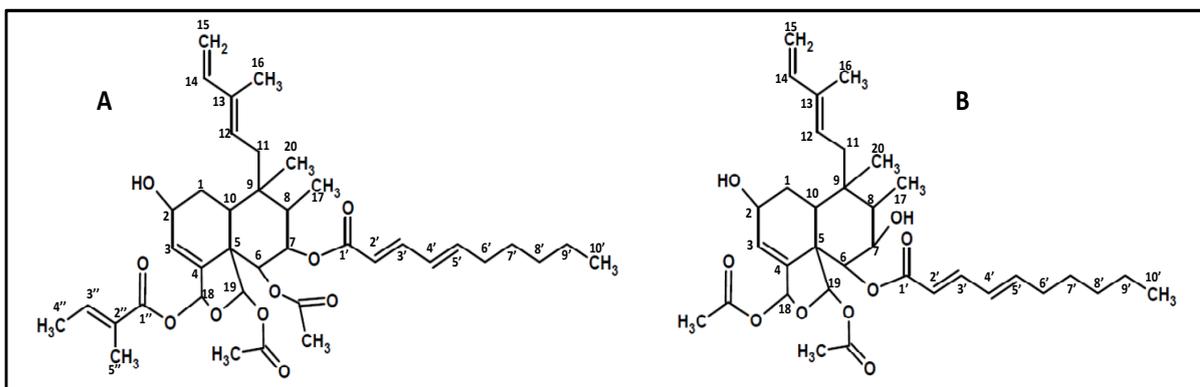


FIGURA 4.3: Proposta estrutural do marcador de referência (A) e o composto descrito na literatura (B) (Argutin D).

Pela análise dos espectros de RMN ^1H (Figura 4.4), se observou a presença de sinais característicos a hidrogênios olefinicos, em δ_{H} 6,44 (*dd*; 12,5 e 7,0) (carbono 14), δ_{H} 5,19 (*d*; 12,5) e 5,20 (*d*; 7,0) (C-15), δ_{H} 5,04 (*d*; 10,6) (C-12), δ_{H} 6,03 (*dl*; 3,7) (C-3) e do grupo tigloil δ_{H} 5,59 (*s*). Além disso, visualiza-se os hidrogênios carbinólicos, apresentando sinais em δ_{H} 4,38 (*d*; 11,0) (C-6) e δ_{H} 5,04 (*dl*; 10,6).

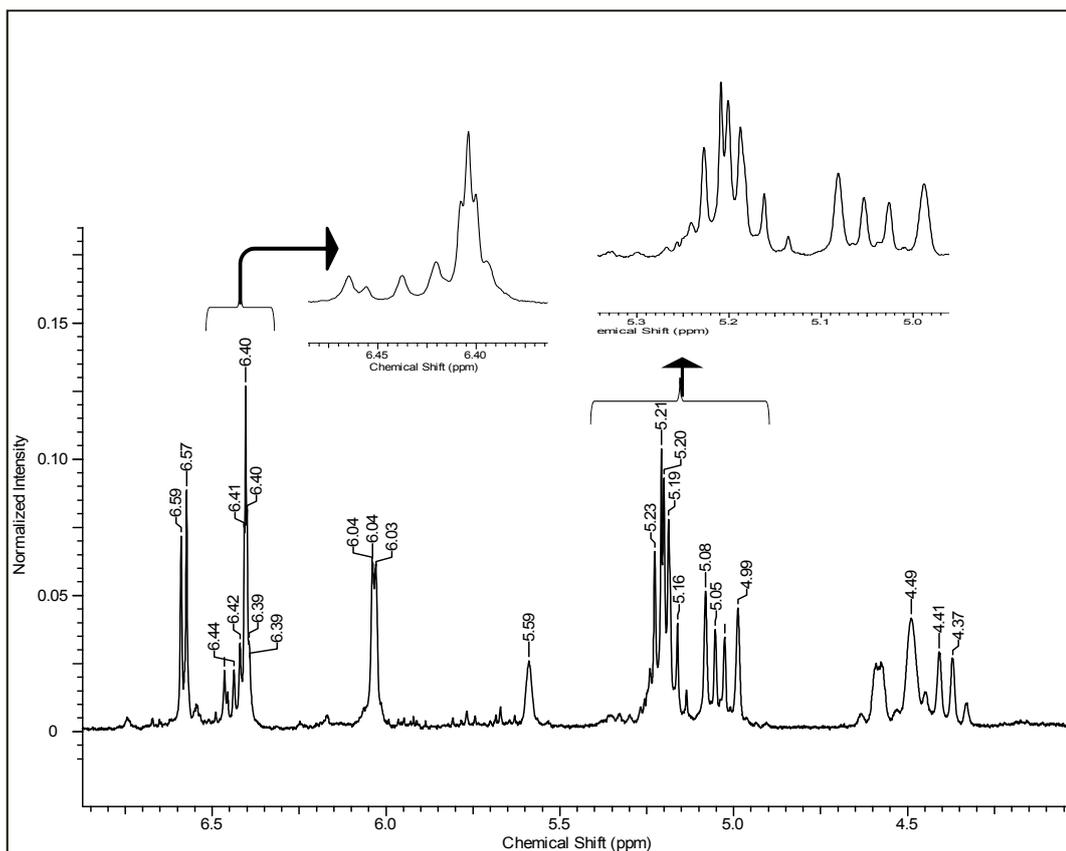


FIGURA 4.4: Ampliação dos sinais referentes aos hidrogênios olefinicos e carbinólicos.

Um sinal referente ao hidrogênio da hidroxila da posição 2 pode ser visualizado em δ 3,64 como um singleto largo, característico deste grupamento, conforme destacado na Figura 4.2.

Observando a estrutura proposta, nota-se a presença de grupos cetais, com deslocamentos químicos de hidrogênios semelhantes a hidrogênios aromáticos (δ 6,59 e δ 6,57), sendo estes desblindados em função dos grupos vizinhos (oxigênios) que atuam atraindo a densidade eletrônica (Figura 4.5).

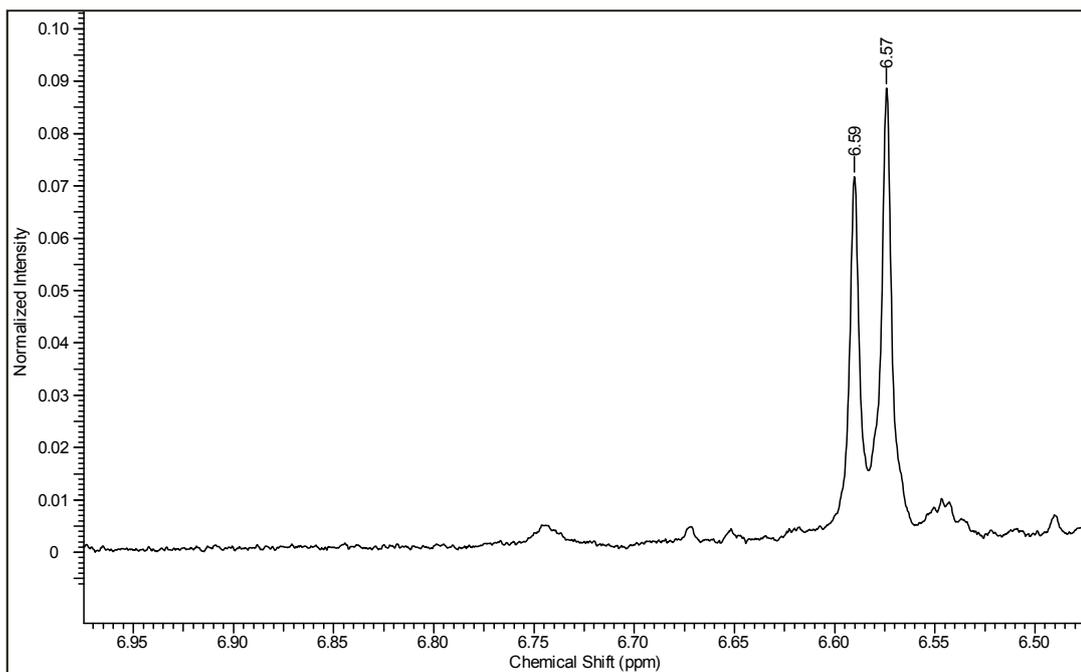


FIGURA 4.5: Ampliação da região dos hidrogênios das posições 18 e 19.

Considerando as metilas existentes no composto, pode-se deparar com a existência de três tipos: metilas de grupo acetato, metilas olefínicas e metilas ligadas a carbono tetraédrico (sp^3). Tais grupos metílicos podem ser claramente observados no espectro de RMN de ^1H do composto (Figura 4.2).

Na ampliação representada da Figura 4.6– A, pode-se observar sinais em δ_{H} 1,98 (s) e δ_{H} (2,01) (s) referentes às metilas ligadas a grupos acetil, ainda sinais em δ_{H} (2,07) (s), δ_{H} (2,06) e δ_{H} 1,90 (13), referindo-se às metilas olefínicas; sinais referentes às metilas ligadas aos carbonos sp^3 , podem ser observadas na ampliação do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 0,85–1,01, Figura 4.6 B. As metilas presentes no composto podem ser confirmadas pelo sinal em δ_{H} 0,90 (d; 6,8) referente à posição 8 do sistema decalínico e outra metila com deslocamento em δ_{H} 0,88 (s).

De fato, o grupo funcional alceno conjugado referente aos carbonos 11 a 15, pode apresentar dois isômeros constitucionais (Figura 4.7). O sinal de metila δ_{H} 1,89 (s) confirma a presença do isômero constitucional e a estrutura proposta.

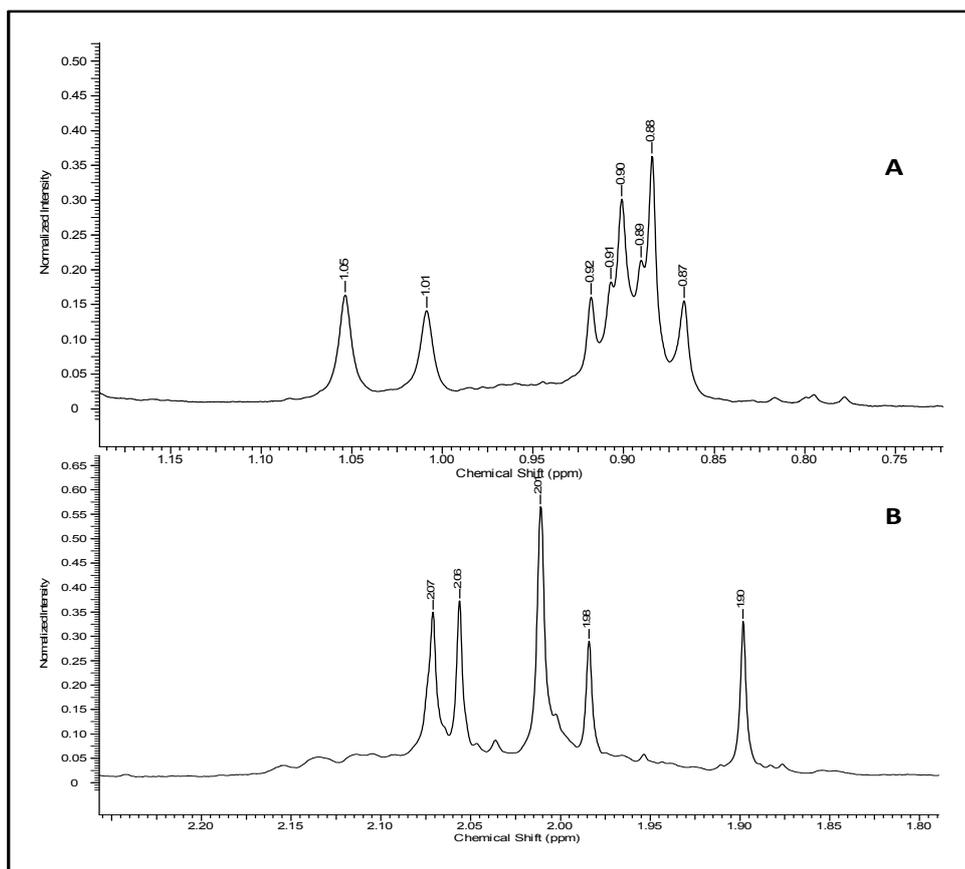


FIGURA 4.6: Ampliação da região de metilas olefínicas, ligadas a grupos carboxila e a carbonos sp^3 .

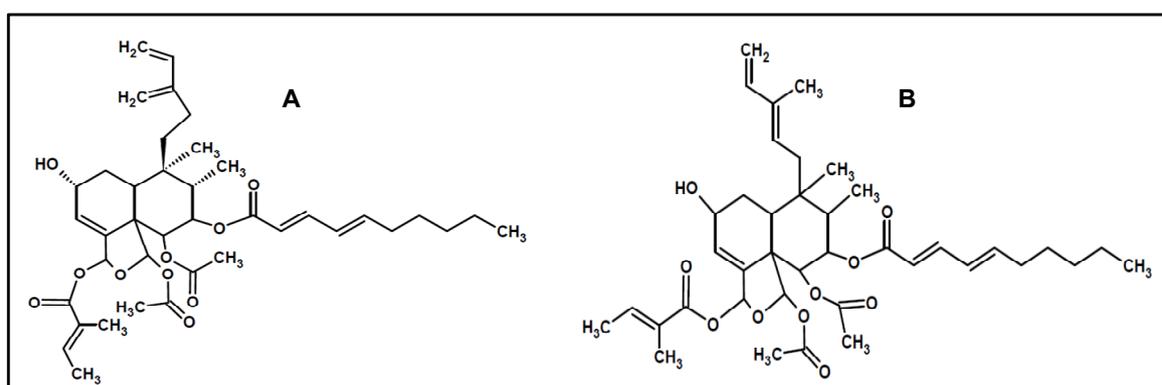


FIGURA 4.7: Estrutura do isômero constitucional (A) e estrutura proposta do marcador de referência (B).

Ainda com o propósito de confirmar a estrutura, foi realizada uma análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-). No espectro de massas obtido pode-se confirmar a massa molecular através da molécula deprotonada, sendo observada a molécula deprotonada $[M-H]^-$ 681 Da.

Desse modo, foi possível propor a massa molecular de 682 g.mol^{-1} compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_{10}$. Para esta fórmula molecular pode ser calculado um índice de insaturação de 13, condizente com a estrutura apresentada (Figura 4.8).

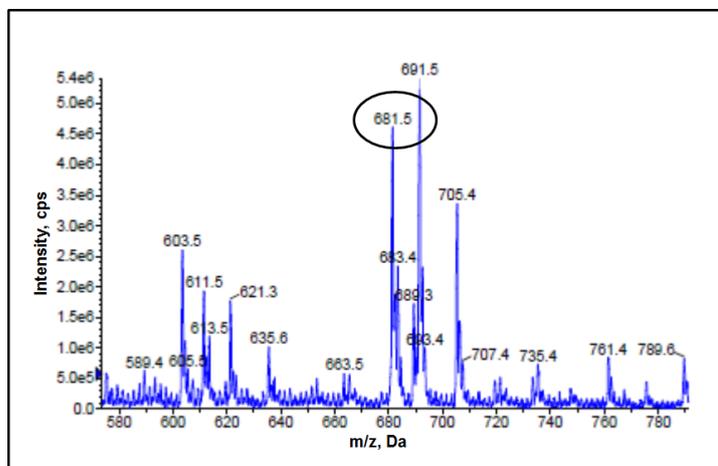


FIGURA 4.8: Espectro de massa típico, no modo negativo, com destaque para o marcador de referência, correspondendo a m/z 681.

4.1.2 - Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE

Para desenvolvimento do método analítico por CLAE para controle qualitativo de extratos e nanopartículas, o composto isolado (diterpeno) foi usado como marcador de referência. Este composto apresentou um grau de pureza espectrométrica de aproximadamente 90 %. Diferentes fases móveis e colunas de separação foram previamente testadas a fim de alcançar uma boa separação e resolução do composto de interesse. Nas amostras de extrato, fração vegetal e nanopartículas poliméricas, foi observado que a coluna cromatográfica Phenomenex[®], Gemini C18, (5 μm ; 150 x 4,6 mm), possibilitou uma boa separação do composto a ser quantificado com um fator de separação $\alpha=1,05$ e uma resolução $R_s=1,33$.

Com o propósito de alcançar a resolução cromatográfica necessária para o marcador de referência foi preciso utilizar uma fase móvel ternária gradiente, sendo o melhor sistema inicial composto de água, acetonitrila e metanol, na

proporção de 34:44:22 (v/v), garantindo a simetria do pico do marcador de referência. O tempo de eluição foi detectado em 20,7 minutos (Figura 4.9).

O comprimento de onda escolhido foi 220 nm, pois no espectro de DAD o λ máximo de absorção foi nesta região. A vazão escolhida foi de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção 20 μ l e temperatura 25 °C.

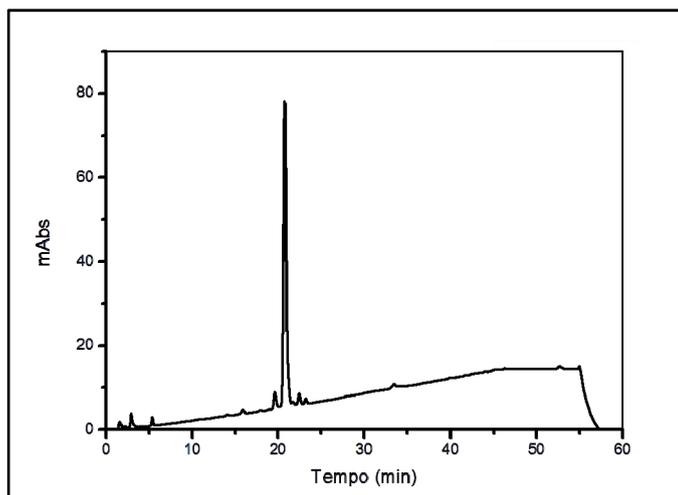


FIGURA 4.9: Cromatograma de eluição gradiente do marcador de referência (1,0 mg.mL⁻¹).

4.1.3 - Validação Analítica

O desenvolvimento do método analítico envolve a otimização de vários estágios como preparação da amostra, a separação cromatográfica e a quantificação. Parâmetros como fase móvel, vazão, coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem ser pré-estabelecidos criteriosamente.

A validação do método analítico é importante, pois garante o sucesso da utilização do método desenvolvido, além de detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método (CAUSON, 1997).

4.1.3.1 - Seletividade

Para validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade, garantindo que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de

interesse. Como pode se observar na Figura 4.10, não há co-eluição de nenhum composto no tempo 20,7 minutos, referente a banda cromatográfica do marcador de referência em nenhuma das matrizes.

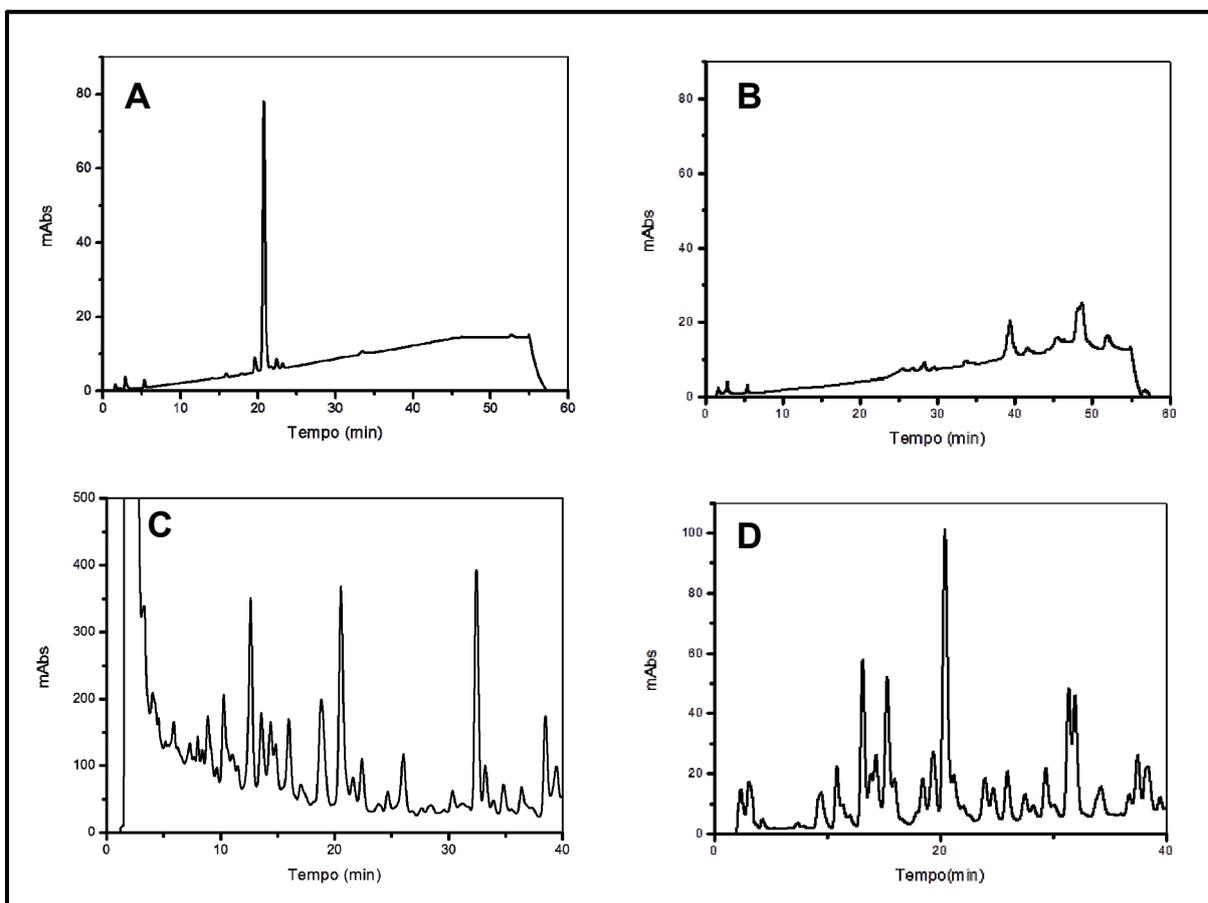


FIGURA 4.10: Cromatogramas típicos do marcador de referência (A), nanopartículas vazias (B), fração acetato de etila (C) e extrato rico em caseínas (D).

4.1.3.2 - Linearidade, Limite de Detecção e Quantificação

A curva de calibração analítica ($n=3$) foi linear na faixa de concentração de 5,0 a 100,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A linearidade foi avaliada através do cálculo da equação de regressão ($y = ax + b$) e o coeficiente de correlação (r^2), pelo método dos mínimos quadrados, onde $y = (14,1)\cdot x + 4,1$ e $r^2 = 0,9997$ como ilustrado na Figura 4.11 A. O “a” é a inclinação da reta, “b” é o valor da área do pico cromatográfico para a amostra, e “x” é a concentração da solução de marcador de

referência em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O valor r^2 é maior que 0,999, indicando uma boa linearidade para o intervalo de trabalho. A linearidade também foi avaliada através da análise do fator de resposta como ilustrado na figura 4.11 B. O fator de resposta revelou uma inclinação de -0,008, valor muito próximo a zero entre todos os níveis de concentração.

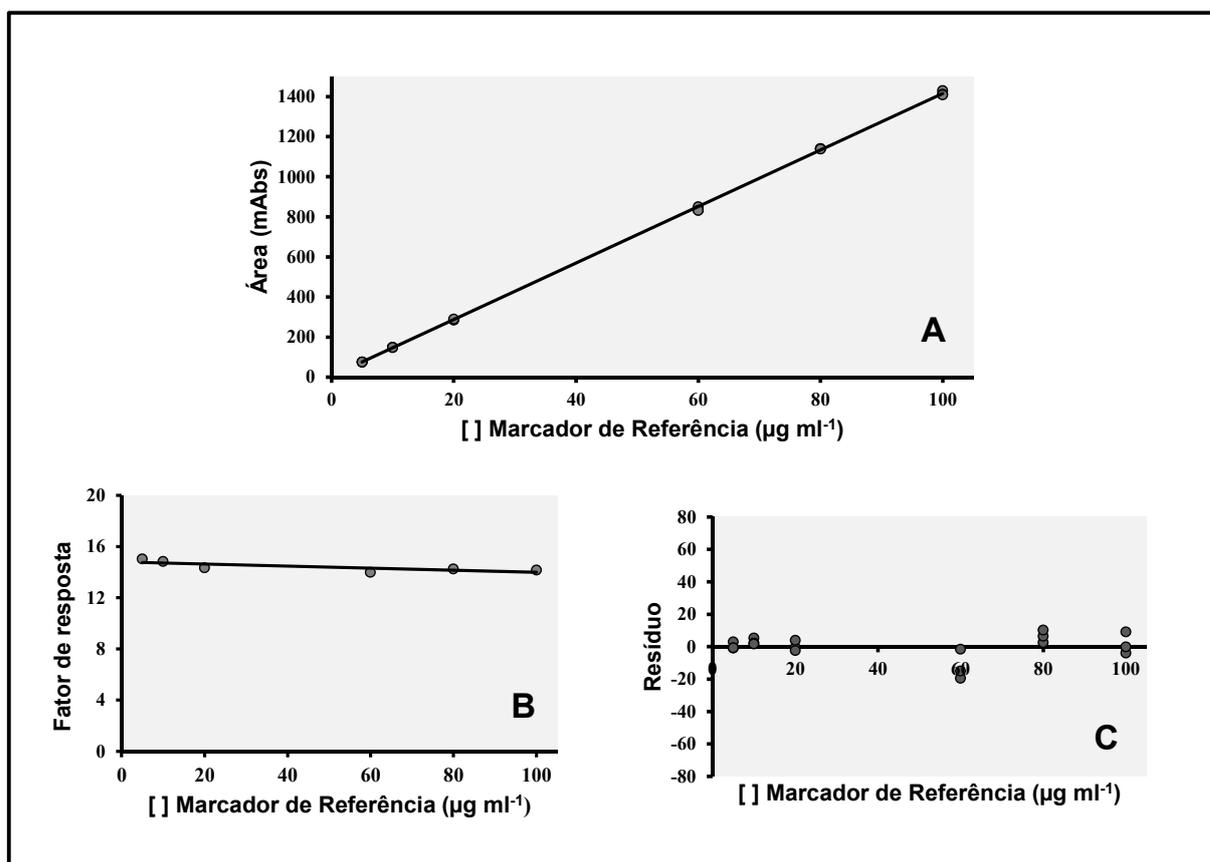


FIGURA 4.11: Curva de calibração do marcador de referência (A), gráfico do fator de resposta (B) e gráfico de análise de resíduo (ANOVA) (C), para todos os níveis de concentração da curva de calibração.

A Tabela 4.4 mostra a ANOVA do modelo de regressão linear, o que confirma a linearidade do modelo, o desvio não significativo do coeficiente angular (valor- $P < 0,05$) e o valor da intersecção que estatisticamente não é diferente de zero (valor- $P > 0,05$). O gráfico pode ser observado na Figura 4.11 C.

TABELA 4.4: ANOVA do modelo de regressão linear para curva de calibração do marcador de referência.

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	$4,73 \times 10^6$	$4,73 \times 10^6$	70778,0	$1,34 \times 10^{-30}$
Resíduo	16	$1,07 \times 10^3$	$6,68 \times 10^1$		
Total	17	$4,73 \times 10^6$			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	4,13	3,10	1,33	0,20	-2,45	10,71
Coefficiente angular	14,11	0,05	266,04	$1,34 \times 10^{-30}$	14,00	14,22

4.1.3.3 - Exatidão e precisão

As amostras para avaliação de precisão e exatidão foram preparadas como descrito no item 3.1.5.2. Os guias do ICH e ANVISA preconizam que a precisão e exatidão devem ser investigadas pela análise de, no mínimo, três controles de qualidade em 5 replicatas de preparo de amostras com níveis de concentrações baixas, média e alta em relação ao intervalo de contração da curva de calibração. As amostras com concentração teórica referente a 6,0; 50,0 e 90,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram preparadas em quintuplicata ($n=5$), injetadas pelo método proposto. A exatidão foi expressa pela relação entre concentração média determinada experimentalmente e concentração teórica correspondente em termos percentuais. As mesmas soluções foram usadas para calcular a precisão a partir do coeficiente de variação (CV %). Os resultados da determinação da precisão e exatidão podem ser observados na Tabela 4.5.

TABELA 4.5: Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão e exatidão para determinação do marcador de referência provenientes de folhas de *Casearia sylvestris*.

Concentração teórica de diterpenóide ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração obtida do marcador de referência ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
6,0	6,02	1,60	0,33
50,0	50,61	1,57	1,20
90,0	90,74	0,51	0,77

A precisão e exatidão expressam a importância que o erro aleatório tem sobre o desempenho do método. A ANVISA e o ICH recomendam que os valores desses parâmetros não excedam 2 %. Assim os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos, indicando boa precisão e exatidão do método analítico.

4.1.3.4 - Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com a relação sinal/ruído, sendo de 10 e 3 vezes para limite de quantificação e limite de detecção respectivamente. Os valores obtidos estavam dentro da faixa de linearidade, obedecendo à lei de Lambert-Beer, correspondendo a $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o limite de detecção e $4,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o limite de quantificação.

4.1.4 - Quantificação do marcador de referência nos extratos vegetais

Os extratos vegetais provenientes de *Casearia sylvestris*, foram quantificados a fim de verificar a quantidade de marcador de referência em 1 mg de fração acetato e extrato rico em casearinas. A análise foi realizada por CLAE, após a injeção da solução contendo 1 mg.mL^{-1} dos extratos vegetais nas condições já citadas no item 3.1.5.1. A área do pico referente ao marcador de referência (20,07min) foi determinada nos cromatogramas como mostrado na Figura 4.12; esse valor foi então submetido à equação da reta já descrita acima. As massas do marcador de referência disponíveis em 1 mg de fração acetato e extrato rico em casearinas encontram-se disponíveis na Tabela 4.6.

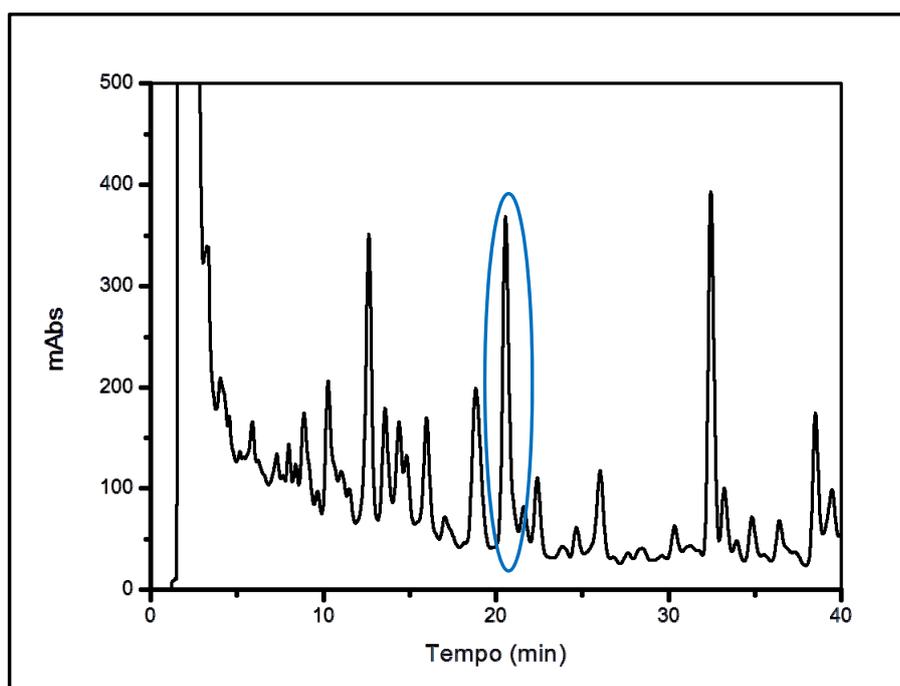


FIGURA 4.12: Cromatograma típico da fração acetato de etila, com destaque pra o marcador de referência em 20,7minutos.

TABELA 4.6: Massa do marcador de referência contida em 1mg de extratos vegetais de *Casearia sylvestris*.

Tipo de extrato vegetal (1 mg.mL ⁻¹)	Massa do marcador de referência (µg. mg ⁻¹)
Fração acetato de etila	65,3
Extrato rico em casearinas	55,5

4.2 - Suspensões Coloidais de Nanopartículas Poliméricas

4.2.1 - Preparação das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas

Através da metodologia de nanoprecipitação proposta por FESSI et al., 1989), foram preparadas 13 suspensões de nanocápsulas (sistemas vesiculares circundado por uma membrana polimérica) e nanoesferas (nanopartículas poliméricas “maciças”) (Figura 4.13), contendo fração acetato ou extrato rico em casearinas, ambos provenientes de folhas de *Casearia sylvestris*, utilizando como polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL). A justificativa para a escolha deste polímero são suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade. O PCL é um poliéster alifático sintético, que é completamente biodegradável no interior do organismo, sendo que os produtos de degradação podem ser absorvidos pelo corpo humano ou removidos pelo sistema metabólico (KIBBE, 2000).

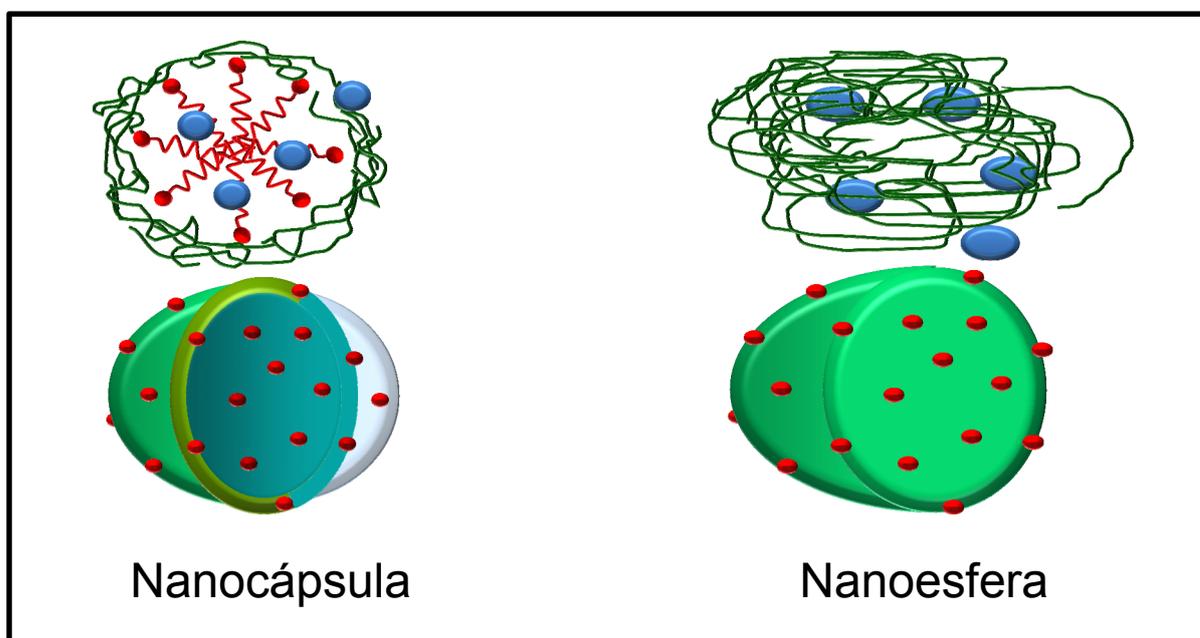


FIGURA 4.13: Esquema do sistema vesiculado da nanocápsula e matriz polimérica maciça da nanoesfera.

No caso das nanocápsulas foi empregado para a formação do núcleo oleoso, o óleo mineral com o objetivo de formar sistemas vesiculados contendo ambiente hidrofóbico circundado por membrana polimérica.

Todas as nanoformulações usaram tensoativos. A finalidade dos tensoativos em sistemas nanométricos é proporcionar estabilidade aos sistemas nanoparticulados. Assim o tensoativo de elevado EHL tende a formar emulsão do tipo óleo/água evitando a sedimentação das partículas e a difusão da substância nanoencapsulada. Por sua vez o tensoativo de baixo EHL tende a formar emulsão água/óleo sendo necessário para a obtenção de nanopartículas pequenas e homogêneas (GUTERRES et al., 1995).

O procedimento de nanoprecipitação geralmente consiste na mistura de uma fase orgânica miscível em água contendo ou não óleo e ainda um surfactante lipofílico, com uma fase aquosa contendo surfactante hidrofílico.

Nos ensaios realizados neste trabalho, o polímero (PCL) foi solubilizado em solvente orgânico (acetona). Depois da adição da fase orgânica a fase aquosa, o polímero se difundiu com o solvente orgânico e foi retido na interface entre o óleo e a água. Nas formulações que não continham óleo, ocorreu a deposição e precipitação do polímero formando nanoesferas maciças constituídas de uma rede polimérica. Conforme relatado por GALLARDO et al., 1993, para polimerização interfacial o principal fator para a formação de nanocápsulas é a difusão do solvente orgânico no meio aquoso. Com a completa miscibilidade da fase orgânica na fase aquosa, o polímero torna-se insolúvel na fase aquosa, precipitando na interface água/óleo (w/o) levando a formação das nanocápsulas. Na ausência de óleo ocorre a precipitação do polímero formando nanoesferas maciças constituídas de rede polimérica.

Após a difusão do solvente orgânico em um meio aquoso para todas as formulações, foi visualizado uma mudança no aspecto da solução, onde o meio aquoso passou a ter um aspecto branco "leitoso", com reflexo esbranquiçado mediante a observação à luz natural, decorrente do efeito Tyndall, típico das suspensões coloidais (MAGENHEIN & BENITA, 1991) indicando a formação das nanopartículas.

4.2.2 - Planejamento Fatorial

Em cada planejamento fatorial foram estudadas 2 variáveis em dois níveis diferentes (baixa e alta) que foram representados pelos valores -1 e +1 respectivamente.

No planejamento fatorial A, as variáveis independentes foram: quantidade de polímero (PCL) sendo o nível baixo representado por 0,08 gramas e o nível alto representado por 0,2 gramas e a quantidade de extrato vegetal onde 0,1 e 0,2 gramas representaram os níveis baixo e alto, respectivamente. No planejamento fatorial B as variáveis independentes foram: quantidade de polímero (PCL) sendo o nível baixo representado por 0,08 gramas e o nível alto representado por 0,2 gramas e a presença ou não de óleo na formulação onde 0,620 gramas e ausência de óleo representaram os níveis alto e baixo, respectivamente. Já no planejamento fatorial C as variáveis independentes foram: quantidade de polímero (PCL) sendo o nível baixo representado por 0,08 gramas e o nível alto representado por 0,2 gramas e tipo de extrato vegetal, onde o nível mais alto (+1) é representado pelo extrato rico em casearinas e o nível mais baixo (-1) é representado pela fração acetato de etila proveniente do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*.

As variáveis dependentes do planejamento fatorial foram: pH, potencial zeta (PZ), recuperação do extrato vegetal (%Rec), e eficiência de encapsulamento (%EE). A quantidade de solvente orgânico, tensoativos, e água foram mantidas em todas as formulações, sendo os valores empregados, já pré-definidos anteriormente (SANTOS, et al., 2011).

Cada planejamento fatorial gerou 4 formulações, totalizando 10 formulações distintas.

4.2.3 - Caracterização físico-química das suspensões coloidais de nanopartículas poliméricas

A análise experimental revelou uma boa reprodutibilidade. No desenvolvimento das formulações as quantidades de polímero (PCL), óleo, tipo de extrato vegetal e quantidade dos extratos vegetais foram avaliadas a fim de obter a melhor estabilidade e dispersão coloidal.

As variáveis dependentes utilizadas para investigar os efeitos de interação foram pH, potencial zeta, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento, esses resultados para cada formulação encontram-se ilustrados na Figura 4.14.

Planejamento Fatorial A						
Formulação	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes			
	X ₁	X ₂	pH	PZ	% Rec	% EE
9	-1	-1	7,0±0,09	-18,52±0,7	49±0,7	0,0±1,1
10	1	-1	7,1±0,05	-19,20±1,2	31±0,9	0,0±0,7
7	-1	1	6,6±1,1	-20,03±0,5	31±1,9	61,7±1,3
8	1	1	6,2±0,6	-29,24±0,9	32±1,3	97,6±0,9

Planejamento Fatorial B						
Formulação	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes			
	X ₁	X ₂	pH	PZ	% Rec	% EE
1	-1	-1	6,3±0,07	-42,62±0,5	79±1,3	43,9±0,4
2	1	-1	6,2±0,04	-35,98±0,9	75±2,3	97,9±1,2
5	-1	1	6,5±0,06	-13,94±0,7	37±1,1	100,0±1,8
6	1	1	6,1±0,09	-18,68±0,5	35±1,5	100,0±1,8

Planejamento Fatorial C						
Formulação	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes			
	X ₁	X ₂	pH	PZ	% Rec	% EE
1	-1	-1	6,3±0,07	-42,62±0,5	79±1,3	43,9±0,4
2	+1	-1	6,2±0,04	-35,98±0,9	75±2,3	97,9±1,2
3	-1	+1	6,3±0,12	-28,01±1,1	97±0,9	47,6±0,8
4	+1	+1	6,0±0,8	-21,17±0,8	82±1,7	81,4±0,9

FIGURA 4.14: Valores obtidos das variáveis dependentes (pH, potencial zeta, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento) referente as suspensões coloidais.

O efeito de cada variável e suas interações foram calculados de acordo com a seguinte equação: Efeito da Variável= + - -, onde + e - são os valores de pH, PZ, %Rec e %EE, os valores mais altos obtidos foram representados por +1 e os valores mais baixos foram representados por -1, tendo assim o efeito de cada variável sobre as formulações de nanopartículas.

Uma das variáveis independentes utilizadas foi presença ou não de óleo mineral. O óleo mineral foi escolhido para formar os sistemas vesiculados por

ser amplamente utilizado em formulações comerciais, apresenta características neutras e é insolúvel em água. É muito utilizado como emulsionante e favorece a inclusão de substâncias lipofílicas bem como melhora a estabilidade do ativo (extrato vegetal). Além disso, tem ação emoliente e não provoca irritação quando utilizados em formulações para pele (LACERDA et al., 2011).

Dois extratos vegetais distintos foram utilizados nos planejamentos fatoriais sendo eles, extrato rico em casearinas e ainda fração acetato de etila proveniente do extrato etanólico. Ambos foram obtidos de folhas de *Casearia sylvestris*. Ainda duas quantidades específicas dos extratos vegetais foram investigadas sendo elas 0,1 e 0,2 gramas. Estas variáveis foram selecionadas com a finalidade de avaliar a estabilidade, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento durante a preparação das formulações de nanopartículas.

O planejamento fatorial A foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de interação da presença do óleo sobre a eficiência de encapsulamento. Observou-se que quando a concentração de polímero passa do nível baixo (-1) para o nível alto (+1) a eficiência de encapsulamento aumenta 18,4%, e ainda em relação ao óleo mineral quando passa do nível -1 para o nível +1 há um ganho na eficiência de encapsulamento de 81,6%. Notou-se também ao analisar o gráfico de efeito (Figura 4.16) que há uma interação significativa entre as variáveis independentes cujo valor é 19,4%. A análise destes resultados deixou claro que a presença de óleo mineral com o objetivo de formar sistemas vesiculados é extremamente importante para a eficiência de encapsulamento nas nanopartículas poliméricas. Isso acontece devido a pouca solubilidade do extrato vegetal em meio aquoso e grande afinidade por parte do extrato com o núcleo oleoso, fazendo com que grande parte do extrato vegetal contido na formulação de nanopartículas fique localizado no núcleo constituído de óleo e quase nada adsorvido na rede polimérica, aumento consideravelmente a eficiência de encapsulamento em formulações constituídas de núcleo oleoso.

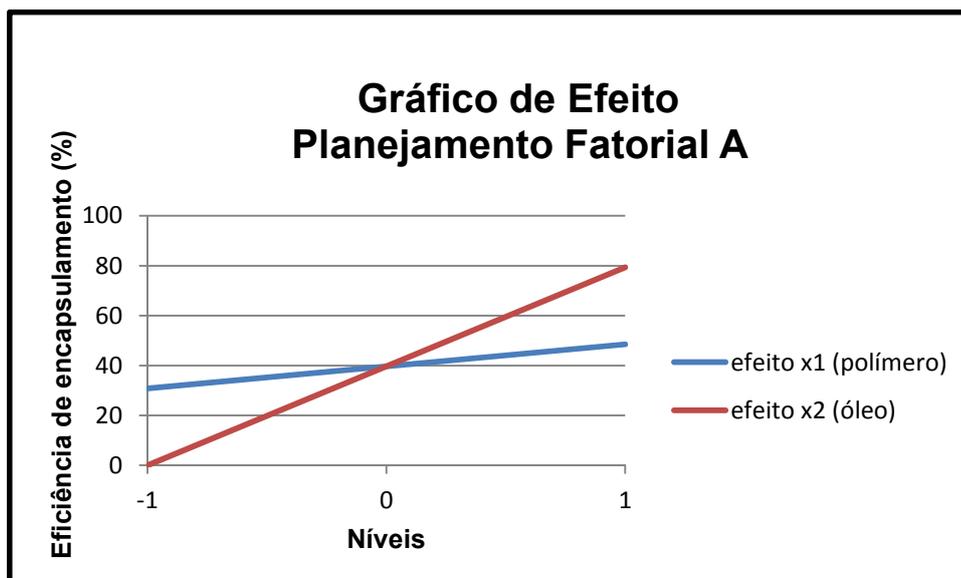


FIGURA 4.15: Gráfico de efeito de interação da quantidade de polímero e presença do óleo sobre a eficiência de encapsulamento.

Como ilustrado na Tabela 4.7, o efeito de interação sobre o pH, potencial zeta e eficiência de recuperação também foram avaliados, porém mostrando interações bem menos substanciais, quando comparados à eficiência de encapsulamento.

TABELA 4.7: Efeito de interação sobre pH; potencial zeta e eficiência de recuperação para o planejamento fatorial A.

Variável dependente	Efeito (%) x1	Efeito (%) x2	Efeito (%) x1.x2
pH	-2,1	-9,2	-3,5
Potencial zeta	16,9	19,8	14,6
Efic. Rec.	-17,3	-17,3	19,4

O pH das formulações coloidais está diretamente relacionado com os compostos da formulação. O tipo de polímero e o óleo utilizado pode causar efeitos no pH. No entanto, os efeitos de interação avaliados quanto ao pH foram muito pouco significativos, como mostra a Tabela 4.7.

A carga da superfície das nanopartículas é um parâmetro importante para avaliação da estabilidade das suspensões coloidais e da interação entre as nanopartículas. A superfície eletrostática das nanopartículas pode ser consequência

da adição de substâncias iônicas da suspensão ou da dissociação de grupamentos do polímero. Quando nanopartículas são preparadas, a formação de uma dupla camada elétrica ocorre em torno das nanopartículas quando em solução. Este potencial eletrostático é chamado de potencial zeta (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

Conseqüentemente o potencial zeta indica o grau de repulsão entre as partículas carregadas, sendo um parâmetro muito utilizado para prever a estabilidade da suspensão coloidal. Nanopartículas com um potencial zeta maior do que +20mV ou -20mV, são consideradas como sendo muito estáveis (WU et al., 2011). Todas as suspensões coloidais apresentaram valores de potencial zeta negativo variando de -18,52 a - 42,62 mV. Estes valores estão de acordo com a literatura que descreve valores negativos para o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), (MULLER et al., 2000).

Para o planejamento fatorial A, observou-se que quando a concentração de polímero passa do nível baixo (-1) para o nível alto (+1) o efeito sobre o potencial zeta é de 16,9%, e ainda em relação ao óleo mineral quando passa do nível -1 para o nível +1 há um efeito de 19,8% sobre o potencial zeta e ainda há um efeito de 14,6% na interação entre a variável x1 e x2 (x1.x2). Ou seja da concentração do polímero e adição de óleo aumenta a negatividade do potencial zeta em 16,9 e 19,8% respectivamente. Essa pequena diferença no efeito se dá pelas interações intermoleculares, onde a presença de óleo aumenta a negatividade do potencial zeta resultando em maior estabilidade nas formulações de nanopartículas.

As análises do planejamento fatorial A mostraram que grandes quantidades de polímero, ou ausência de óleo mineral nas formulações, causam uma perda da eficiência de recuperação de 17,3% nas formulações coloidais. A diminuição da recuperação em altas concentrações de polímero provavelmente se dá pelas interações extrato vegetal-polímero, onde a presença de grandes quantidades de polímero nas formulações dificulta a abertura das nanopartículas em solvente orgânico, não sendo possível a liberação de todo o extrato vegetal, conseqüentemente dificultando sua quantificação e diminuindo a eficiência de recuperação. Já a diminuição da eficiência de recuperação em formulações de nanopartículas sem a presença de óleo, provavelmente se explica pela baixa solubilidade do extrato vegetal, tendo maior afinidade pelo núcleo oleoso. Sendo assim, em formulações sem óleo mineral o único modo de “aprisionamento” do

extrato vegetal é através das redes poliméricas, sendo muito pouco eficiente para compostos hidrofóbicos, ocorrendo a perda da eficiência de recuperação em formulações a formação de vesículas oleosas.

Levando em consideração a importância da presença de óleo mineral nas nanoformulações, iniciou-se um segundo planejamento fatorial onde todas as formulações apresentavam óleo mineral. O planejamento fatorial B foi realizado como objetivo de avaliar o efeito de interação do tipo de extrato vegetal (fração acetato de etila e extrato rico em casearinas) em relação à estabilidade (potencial zeta) das nanoformulações. Observou-se que quando a concentração de polímero passa do nível baixo (-1) para o nível alto (+1), há um efeito irrisório sobre o potencial zeta, sendo esse efeito de -2,2 %. Entretanto em relação ao tipo de extrato vegetal, quando passa-se do nível -1 (fração acetato de etila) para o nível +1 (extrato rico em casearinas), notou-se efeito de 53,9 % no potencial zeta, ou seja, o extrato rico em casearinas aumenta potencial zeta em 53,9 % em relação a fração acetato de etila. Isso pode ser explicado pelo fato do extrato rico em casearinas conter majoritariamente uma classe de composto (as casearinas), e provavelmente esses compostos dificultam a formação da dupla camada elétrica na superfície das nanopartículas, favorecendo a diminuição da negatividade do potencial zeta e consequentemente dificultando a estabilidade da suspensão coloidal. Ainda analisando o gráfico de efeito (Figura 4.16), notou-se a interação de 13,4 % entre as variáveis independentes (x1.x2).

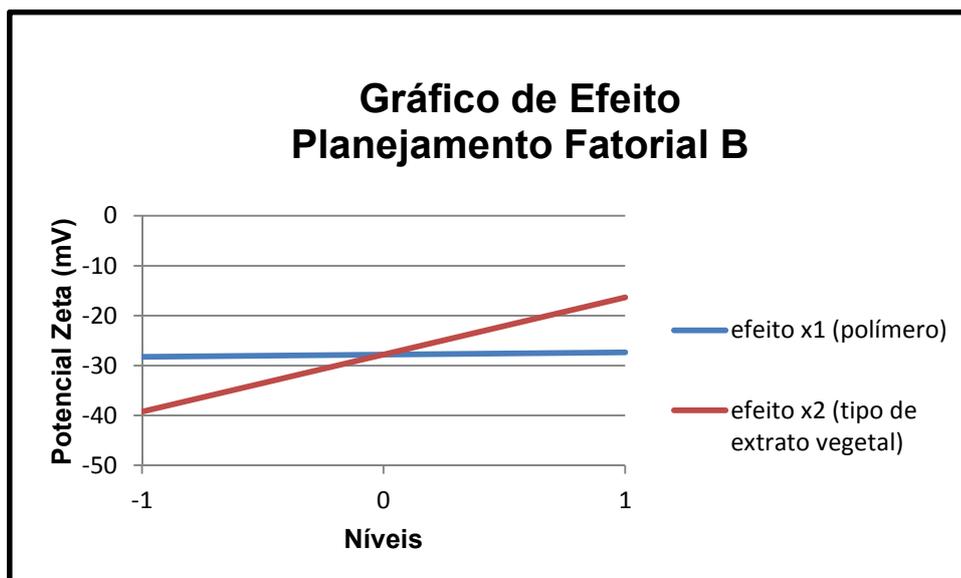


FIGURA 4.16: Gráfico de efeito de interação da quantidade de polímero e tipo de extrato vegetal sobre o potencial zeta.

TABELA 4.8: Efeito de interação sobre pH; potencial zeta e eficiência de recuperação para o planejamento fatorial B.

Variável dependente	Efeito (%) x1	Efeito (%) x2	Efeito (%) x1.x2
pH	-3,8	0,8	-2,3
Efic. Rec.	-3,8	-51,9	1,3
Efic. Encap.	27,0	29,1	-27,0

Como ilustrado na Tabela 4.8, o efeito de interação sobre o pH, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento também foram avaliados. Novamente, os efeitos de interação avaliados quanto ao pH foram muito pouco significativos.

No planejamento fatorial B, quando a concentração de polímero passa do nível baixo (-1) para o nível alto (+1) a um efeito pouco significativo de -3,8 %. Porém, quando observado o efeito de interação para o tipo de extrato vegetal, partindo do nível -1 (fração acetato de etila) para o nível +1 (extrato rico em casearinas), observa-se um efeito de -51,9 %. Isso provavelmente acontece devido a interações moleculares entre polímero e o extrato rico em casearinas dificultando a

liberação do mesmo, conseqüentemente diminuindo drasticamente a eficiência de recuperação.

Os efeitos de interação em relação à eficiência de encapsulamento mostraram que, quando a concentração de polímero passa do nível baixo (-1) para o nível alto (+1), há um efeito de 27 %. Quanto ao tipo de extrato vegetal, partindo do nível -1 (fração acetato de etila) para o nível +1 (extrato rico em casearinas), observa-se um efeito de 29,1 %. Observa-se ainda que a interação entre as variáveis independentes é de -27 % (x1.x2).

Partindo do princípio que nanoformulações contendo fração acetato de etila são 53,9 % mais estáveis que nanoformulações contendo extrato rico em casearinas, e ainda levando em conta que a recuperação para nanoformulações contendo fração acetato de etila é 51,9 % mais eficiente, deu-se início ao desenvolvimento do terceiro e último planejamento fatorial onde todas as formulações continham a fração acetato de etila. O planejamento fatorial C foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de interação da quantidade de extrato vegetal (fração acetato de etila) sobre a eficiência de encapsulamento.

Observou-se que quando a concentração de polímero passa do nível baixo (-1) para o nível alto (+1), há um efeito sobre a eficiência de encapsulamento de 44,8 %. Ainda, em relação à quantidade de extrato vegetal, quando passa do nível -1 para o nível +1, há um efeito de apenas -6,5 %. Notou-se também ao analisar o gráfico de efeito (Figura 4.17), que existe uma interação entre as variáveis independentes de -10,3 %. Isso acontece provavelmente porque altas concentrações de polímero forma uma rede polimérica mais efetiva, “aprisionando” o extrato vegetal de forma mais eficiente, aumentando assim a eficiência de encapsulamento.

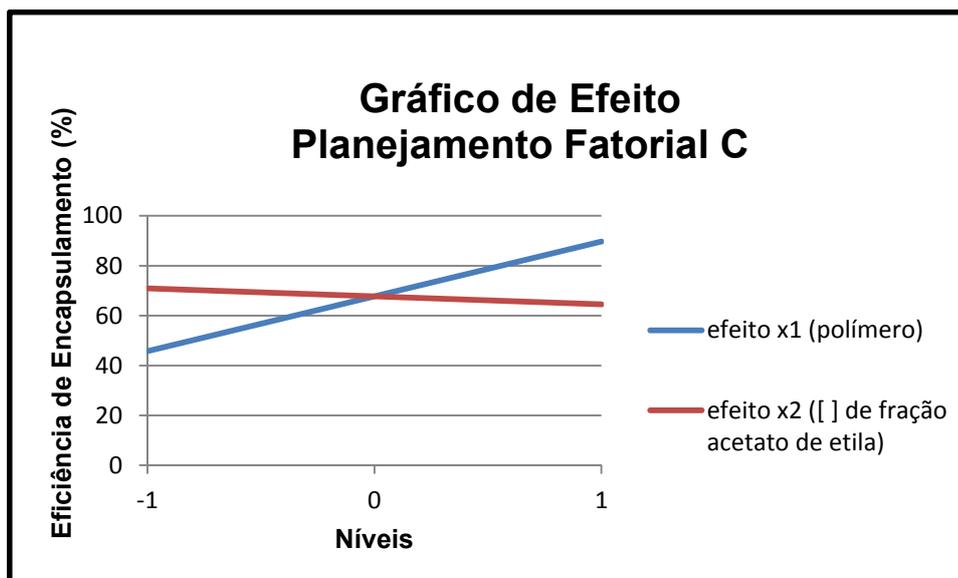


FIGURA 4.17: Gráfico de efeito de interação da quantidade de polímero e concentração do extrato vegetal (fração acetato de etila) sobre a eficiência de encapsulamento.

TABELA 4.9: Efeito de interação sobre pH; potencial zeta e eficiência de recuperação para o planejamento fatorial C.

Variável dependente	Efeito (%) x1	Efeito (%) x2	Efeito (%) x1.x2
pH	-3,2	-1,6	-1,6
Potencial zeta	-15,8	-34,5	0,2
Efic. Rec.	-9,8	12,9	-5,7

Como ilustrado na Tabela 4.9, o efeito de interação sobre o pH, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento também foram avaliados.

Como observados nos planejamentos fatoriais anteriores o efeito de interação em relação ao pH foi insignificante.

Para variações na quantidade de polímero partindo do nível -1 para o nível +1 foi constatado um efeito de -15,8 % sobre o valor do potencial zeta, ou seja, quantidades maiores de polímero diminuem em 15,8 % a estabilidade das nanoformulações. Para variações na quantidade de fração acetato de etila, partindo do nível -1 para o nível +1 foi constatado um efeito de -34,5 %, portanto quantidades

maiores de fração acetato de etila diminuem a estabilidade das nanoformulações em 34,5 %. É sabido que valores ótimos de potencial zeta estão acima de 20 mV, tanto negativo, quanto positivo (isto é, $>+20$ ou >-20 mV). Uma vez que os valores obtidos para o potencial zeta variaram de -42 a -21 mV, essa diminuição da estabilidade não é significativa, já que os valores de potencial zeta para estas formulações estão acima de -20mV.

Observou-se ainda que a quantidade de polímero partindo do nível -1 para o nível +1 causa um efeito de -9,8 % sobre a eficiência de recuperação, enquanto que a quantidade de fração acetato de etila partindo do nível -1 para o nível +1 causa um efeito de 12,9 %. Constatou-se ainda um efeito de interação entre as variáveis independentes de -5,7 %. Concentrações mais altas de polímero diminuem a recuperação em 9,8 %, enquanto que concentrações mais altas de extrato vegetal aumentam a recuperação em 12,9 %. A diminuição da recuperação em altas concentrações de polímero provavelmente se dá pelas interações extrato vegetal-polímero, onde a presença de grandes quantidades de polímero nas formulações dificulta a abertura das nanopartículas em solvente orgânico, não sendo possível a liberação de todo o extrato vegetal, conseqüentemente dificultando sua quantificação e diminuindo a eficiência de recuperação. Já formulações com altas concentrações de extrato vegetal, as interações polímero e extrato são amenizadas favorecendo então a liberação de grande parte do extrato vegetal, aumentando assim a eficiência de recuperação.

Analisando todos os planejamentos fatoriais desenvolvidos neste trabalho, constatou-se que a melhor formulação de nanopartículas é aquela constituída de alta quantidade de polímero, alta concentração de fração acetato de etila e presença de óleo. Dentre as formulações de nanopartículas preparadas, a que apresentou melhor resultado quanto a caracterização físico-química foi a formulação 4. No entanto deve-se ressaltar que uma otimização do procedimento de preparo por meio de técnicas quimiométricas, como por exemplo, a metodologia de superfície de resposta poderia levar a resultados ainda mais promissores.

4.2.3.1 - Análise morfológica das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura

A investigação morfológica das nanopartículas foi realizada por Microscopia eletrônica de Varredura. As fotomicrografias foram obtidas a partir de nanopartículas em solução, secas em suporte metálico ao ar. Porém esse método de secagem forneceu imagens de baixa resolução, não sendo possível detectar a presença de estruturas nanométricas bem definidas, e sim apenas superfícies irregulares como mostra a Figura 4.18.

Tendo como base trabalhos descritos na literatura (MULLER et al., 2000), que descrevem a obtenção de formas secas de nanopartículas através da secagem por Spray-Drying, utilizando um suporte como dióxido de sílcio coloidal (Aerosil® 200), realizou-se a secagem das nanopartículas utilizando 3 % (m/v) de Aerosil® 200.

A presença de nanoestruturas foi claramente evidenciada, em todas as formulações em que se utilizou Aerosil® 200 como adjuvante. Porém já é bem conhecido na literatura (MULLER et al., 2000), que a utilização de adjuvantes provocam aglomeração das nanoestruturas formando estruturas maiores (micrométricas), onde estas estruturas são constituídas por partículas bem menores com tamanho que varia de 300 a 600 nm como mostra a Figura 4.19.

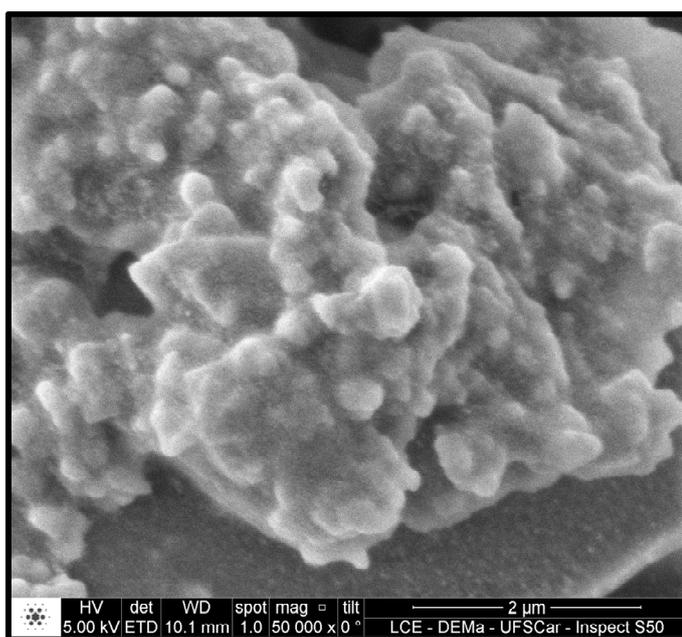


FIGURA 4.18: Imagem de nanopartículas, não sendo possível detectar a presença de estruturas nanométricas bem definidas e sim apenas superfícies irregulares.

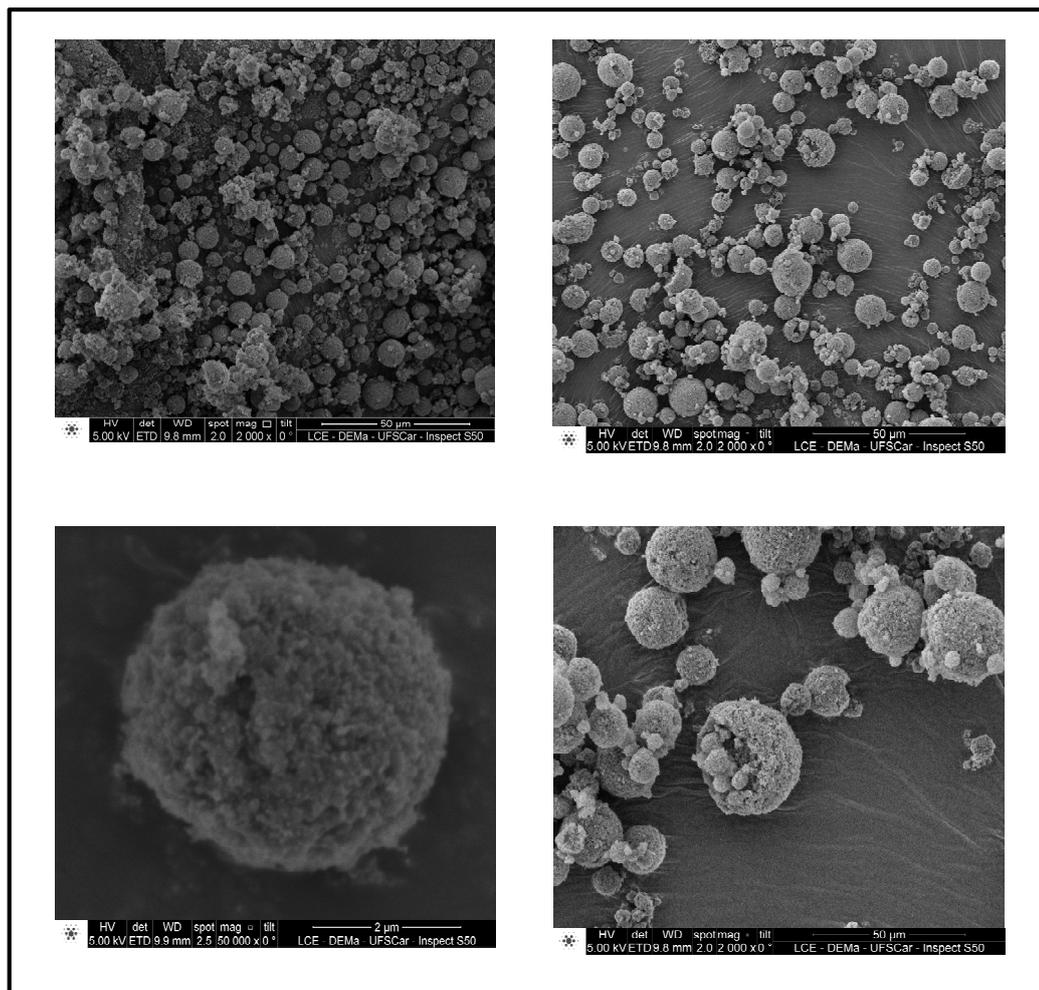


FIGURA 4.19: Fotomicrografias de nanopartículas, secas sobre a presença do adjuvante Aerosil® 200, onde se observa partículas micrométricas, constituídas por partículas bem menores com tamanho que varia de 300 a 600nm.

4.3 - Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados com duas linhagens de células distintas, sendo elas Balb-c (linhagem de fibroblasto sadio de camundongo, utilizada como controle) e a linhagem DU145 (linhagem de carcinoma de próstata).

4.3.1 - Avaliação da atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica da fração Acetato de etila e extrato rico em casearinas em suas correspondentes formulações de nanopartículas, foi realizado pelo uso duas técnicas diferentes:

- Método colorimétrico com 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT), já bem descrito na literatura (MOSMANN, 1983). O ensaio de MTT é considerado um método rápido, sensível e de baixo custo. Analisando a viabilidade e os estado metabólico da célula, este método se basea na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (um sólido com coloração amarela pálida) em formazan (com cor azul), a partir de redutases mitocondriais presentes somente em células metabolicamente ativas (Figura 4.20).

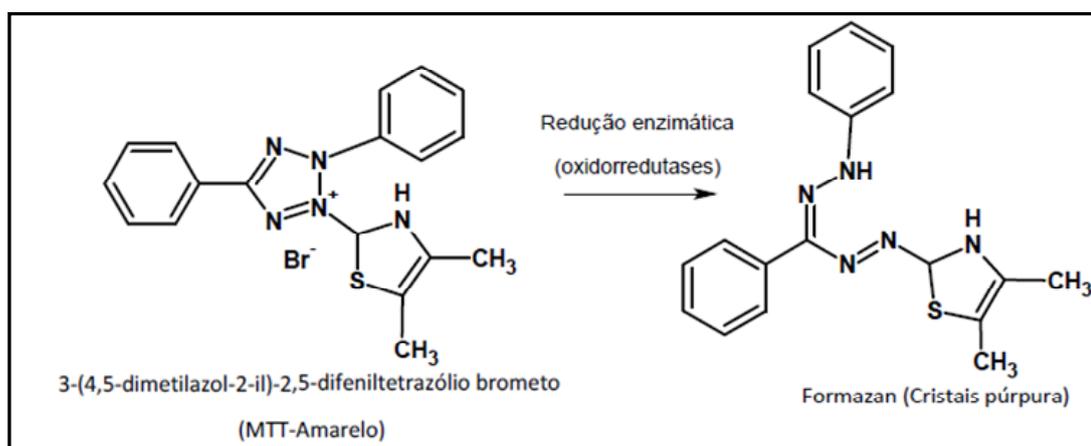


FIGURA 4.20: Conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil tetrazolium em azul de formazan.

- Citometria de fluxo com o uso de compostos fluorogênicos. Esses ensaios têm um custo mais elevado em relação aos ensaios de MTT, porém esta técnica permite detectar as mudanças na forma e conteúdo celular a partir do padrão de dispersão de um feixe de laser que incide na amostra. As células da amostra são analisadas individualmente, a partir de um fluxo contínuo que passa pelo equipamento, diferentemente de outros métodos que determinam somente uma resposta média do conjunto em análise. Assim se obtém a caracterização da heterogeneidade de uma população celular, descrição quantitativa da viabilidade e do fenótipo de forma mais rápida do que a análise por microscopia. Filtros são usados para selecionar o comprimento de onda do laser. Desta forma tem-se a seleção da faixa de emissão de fluorescência que será captada e quantificada a partir de compostos fluorogênicos. A partir da análise do espalhamento da luz é possível afirmar se houve ou não a formação de grânulos citoplasma ou alteração no tamanho da célula, que são alterações fenotípicas relevantes no processo de morte celular.

Neste trabalho, as alterações celulares a serem observadas por citometria de fluxo são: (a) alterações no tamanho da célula, que foram determinadas pela intensidade de luz incidente no fotomultiplicador que não sofre desvio após passar pela amostra (*forward scattering* - FSC); (b) morte celular, distinguindo entre células viáveis e não viáveis baseados na permeabilidade diferencial de compostos fluorogênicos que interagem com o DNA como, por exemplo, o iodeto de propídeo. A descontinuidade da membrana celular é um fenômeno característico em células que estão em processo de morte, sendo possível a permeação dos compostos fluorogênicos até o núcleo celular e interação com o DNA.

Uma análise de tolerância das linhagens de células (DU145 e Balb-c) previamente aos testes com os extratos de interesse foi realizada frente às seguintes concentrações de DMSO: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 % (v/v), uma vez que este solvente é comumente utilizado nas triagens *in vitro* devido à baixa solubilidade das amostras em meio aquoso.

Observou-se que a concentração máxima de DMSO tolerável pelas 2 linhagens de células, sem que este veículo interferisse efetivamente nos resultados de viabilidade, é 0,5 % (v/v) de DMSO, como mostra a Figura 4.21, pois nessa concentração de DMSO tem-se ainda aproximadamente 100 % de células vivas.

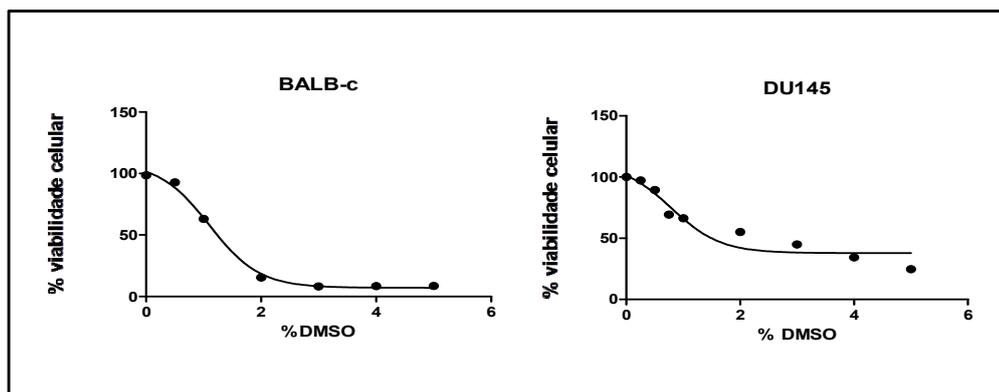


FIGURA 4.21 : Curva de análise de tolerância de DMSO para as linhagens Balb-c e DU145.

Devido à baixa solubilidade dos extratos vegetais e fármaco utilizado como controle positivo em meio aquoso, foi necessário o uso de um veículo (DMSO) para auxiliar a solubilização dos mesmos no meio de cultura. Optou-se então em utilizar o DMSO estéril, já que os extratos vegetais apresentaram excelente solubilidade neste solvente.

Os ensaios iniciais foram realizados por meio do método de MTT, com a determinação da dose-resposta, do quimioterápico Doxorubicina (fármaco amplamente utilizado em tratamento de câncer), utilizado como controle positivo, como mostra a Figura 4.22. Observou-se que o IC_{50} de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ obtido para a linhagem Balb-c está de acordo com os dados descritos na literatura (NANA et al., 2012). Porém, como esperado, não se observou bons resultados deste quimioterápico frente à linhagem de carcinoma de próstata DU145, já que esta linhagem se trata de um carcinoma resistente. Os quimioterápicos atualmente em uso clínico são muito pouco eficazes contra esse tipo de neoplasia, não sendo possível determinar uma curva dose-resposta para a DU145 (Figura 4.22).

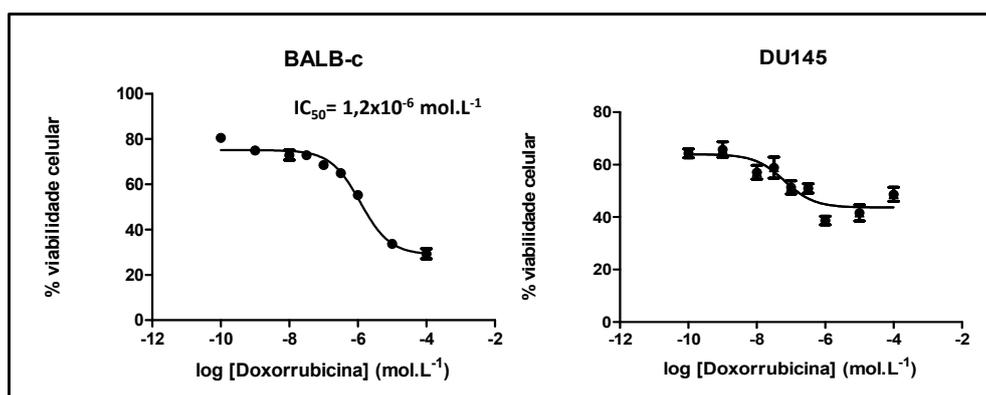


FIGURA 4.22: Determinação da curva dose-resposta do quimioterápico Doxorubicina, utilizado como controle positivo.

Posteriormente foi feito o estudo de dose-resposta frente à fração acetato de etila (i), extrato rico em casearinas (ii) e composto isolado e identificado como catequina (iii), utilizando o método de MTT, a fim de avaliar suas atividades citotóxicas sem a influência das nanopartículas.

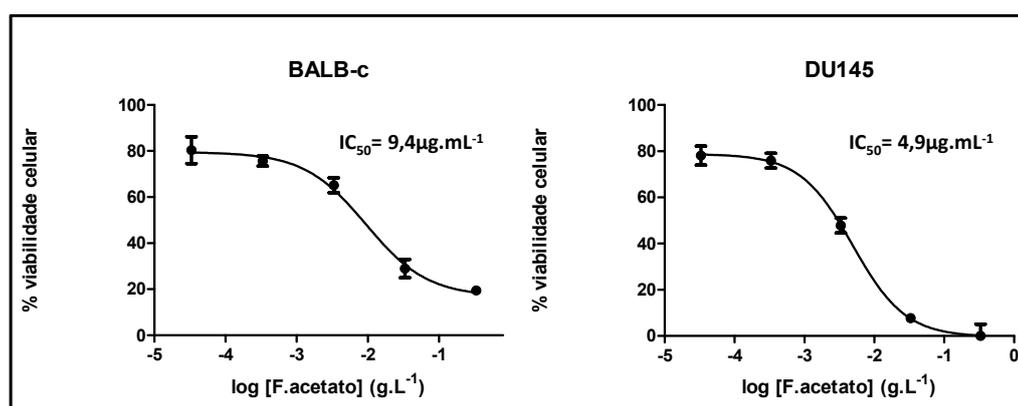


FIGURA 4.23: Curva de dose –resposta da fração acetato de etila para as linhagens Balb-c e DU145.

Para a fração acetato de etila, observou-se um IC₅₀ de 9,4 µg.mL⁻¹ para a linhagem Balb-c (células normais) e um IC₅₀ de 4,9 µg.mL⁻¹ para linhagem de carcinoma de próstata como mostra a Figura 4.23. Os valores de IC₅₀ obtidos para ambas as linhagens estão de acordo com os dados descritos na literatura. FERREIRA et al, (2007) relatou que casearinas isoladas apresentam IC₅₀ de 0,5 a 10 µg.mL⁻¹, em diferentes linhagens de células para leucemia.

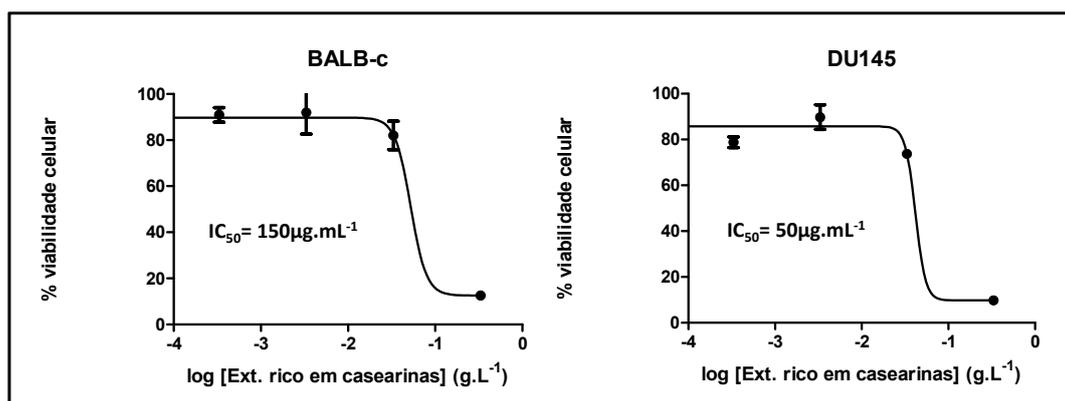


FIGURA 4.24 : Curva de dose-resposta do extrato rico em casearinas para as linhagens Balb-c e DU145.

Para o extrato rico em casearinas, observou-se um IC_{50} de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a linhagem Balb-c (células normais) e um IC_{50} de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para linhagem de carcinoma de próstata como mostra a Figura 4.24. Apesar de os valores de IC_{50} obtidos para ambas as linhagens serem valores extremamente altos, quando comparados a controles positivos como, por exemplo, a Doxorrubicina e até mesmo casearinas isoladas que apresentam IC_{50} de $0,5$ a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FERREIRA et al, 2007) é necessário levar em conta que o trabalho foi realizado com um extrato vegetal, onde existe uma mistura de compostos em baixas concentrações.

Ainda é válido observar que houve uma diferença relevante entre o IC_{50} obtido para Balb-c e DU145, tanto para a fração acetato de etila quanto para o extrato rico em casearinas, indicando uma seletividade entre células normais e células neoplásicas. Também é importante ressaltar que nas concentrações mais altas da fração acetato de etila observa-se 20 % de células vivas para a linhagem Balb-c (células sadias). O mesmo não ocorre para as células cancerígenas, estando mortas em sua totalidade (Figura 4.23). Estes resultados são bastante promissores, já que a linhagem DU145 é uma linhagem de carcinoma de próstata resistente, onde os quimioterápicos usuais são muito pouco efetivos, como observado para o quimioterápico doxorrubicina.

Já citado anteriormente, o outro composto testado foi a catequina. As propriedades biológicas da catequina têm sido amplamente reportadas na literatura, mostrando que são responsáveis pelos efeitos benéficos de muitos alimentos e bebidas. A catequina apresenta atividade sequestradora de radicais livres 10 vezes

maior que o L-ascorbato (vitamina C) e β -caroteno (AYRES & CHAVES, 2009), justificando a avaliação do seu potencial citotóxico no presente trabalho.

A catequina foi isolada e identificada a partir da fração acetato de etila, proveniente do extrato de folhas de *Casearia sylvestris*. Este composto foi avaliado através do método de MTT para determinar sua atividade citotóxica, nas duas linhagens celulares (Balb-c e DU145).

Após análise dos dados (Figura 4.25), constatou-se que houve uma resistência muito maior por parte da linhagem de carcinoma de próstata (DU145) em relação à Balb-c. Na concentração mais alta de catequina testada (1 mg.mL^{-1}), foi observado que 40% de células neoplásicas estavam vivas, indicando uma baixa eficácia da catequina sobre células de carcinoma de próstata.

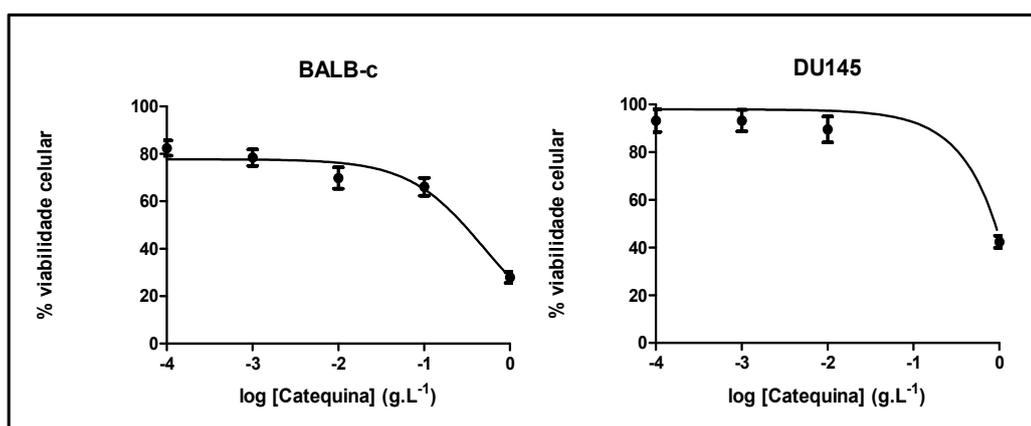


FIGURA 4.25: Análise da atividade do composto identificado como catequina para as linhagens Balb-c e DU145.

Apesar do método de MTT apresentar boa reprodutibilidade e menores custos, foram observados alguns interferentes relacionados à composição das nanopartículas, dificultando a avaliação da viabilidade celular na presença destas. Devido a interferências na análise optou-se por avaliar a citotoxicidade das formulações de nanopartículas por citometria de fluxo.

Inicialmente foram testadas 5 concentrações de nanopartículas, sendo elas 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10 % (v/v), porém notou-se que concentrações de nanopartículas acima de 3,0 % (v/v), quando em contato com o meio de cultura, passavam a formar aglomerados, fenômeno observado por citometria de fluxo. Isso provavelmente é resultado da presença de íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio de cultura,

que alteram a dupla camada elétrica na superfície das nanopartículas favorecendo a formação de aglomerados. Portanto deve-se trabalhar com concentrações até 3,0 % (v/v) de nanopartículas.

No ensaio de toxicidade, as formulações 11, 12 e 13 (Tabelas 3.1 e 3.2) correspondendo a formulações de nanopartículas vazias, observou-se uma redução da viabilidade celular para a linhagem Balb-c em apenas 9,8; 10,9 e 9,4 % respectivamente em relação ao controle quando utilizado a maior concentração de nanopartículas referente a 3 % (v/v). Para a linhagem DU145, na presença da mesma concentração de nanopartículas (3 % v/v), os resultados obtidos foram 15; 6,7; 7,7 % em relação ao controle como mostra a Figura 4.26.

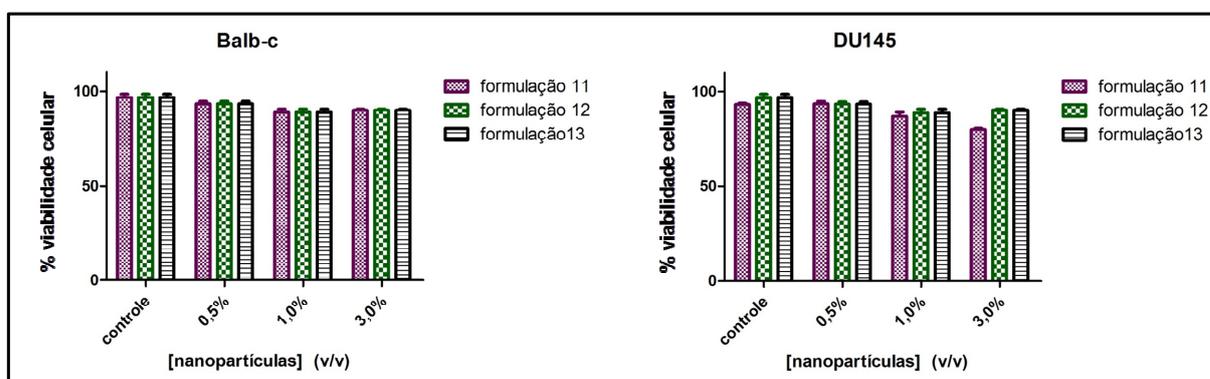


FIGURA 4.26: Atividade citotóxica das formulações 11, 12 e 13 (formulações de nanopartículas vazias) utilizadas nas linhagens celulares Balb-c e DU145, onde controle representa células sem presença de formulações de nanopartículas.

Esses valores confirmam a baixa toxicidade desse sistema de liberação, evidenciando a biocompatibilidade não somente do polímero, mas também dos outros constituintes das nanopartículas (ZEISSER-LABOUEBE et al., 2006).

As formulações de nanocápsulas 1; 3; 5 e 7 (Tabelas 3.1 e 3.2), não apresentaram citotoxicidade relevante nas concentrações referentes a 0,5 % (v/v) em comparação ao controle (células sem a presença de nanopartículas) tanto para a linhagem Balb-c quanto para a linhagem DU145 (Figura 4.28). Já a segunda concentração testada (1,0 % v/v) a formulação 7, apresentou uma citotoxicidade de 19,5 % para Balb-c e uma citotoxicidade de 26,8 % para DU145. A formulação 3 apresentou uma citotoxicidade de 15 % e 37,5 % para Balb-c e DU145 respectivamente, mostrando uma seletividade por parte das nanopartículas entre

células saudáveis (Balb-c) e células de carcinoma de próstata (DU145). Para a formulação 5 observou-se uma citotoxicidade de 34 % e 17,3 % para Balb-c e DU145 respectivamente, mostrando que houve maior potência para células saudáveis em relação a células de carcinoma de próstata, resultado muito pouco favorável já que atualmente o grande desafio para o tratamento de câncer é a busca por um fármaco que exerça seletividade entre células neoplásicas e células saudáveis. Tendo em vista que os efeitos colaterais são um dos principais limitantes para o sucesso do tratamento quimioterápico, a redução da citotoxicidade para células normais é o principal objetivo a ser alcançado na busca de novos tratamentos anticâncer (BRANDÃO et al., 2010).

Para a formulação 7, foi observado uma citotoxicidade de 24,6 % para Balb-c e 45 % para DU145 (Figura 4.27). Apesar de observar uma atividade contra células saudáveis, notou-se uma maior potência contra células de carcinoma de próstata. Levando em consideração que a DU145 é uma linhagem resistente de carcinoma de próstata e atualmente não existe nenhum quimioterápico comercial totalmente efetivo contra esse tipo de carcinoma (RAI et al., 2010), os resultados obtidos para esta formulação de nanopartículas mostraram-se promissores.

Os resultados mostraram que as formulações com maior concentração de extrato vegetal (formulações 3 e 7), são mais potentes que as formulações com a metade da concentração (formulações 1 e 5). Além disso, vale ressaltar que a formulação 7 (extrato rico em casearinas) foi equipotente a formulação 3. Isto demonstra que sistemas nanoparticulados alteram as propriedades farmacocinéticas como biodispersão, desorção do extrato vegetal adsorvido na superfície da partícula e difusão do extrato vegetal pela matriz polimérica, que refletem a maior potência deste extrato vegetal nanoencapsulado em relação ao extrato livre. Estudos mais aprofundados relativos a solubilidade e dispersão no meio e permeabilidade na membrana celular serão necessários para auxiliar na investigação de quais fatores são mais alterados quanto ao uso de formulações de nanopartículas. De tal modo que a formulação com extrato rico em casearinas é equipotente a formulação com fração acetato de etila, embora esta última tenha sido 10 vezes mais potente em relação ao extrato rico em casearinas quando testado na forma livre.

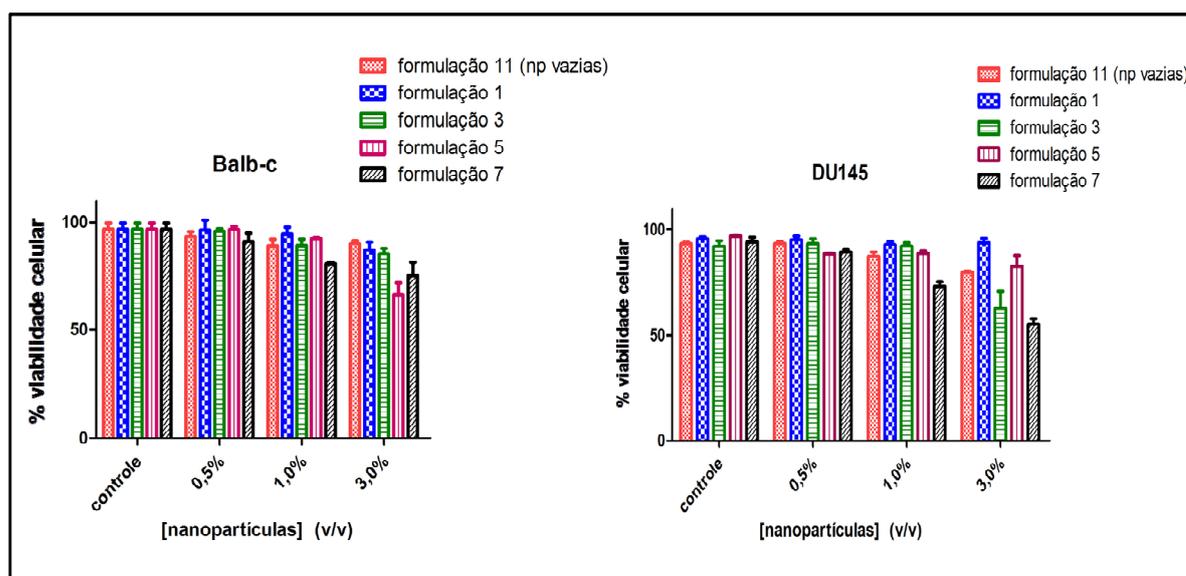


FIGURA 4.27: Atividade citotóxica das formulações 11; 1; 3; 5 e 7, nas linhagens celulares Balb-c e DU145.

Onde np vazias, significa formulação de nanopartículas vazias, e controle corresponde a células sem a presença de formulação de nanopartículas.

As formulações de nanocápsulas 2, 4, 6 e 8 (Tabelas 3.1 e 3.2), não apresentaram citotoxicidade relevante nas concentrações referentes a 0,5 e 1,0% (v/v) em comparação ao controle (células sem a presença de nanopartículas) tanto para a linhagem Balb-c quanto para a linhagem DU145 (Figura 4.28). Já a terceira e mais alta concentração testada 3,0 % (v/v) para a formulação 2, apresentou uma citotoxicidade mais baixa que as formulações 4, 6 e 8. As formulações de nanocápsulas 2, 4, 6 e 8, apresentaram seletividade entre células saudáveis e células neoplásicas para a concentração de 3 % (v/v). As formulações 6 e 8 (formulações com extrato rico em caseínas) apresentaram resultados equipotentes às formulações 2 e 4 (fração acetato de etila), confirmando mais uma vez que sistemas nanoparticulados alteram as propriedades farmacocinéticas do extrato vegetal. Em última análise, a formulação com extrato rico em caseínas é igualmente potente à formulação com fração acetato de etila, embora esta última tenha sido 10 vezes mais potente em relação ao extrato rico em caseínas quando testado na forma livre.

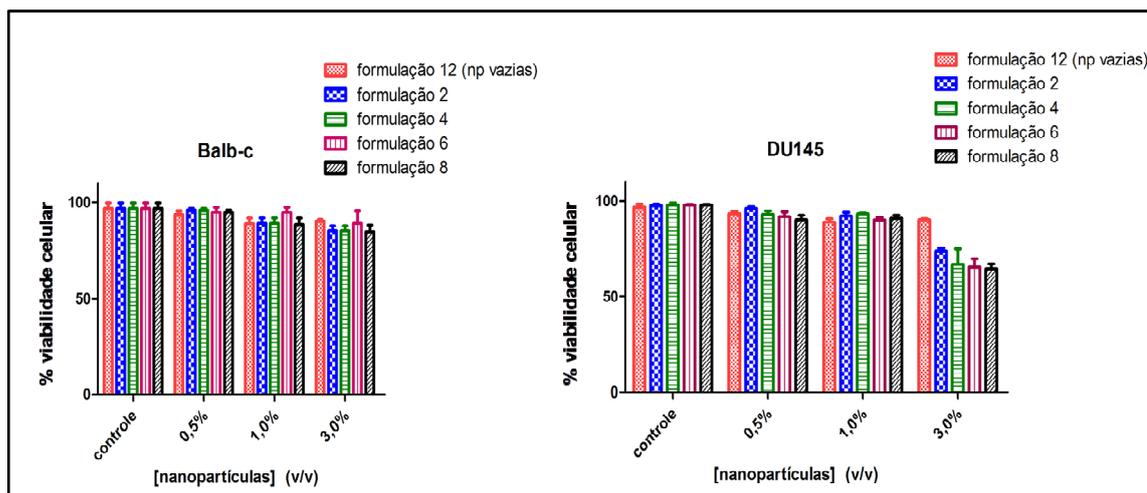


FIGURA 4.28: Atividade citotóxica das formulações 12; 2; 4; 6 e 8, nas linhagens celulares Balb-c e DU145.

Onde np vazias significa nanopartículas vazias, sendo o controle correspondente a células sem a presença de nanopartículas poliméricas.

As formulações 9 e 10 (Tabela 3.2), correspondem a formulações de nanoesferas (sem a presença do núcleo oleoso). Para as duas linhagens celulares a concentração mais baixa de nanopartículas referente a 0,5 % (v/v) não apresentou citotoxicidade relevante. Já nas concentrações 1,0 % e 3,0 % (v/v), a citotoxicidade apresentada pela linhagem Balb-c para a formulação 9 foi de 31 % e para a formulação 10 foi aproximadamente de 23 % (Figura 4.29).

Para células de carcinoma de próstata (DU145) as formulações 9 e 10 na concentração de 1,0 % (v/v) não apresentaram citotoxicidade relevante. Já para a concentração de 3,0 % (v/v), a citotoxicidade foi de 39 % e 27 % respectivamente. Levando em consideração o efeito citotóxico dessas formulações em células saudáveis, é possível considerar que a atividade dessas formulações não é satisfatória, já que a mortalidade de células normais é muito próxima da mortalidade de células neoplásicas, mostrando pouca ou nenhuma seletividade (Figura 4.29). Portanto é possível afirmar neste estudo que sistemas nanoparticulados com vesículas oleosas são mais eficazes que sistemas sem núcleo oleoso.

Os resultados descritos acima já eram esperados, considerando que as formulações 9 e 10 obtiveram uma eficiência de encapsulamento nula (% Rec=0); dessa forma, o ativo (extrato vegetal) se manteve livre em solução, estando sujeito a degradação e conseqüentemente diminuindo sua atividade citotóxica para células neoplásicas e possivelmente se tornando tóxico para células saudáveis (FERREIRA et al., 2006).

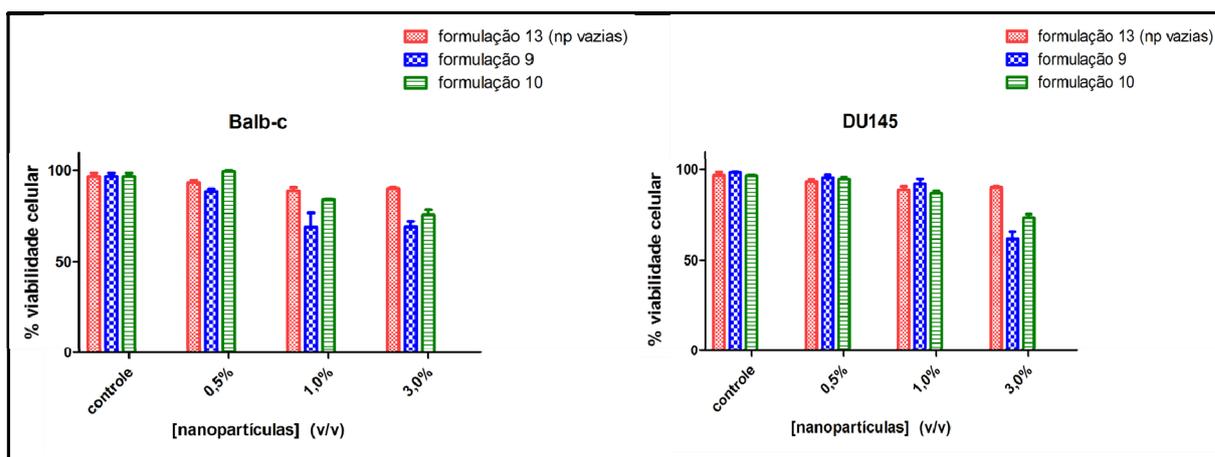


FIGURA 4.29: Atividade citotóxica das formulações 13; 9 e 10, utilizadas nas linhagens celulares Balb-c e DU145.

Onde np vazias significa nanopartículas vazias, sendo o controle correspondente a células sem a presença de nanopartículas poliméricas.

A diferença de citotoxicidade das formulações de nanopartículas está diretamente ligada a liberação do ativo das nanopartículas, que por sua vez está relacionada a diversos fatores, como a desorção do extrato vegetal adsorvido na superfície da partícula, a difusão do fármaco pela matriz polimérica, a velocidade de erosão da matriz polimérica e os processos de erosão e difusão combinados (SOPPIMATH et al., 2001).

Quando o fármaco está disperso na nanopartícula, a sua liberação ocorre gradativamente da matriz polimérica por difusão. E, quando ele encontra-se conjugado com a matriz polimérica, a erosão ou a degradação do polímero é responsável pela sua liberação (PARK et al., 2008). Sendo assim, as formulações 2; 3; 4; 6; 7 e 8 apresentaram uma maior potência em um período de 24 horas, provavelmente devido a uma quantidade maior de extrato vegetal adsorvida na superfície da partícula. Quando essas formulações estão no ambiente de liberação, esta ocorre quase que imediatamente e posteriormente, há a liberação lenta e gradativa do extrato vegetal contido no núcleo oleoso pela difusão e erosão da matriz polimérica. Possivelmente se os ensaios fossem realizados por um período maior que 24 horas, uma quantidade maior de extrato vegetal seria liberada, aumentando assim sua potência.

As formulações 2; 3; 4; 6 e 8 apresentaram resultados satisfatórios com 3 % (v/v) de nanocápsulas, sendo esses valores na ordem de 30 % para a linhagem

de carcinoma de próstata. Todas essas formulações apresentaram seletividade entre células normais e células neoplásicas.

CONCLUSÃO

5 - CONCLUSÃO

A coleta e preparo dos extratos vegetais foram realizados com sucesso, garantindo o isolamento e identificação de constituintes químicos da *Casearia sylvestris*, sendo eles, o flavonóide catequina e o diterpeno da classe dos clerodanos, utilizado neste trabalho como marcador de referência.

Um método analítico usando CLAE foi desenvolvido e validado a fim de padronizar os extratos vegetais garantindo o controle de qualidade e reprodutibilidade de ensaios futuros. Este mesmo método analítico foi utilizado para caracterização das nanopartículas quanto a eficiência de recuperação e encapsulamento nas formulações de nanopartículas desenvolvidas através dos planejamentos fatoriais 2².

O planejamento fatorial possibilitou avaliar simultaneamente quais das variáveis realmente eram significativas através das interações entre elas. Além disso, possibilitou reduzir o número de experimentos. Sendo assim foi possível avaliar as variáveis dependentes pH, potencial zeta, eficiência de recuperação e eficiência de encapsulamento em relação as variáveis independentes quantidade de polímero, quantidade de extrato vegetal, presença ou não de óleo e tipo de extrato vegetal. Após a análise dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes, determinou-se que a melhor formulação de nanopartículas seria aquela que é constituída de alta quantidade de polímero, alta concentração de extrato vegetal e presença de óleo. Estas características permitiram concluir que a formulação mais otimizada foi a 4 contendo fração acetato de etila proveniente do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*.

Todas as formulações de nanopartículas desenvolvidas foram ensaiadas em duas linhagens celulares, Balb-c e DU145 por citometria de fluxo, a fim de avaliar sua atividade citotóxica. Nestes ensaios as formulações 2; 3; 4; 6 e 8 apresentaram resultados citotóxicos satisfatórios na concentração 3 % (v/v) para linhagem de carcinoma de próstata. Todas essas formulações apresentaram seletividade entre células normais e células neoplásicas, demonstrando que há grande potencial de aplicação para os sistemas nanoparticulados para modular propriedades do extrato vegetal proveniente de *Casearia sylvestris*, conforme observado nos ensaios comparativos entre extratos vegetais livres e suas respectivas nanoformulações.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSY, M. L. & SCANONE, O. "Sobre a morfologia e anatomia de *Casearia sylvestris* Swartz". Boletim de Zoologia e Biologia Marinha. **30**:641,1973.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. DEL C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. & LOPES, M. T. P. "Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução". Quim. Nova, **28**:118, 2005.

ANVISA, Validação de metodologia analítica, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, acesso em 23 fev. de 2013.

AYRES, M. C. C. & CHAVES, M. H. "Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia*", Quim. Nova, **32**:1509, 2009.

BALUNAS, M. J.; JONES, W. P. & CHIN, Y. W. "Relationship between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project". Chem. and Biodiv., **8**,:897, 2006.

BANDEIRA, K. F.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S. & CAVALHEIRO, A. J. "Optimisation of conditions for the extraction of casearins from *Casearia Sylvestris* using response surface methodology". Phytochem. Anal., **17**:68, 2006.

BISSERY, M. A.; GUENARD, D.; GUERITTE-VOEGELEIN, F. & LAVELLE, F. "Experimental antitumor activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol analogue". Cancer Res., **51**:4845, 1991.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. & HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. "Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (flacourtiaceae) on actions of snakes and bee venoms and on activity of phospholipases A₂". Comp. Biochem. Physiol., **127B**:21, 2000.

BRAMBILLA, G. & MARTELLI, A. "Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals". Mutation Research, **681**:209, 2009.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. & DAVID, J. M. "Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas". Quim.Nova, **33**:1359, 2010.

BRAZ FILHO, R. "Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente" Quim. Nova, **33**: 229, 2010.

BUTLER, M. S. "The role of natural product chemistry in drug discovery". J. Nat. Prod., **67**: 2114, 2004.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T. & BRNNON-PEPPAS, L. "Active targeting schemes for nanoparticles systems in cancer therapeutics". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **60**:1615, 2008.

CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINCEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F. I. & PALOZZA, P. "DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism". *Toxicology and Applied Pharmacology, San Diego*, **211**: 87, 2006.

CAMARGO, F. G.; GOMES, E.; PANNUNZIO, E. & BUENO, V. S. "Uso tópico de extrato fluido de folhas de Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swarts) topicamente em lesões de estomatite herpética". *LECTA-USF. Brag Pta.*, 1:121, 1993.

CARVALHO, P. R. F.; BOLZANI, V. S. & FURLAN, M. "Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia Sylvestris*". *Phytochem.*, **49**:1659, 1998.

CAUSON, R. "Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion". *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **689**:175, 1997.

CHASIN, A. M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADOR, M. C.; FERNÍCOLA, N. A.G.; GORNI, R. & SALCEDO, S. "Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral". *Rev. Bras. Toxicol.* **11**:1, 1998.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V. & JIMENEZ, P. C. "Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas". *Quim. Nova*, **32**:703, 2009.
DOLL, R. & PETO, R. "The cause of câncer . quantitave estimatives of available risks of cancer in the United States today". *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**:1192, 1981.

EISENHAUER, E. A. & VERMORKEN, J. B. "The toxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential". *Drug*, **55**:5, 1998.

EL-ZAYAT, A. A. E.; DEGEN, D.; DRABEK, S.; CLARK, G. M.; PETTIT, G. R. & VON HO, D. D. "*In vitro* evaluation of the antineoplastic activity of Combretastin A-4, a natural product from *Combretum Caffrum* (Arid Shrub)". *Anticancer Drugs*, **4**:19, 1993.

FERREIRA, P. M. P. "Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia Sylvestris* Swarts". Fortaleza, Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do Ceará, 2006. Dissertação (mestrado em farmacologia), 116f.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. H.; AMMOURY, N. & BENITA, S.; "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement". *Intern.Jour. Pharmac.*, **55**:R1, 1989.

GALLARDO, M. M.; COUARRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P. & PUISIEUX, F. "Study of the mechanism of formation of nanoparticles and nanocapsules of polysobutyl-2-cyanocrylate". *Inter. J. Phar.* **100**:55, 1993.

GAO, W.; BOHL, C. E. & DALTON, J. T. "Chemistry and structural biology of androgen receptor". *Chem. Rev.*, **105**: 3352, 2005.

GEBHARDT, R. “*In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel”. *Planta Med.*, **66**: 99, 2000.

GONCALVES, A. S.; MACEDO, A. S. & SOUTO, E. B. “Therapeutic nanosystems for oncology nanomedicine”. *Clin. Transl. Oncol.* **14**:883, 2012.

Guava Technologies, Guava ViaCount, catalog No.4000-0041.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J-P. & PUISIEUX, F. “Poly(D-L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study”. *Int. J. Phar.* **113**: 57, 1995.

HEGNAUER, R. “Chemotaxonomie der Planzen”. Birkhauser, Band 4, Birkhauser Verlag, Basel and Stuttgart, Germany, 1966.

HOEHNE, F. C. “Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais”. Ed. Graphicars, São Paulo, 1939, p. 196.

HORTWIZ, S. B. “Personal recollections on the early development of Taxol”. *J. Nat. Prod.*, **67**:136, 2004.

<http://clinicaltrials.gov> acesso: 28 de dez. 2012.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) Mortalidade 2012, disponível em: <http://mortalidade.inca.gov.br/> acesso 28 dez. de 2013.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa 2012- Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2012, disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>, acesso 3 fev. de 2013.

International Conference on Harmonisation (ICH), guidelines, disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines.html>, acesso em 26 fev. de 2013.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N. & MORITA, H. “New Antitumor Principles, Casearins A-F, for *Casearia Sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae)”. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**:3384,1990.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K. & OBATA, E. “Antitumor principles from *Casearia Sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), estructure elucidation of new clerodane diterpene By 2-D NMR spectroscopy”. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**:1585, 1988.

ITOKAWA, H. “Isolation of diterpenes as antitumor agents from plants”. Patente Japão: Kokai Tokyo Koho-01; **149**:779, 1989.

KIBBE, A. H. (ED), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3.ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KONING, G. A. & KRIJGER, G. C. “Targeted multifunctional lipid-based nanocarriers for image-guided drug delivery anti-cancer agents”. *Med. Chem.*, **7**:425, 2007.

LACERDA, S. P.; CERIZE, N. N. P. & RÉ, M. I. “Preparation and characterization of carnauba wax nanostructure lipid carriers containing bensophenone-3”. *J. Cosmet. Sci.* **33**:312, 2011.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASSIO, P. & MEDEIROS, M. H. G. "Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese". Quim. Nova, **25**:777, 2002.

MAGENHEIM, B. & BENITA, S. "Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach". S.T.P. Pharma Sciences, **1**: 221, 1991.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T. & MANTOVANI, M. S. "Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC V79 cells By Cometa assay". Toxicol. In Vitro, **18**:337, 2004.

MATTHEOLABAKIS, G.; RIBAS, B. & CONSTANTINIDES, P. "Nanodelivery strategies in câncer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives". Nanomedicine. **7**:1577, 2012.

MAZZAFERRO, S.; BOUCHEMAL, K. & PONCHEL, G. "Oral delivery of anticancerdrugs III: formulation using drug delivery systems". Drug Discovery Today, **18**:1, 2013.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P. & MOTIDOME, M. "Structure and cytotoxic activity relationship of casearins, new diterpenes from *Casearia Sylvestris* Sw." Chem.Pharm. Bull., **39**: 693, 1991.

MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". J. Immunol. Methods, **65**:55,1983.

MU, L. & FENG, S. "Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanosphere for controlled release of Paclitaxel (Toxolo)". J. Control. Release. **80**:129, 2002.

MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, P. R.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. "Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules". Drug Devel. And Industrial Phar. **26**:343, 2000.

NAHRTEDT, A.; PROKSCH, P & CONN, E .E. "Dhurrin, (-)- catequin, flavonol glycosides and flavones from *Chamaebatia foliolosa*" Phytochem, **26**:1546, 1987.

NANA, F.; SANDJO, L. P.; KEUMEDJIO, F.; AMBASSA, P.; MALIK, R.; KUETE, V.; RINCHEVAL, V.; CHOUDHARY, M. I. & NGADJUI, B. T. "Ceramides and cytotoxic constituents from *Ficus glumosa* del. (Moraceae)". J. Braz. Chem. Soc., **23**:482, 2012.

NAUGHTON, C. A. "Drug-induced nephrotoxicity". Am. Fam. Physician, **78**:743, 2008.

NEBO, L. "Atividade inseticida de espécies de *trichilia* frente à lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*." São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2088, Dissertação de Mestrado. 179p.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. "Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2012". J. Nat. Prod., **75**: 311, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. "Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002". J. Nat. Prod., **66**:1002, 2003.

O'BRIEN, M. E.; WIGHLER, N.; INBAR, M.; ROSSO, R.; GRISCHKE, E.; SANTORO, A.; CATANE, R.; KIEBACK, D. G.; TOMCZAK, P.; ACKLAN, S. P.; ORLANDI, F.; MELLARS, L.; ALLAND, L. & TENDLER, C. "Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCL (caelyx/doxil) versus conventional doxorubicin for first line treatment of metastatic breast cancer". Ann.Oncol. **15**, 440, 2004.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C. & WALL, M. E. "Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia Sylvestris* Sw". J.Nat. Prod., **65**:95, 2002.

ORMROD, D. & SPENCER, C. M. "Topotecan: a review of its efficacy in small cell lung cancer". Drugs, **58**:533, 1999.

PADZUR, R.; KUDELKA, A. P.; KAVENAGH, J. J.; COHEN, P. R. & RABER, M. N. "The taxoids: Paclitaxel (Taxol) and Docetaxel (Taxotere)". Cancer Treat. Rev., **19**: 351, 1993.

PRESTON, R. J.; SEBASTIAN, J. R. S. & MACFEE, A. F. "The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents". Mutation Research, **189**: 50,1987.

QUINTANAR-GUERREIRO, D.; ALLEMAN, E.; FESSI, H. & DOELKER, E. "Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique". Drug Development and Industrial Pharmacy, **24**:1113, 1998.

RAI, J. S.; HENLEY, M.J. & RATAN, H. L. "Mammalian target of rapamycin: a new target in prostate cancer. Urol. Oncol. **28**:134, 2010.

REDDY, L.; ODHAV, B. & BHOOLA, K. D. "Natural products for cancer prevention: a global perspective". Pharmacol. Ther., **99**:1, 2003.

SANTOS, A. G. "Desenvolvimento de metodologia para análise de variabilidade intraespecífica e dinâmica de casearinas em *Casearia Sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae)". Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Instituto de química, 2001. Dissertação (mestrado em química), 120f.

SANTOS, A.G. "Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia Sylvestris* : contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico". Araraquara, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2008. Tese (doutorado em química), 174f.

Santos, K. C.; SILVA, M. F. G. F.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FERNANDES, J. B.; POLIKARPOV, I.; FORIM M. R. "Polymeric nanoparticles loaded with the 3,5,3'-

triiodothyroacetic acid (Triac), a thyroid hormone: factorial design, characterization, and release kinetics". *Nanotechnology, Science and Applications*. **5**:37, 2012.

SASSIOTO, M. C. P.; FILHO, N. C.; FACCO, G. G.; SODRÉ, S. T.; NEVES, N.; PURISCO, S. U & FARIAS, A. G. "Efeito de *Casearia Sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos". *Acta Cir. Bras.*, **19**:637, 2004.

SCHACTER, L. "Etoposide phosphate: what, where, and how?" *Semin. Oncol.*, **23**:1, 1996.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L. & GUTERRES, S. S. "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos". *Quim. Nova*, **25**:726, 2003.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. & RUDZISKI, W. E. "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices". *J.Control.Release.*, **70**:1, 2001.

SRIVASTAVA, V.; NEGI, A. S.; KUMAR, J. K.; GUPTA, M. & KHANUJA, S. P. S. "Plant-Based Anticancer Molecules: a Chemical and Biological Profile of Some Important Leads". *Bioorg. Med. Chem.*, **13**:5892, 2005.

STAKER, B. L.; HJERRILD, K.; FEESE, M. D.; BEHNKE, C. A.; BURGIN, A. B. & STEWART, L. "The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptotecina analog". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**:153872002.

TATAGIBA, F. "Guaçatonga (*Casearia Sylvestris*)" . disponível em: <http://www.biologo.com.br/plantas/cerrado/guacatonga.html>. Acesso em 31 jan.2013.

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R. & CAVALHEIRO, A. J. "Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia Sylvestris* Sw". *Rev. Bras. Plan. Med.*, **8**:132, 2006.

TIWARI, A.; KRISHNA, N. S.; NANDA, K.; CHUGH, A. "Benign prostatic hyperplasia: an insight into current investigational medical therapies". *Expert Opin. Investig. Drugs* **14**:1359, 2005.

TRAN, C.; OUK, S.; CLEGG, N.J.; WATSON, P.A.; ARORA, V.; WONGVIPAT, J.; SMITH-JONES, P.M.; YOO, D.; KWON, A.; WASIELEWASKA, T.; WELSBIE, D.; CHEN, C.D.; HIGANO, C.S.; BEER, T.M.; HUNG, D.T.; SCHER, H.I.; JUNG, M.E.; SAWYERS, C.L. "Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer". *Science* **324**:787, 2009.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T. & SIM, G. A. "Plant antitumor agents. I. the isolation and structure of campto-thecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*". *J. Am. Chem. Soc.*, **88**: 3888, 1966.

WANG, A. Z.; LANGER, R. S. & FAROKHZAD, O. C. "Nanoparticle delivery of cancer drugs". *Annu. Rev. Med.*, **63**:185, 2011.

WANG, A.Z. "Nanoparticle drug delivery: focusing on the therapeutic cargo". *Nanomedicine*, **7**:1463, 2012.

WATTERBERG, L. W. "Chemoprevention of cancer". *Cancer Res*, **45**:1, 1985.

WERNER, M. E.; FOOTE, M. B. & WANG, A. Z. "Chemoradiotherapy of human tumors: novel approaches from nanomedicine". *Curr. Pharm. Des.* **18**:440, 2012.

WHITSON, E. L., THOMAS, C. L., HENRICH, C. J., SAYERS, T. J., MCMAHON, J. B. & MCKEE, T. C., "Clrodane diterpenes from *Casearia arguta* that act as synergistic trail sensitizers." *J. Nat. Prod.*, **73**: 2013, 2010.

WU, L.; ZHANG, L & WATANABE, W. "Physical and chemical stability of drug nanoparticles". *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **63**:456, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. & PASSAGLLA, L. M. P. *Biologia Molecular Básica*. 3^a ed., Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003, p. 209

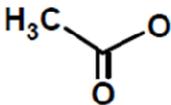
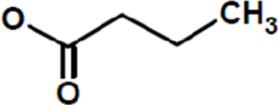
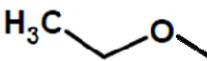
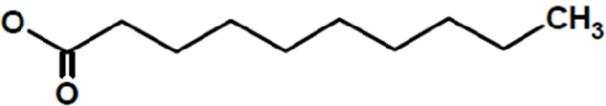
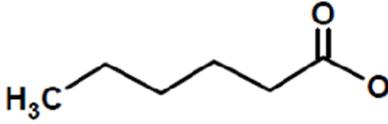
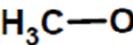
ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R. & DELIE, F. "Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer". *International Journal of Pharmaceutics*, 326:174, 2006.

ZHANG, L.; GU, F. X.; CHAN, J. M.; WANG, A. Z.; LANGER, R. S. & FAROKHZAD, O. C. "Nanoparticles in medicine. therapeutic applications and developments". *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**:761, 2008.

ANEXO

ANEXO I

As casearinas pertencem a uma classe de compostos conhecida como diterpenos clerodanos. O que diferencia as casearinas entre si são alguns grupos funcionais, descritos na tabela abaixo.

Radical	Estrutura
Acetato (OAc)	
Butanoato (OBu)	
Etoxila (OEt)	
Decanoato (ODc)	
Hexanoato (OHex)	
Metoxila (OMe)	
2-metilbutanoato (OMeBu)	