



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DÉBORA HELLEN ALMEIDA DE BRITO

**NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA COMO CARREADOR
DE ÁCIDO BETULÍNICO: UMA PROPOSTA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER**

FORTALEZA

2022

DÉBORA HELLEN ALMEIDA DE BRITO

NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA COMO CARREADOR DE
ÁCIDO BETULÍNICO: UMA PROPOSTA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B875n Brito, Débora Hellen Almeida de.
Nanoemulsões à base de óleo-resina de copaíba como carreador de ácido betulínico : uma proposta para tratamento de câncer / Débora Hellen Almeida de Brito. – 2022.
90 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

1. Nanoemulsão. 2. Óleo de copaíba. 3. Câncer. I. Título.

CDD 540

DÉBORA HELLEN ALMEIDA DE BRITO

NANOEMULSÕES À BASE DE ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA COMO CARREADOR DE
ÁCIDO BETULÍNICO: UMA PROPOSTA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: 17/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Nágila M^a P. S. Ricardo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. M^a Elenir Nobre Pinho Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Dávila Zampieri
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Antônia Flávia Justino Uchoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus.

Aos meus pais, Elizoneuda e Humberto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento, cuidado e permissão para concluir mais uma etapa da minha vida.

A meus pais, Elizoneuda e Humberto, pela dedicação, amor e apoio essenciais para minha caminhada até aqui. Agradeço a minha vida a eles e vou sempre me espelhar neles como ser humano.

Ao meu irmão Diego Henrique, por confortar meu coração com o sentimento de que eu sempre tenho alguém com quem contar, por todo amor e carinho e por ser meu exemplo de força.

Ao meu quase irmão Ítalo Matheus, por ser inspiração diária e por todo amor, carinho, atenção e cuidado.

A minha sobrinha Larissa Biona, minha pequena grande menina, que, com seu jeitinho torna minha vida e meus dias mais leves.

Ao meu marido, Mailson Medeiros, pelo carinho, apoio, paciência, cuidado e por acreditar em mim.

Ao Capitão Diniz, por ser suporte para toda a minha família. Obrigada por tudo o que és para todos nós!

A Prof^ª. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo, pela orientação desde sempre e para sempre e por confiar no meu trabalho. Obrigada por acreditar em mim e me permitir viver oportunidades únicas e essenciais para a minha formação como profissional e como ser humano. Sem seu apoio essa trajetória não teria sido tão magnífica.

Aos professores participantes da banca examinadora Maria Elenir, Dávila Zampiere, Flávia Justino e Hélcio Santos pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A família LabPIM, pela amizade e companheirismo desde 2009.

As minhas amiguinhas Denise Ramos, Kamilla Barreto, Lillian Maria, Deyse Maia, Ethanielda Coelho. Obrigada por vocês existirem na minha vida! Sem vocês, com certeza, eu não teria conseguido chegar até aqui!

Aos meus amigos Gabriel Érik, Alexandre Carreira e Alessandro Marinho, por cada contribuição valiosa para o meu trabalho!

As minhas amigas e companheiras Ana Paula e Nádía Aline que são respostas do cuidado de Deus na minha vida!

Ao Professor Edilberto, por todos os ensinamentos de Química e da vida, por cada cafezinho e por ser um grande professor e amigo.

RESUMO

Estratégias de carreadores de fármacos ou agentes farmacologicamente ativos têm sido amplamente estudadas nos últimos anos. Nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) são atraentes sistemas de *drug delivery* de ativos hidrofóbicos. O óleo de copaíba, óleo-resina constituído de terpenos, é usado na medicina tradicional como agente anti-inflamatório e é um forte candidato para compor a fase dispersa de nanoemulsões O/A. Como o câncer foi considerado, em 2018, a segunda principal causa de morte no mundo, o interesse em otimizar a eficiência e a liberação de um ativo hidrofóbico anticâncer, como o ácido betulínico, foi despertado visando diminuir impactos causados pelos tratamentos convencionais. O presente trabalho tem como objetivo preparar nanoemulsões do tipo O/A contendo óleo de copaíba e ácido betulínico estabilizadas com Pluronic[®] F127 e realizar a caracterização quanto a forma e estabilidade e seu potencial citotóxico em células cancerígenas. As nanoemulsões apresentaram valores de tamanho de partícula entre 284,4 nm e 308,8 nm, distribuição de tamanho unimodal (valores de PDI entre 0,023 e 0,119) e potencial zeta entre -21,8 e -27,1 mV. Todas as emulsões se mostraram estáveis em até 360 dias. Todas as nanoemulsões com ácido betulínico foram capazes de solubilizar o ativo (12 a 14 mg mL⁻¹). A presença de ácido betulínico nas nanoemulsões preservou a forma da nanogota nas imagens de MET, mas não influenciou de forma expressiva na atividade citotóxica frente a linhagens celulares de alguns tipos de câncer (próstata, carcinoma de pulmão, leucemia, colorretal e sistema nervoso). O óleo de copaíba nanoemulsionado, principalmente o óleo de copaíba com composição majoritária de ácido poliáltico e β -bisaboleno, se mostrou eficiente e seletivo frente a linhagem de células de leucemia (HL-60).

Palavras-chave: nanoemulsão; óleo de copaíba; câncer.

ABSTRACT

Drug carrier strategies or pharmacologically active agents have been widely studied in recent years. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions are attractive drug delivery systems for hydrophobic actives. Copaiba oil, an oil-resin made up of terpenes, is used in traditional medicine as an anti-inflammatory agent and is a strong candidate to compose the dispersed phase of O/W nanoemulsions. As cancer was considered, in 2018, the second leading cause of death in the world, the interest in optimizing the efficiency and release of a hydrophobic anticancer active, such as betulinic acid, was awakened in order to reduce impacts caused by conventional treatments. The present work aims to prepare O/W nanoemulsions containing copaiba oil and betulinic acid stabilized with Pluronic® F127 and perform the characterization regarding shape and stability and its cytotoxic potential in cancer cells. The nanoemulsions showed particle size values between 284.4 nm and 308.8 nm, unimodal size distribution (PDI values between 0.023 and 0.119) and zeta potential between -21.8 and -27.1 mV. All emulsions were stable for up to 360 days. All nanoemulsions with betulinic acid were able to solubilize the active (12 to 14 mg mL⁻¹). The presence of betulinic acid in the nanoemulsions preserved the shape of the nanodrop in the TEM images, but did not significantly influence the cytotoxic activity against cell lines of some types of cancer (prostate, lung carcinoma, leukemia, colorectal and nervous system). Nanoemulsified copaiba oil, especially copaiba oil with a majority composition of polyaltic acid and β -bisabolene, proved to be efficient and selective against the leukemia cell lineage (HL-60).

Keywords: nanoemulsion; copaiba oil; cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração de nanocarreadores usados como sistemas de drug delivery: (A) nanopartículas magnéticas (B) lipossomas (C) micelas poliméricas (D) dendrímeros (E) emulsões (F) nanopartículas lipídicas sólidas (G) nanocarreadores inorgânicos, incluindo: (i) nanopartículas de metal e óxido de metal, (ii) nanotubos de carbono, (iii) pontos quânticos (quantum dots), (iv) nanopartículas magnéticas, (v) nanopartículas core-shell.....	18
Figura 2 – Representação esquemática de sistemas de emulsão O/A (a) e A/O (b).....	19
Figura 3 – Representação esquemática de processos de desestabilização de emulsão.....	20
Figura 4 – a) Estrutura química dos Pluronic [®] e b) “Grade” de Pluronic [®]	24
Figura 5 – Esquema de formação da emulsão.....	25
Figura 6 – Visão geral de métodos de alta e baixa energia para preparação de nanoemulsões O/A.....	27
Figura 7 – Esquema ilustrando o processo de formação das nanogotículas por irradiação ultrassônica.....	28
Figura 8 – Imagem genérica da Copaibeira e estruturas de terpenos encontrados em óleo de copaíba.....	30
Figura 9 – Estrutura química do ácido betulínico.....	31
Figura 10 – Ilustração do processo de emulsificação.....	38
Figura 11 – Curvas de TGA (a) e DTG (b) dos óleos de copaíba.....	48
Figura 12 – Espectro de RMN ¹ H da fração “não-volátil” do óleo 1.....	52
Figura 13 – Espectro de RMN ¹³ C da fração “não-volátil” do óleo 1.....	53
Figura 14 – Espectro de RMN ¹ H da fração “não-volátil” do óleo 2.....	54
Figura 15 – Espectro de RMN ¹³ C da fração “não-volátil” do óleo 2.....	55
Figura 16 – Espectro de RMN ¹ H da fração “não-volátil” do óleo 3.....	56
Figura 17 – Espectro de RMN ¹³ C da fração “não-volátil” do óleo 3.....	57
Figura 18 – Principais sesquiterpenos presentes nos óleos de copaíba O1, O2 e O3.....	58
Figura 19 – Imagem das nanoemulsões preparadas com 10% de FO.....	64
Figura 20 – Gráficos de distribuição de tamanho das nanoemulsões E1 para os três óleos com 10% de fase orgânica e ácido betulínico nos intervalos 1, 30, 60, 90, 180 e 360 dias.....	65

Figura 21 – Cromatogramas das emulsões com e sem ácido betulínico para O1(a), O2 (b) e O3(c) com (-) e sem (-) ácido betulínico.....	67
Figura 22 – Representação gráfica da curva de calibração analítica para o ácido betulínico.....	68
Figura 23 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanoemulsões sem a) O1E1; b) O2E1 c) O3E1 e com ácido betulínico (a) O1E1 AB; b) O2E1 AB c) O3E1 AB.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Visão geral dos 3 principais tipos de emulsão.....	22
Tabela 2 - Concentração (%/g) dos surfactantes hidrofílico e lipofílico utilizados na obtenção do BHL dos óleos de copaíba.....	37
Tabela 3 - Composição das nanoemulsões preparadas.....	39
Tabela 4 - Descrição e identificação das amostras.....	45
Tabela 5 - Composição (%) de “voláteis” e “não-voláteis” de cada óleo de copaíba baseado nas massas obtidas por hidrodestilação e TGA.....	46
Tabela 6 - Valores obtidos da TGA e DTG para os óleos de copaíba estudados.....	47
Tabela 7 - Porcentagem de terpenos na fração volátil dos óleos de copaíba.....	59
Tabela 8 - Valores de tamanho de partícula (nm) das formulações do estudo de BHL do O1, O2 e O3.....	60
Tabela 9 - Valores de PDI das formulações do estudo de BHL do O1, O2 e O3.....	61
Tabela 10- Potencial zeta (mV) das nanoemulsões.....	62
Tabela 11- Valores obtidos de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta para as formulações E1 e E2 com e sem ácido betulínico.....	63
Tabela 12- Valores obtidos de tamanho de partícula, PDI e potencial zeta para as formulações E1 com 10% de FO e ácido betulínico, e ensaio da estabilidade durante 360 dias.....	66
Tabela 13- Atividade citotóxica in vitro das amostras frente as linhagens de células tumorais e não tumoral.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
INCA	Instituto Nacional de Câncer
O/A	Óleo em água
COVID-19	Coronavirus 2019
OE	Óxido de etileno
OP	Óxido de propileno
L	<i>Liquid</i>
P	<i>Paste</i>
F	<i>Flake</i>
F127	Pluronic® F127
FDA	Food and Drug Administration
<i>Cmc</i>	Concentração micelar crítica
<i>Cmt</i>	Temperatura micelar crítica
MDR	Tumores multirresistentes a drogas
AB	Ácido betulínico
O1	Óleo do Crato
O2	Óleo do Exu
O3	Óleo do Marabá
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TGA	Análise Termogravimétrica
FA	Fase aquosa
FO	Fase orgânica
PDI	Índice de polidispersividade

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
ΔG	Energia livre de Gibbs
$\Delta A\gamma$	Energia de superfície
$T\Delta S$	Entropia de dispersão
γ	Tensão interfacial
p	Pressão de Laplace
ζ	Potencial zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	Câncer.....	16
2.2	Nanossistemas de <i>drug delivery</i>	17
2.3	Emulsões.....	19
2.4	Tipos de emulsão.....	21
2.5	Emulsificantes.....	22
2.6	Pluronic® F127.....	23
2.7	Formação da macroemulsão e nanoemulsão.....	25
2.8	Nanoemulsões.....	26
2.9	Formação de nanoemulsão.....	27
2.9.1	<i>Irradiação ultrassônica</i>	28
2.10	Óleo de Copaíba.....	29
2.11	Ácido Betulínico.....	31
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	OBJETIVOS.....	34
4.1	Objetivo geral.....	34
4.2	Objetivos específicos.....	34
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1	Materiais.....	35
5.2	Métodos.....	35
5.2.1	<i>Caracterização dos óleos de copaíba</i>	35
5.2.2	<i>Separação das frações “volátil” e “não-volátil” dos óleos de copaíba</i>	35
5.2.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	36
5.2.4	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN 1H e 13C)</i>	36
5.2.5	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)</i>	36
5.2.6	<i>Determinação do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) dos óleos de copaíba</i>	37
5.2.7	<i>Preparação das nanoemulsões</i>	39
5.2.8	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz</i>	40
5.2.9	<i>Validação do método de quantificação do ácido betulínico nas nanoemulsões</i>	40
5.2.9.1	<i>Preparo das soluções</i>	40

5.2.9.2	<i>Condições cromatográficas</i>	41
5.2.9.3	<i>Determinação dos parâmetros para validação do método</i>	41
5.2.9.4	<i>Seletividade</i>	41
5.2.9.5	<i>Linearidade</i>	42
5.2.9.6	<i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)</i>	42
5.2.9.7	<i>Recuperação</i>	43
5.2.9.8	<i>Precisão</i>	43
5.2.10	<i>Avaliação da morfologia das nanoemulsões por Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	43
5.2.11	<i>Avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões pelo método de MTT</i>	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1	Caracterização do óleo de copaíba	46
6.1.1	<i>Separação das frações “voláteis” e “não-voláteis”</i>	46
6.1.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	47
6.1.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ¹H e ¹³C)</i>	49
6.1.4	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)</i>	58
6.2	BHL dos óleos de copaíba	59
6.3	Estabilidade das nanoemulsões	63
6.4	Validação do método de quantificação do ácido betulínico	67
6.5	Quantificação do ácido betulínico	69
6.6	Avaliação da morfologia das nanoemulsões por MET	70
6.7	Avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões pelo método de MTT	71
7	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A – ESTRUTURA QUÍMICA DO GRINSTED® PGPR	91
	APÊNDICE B - ESTRUTURA QUÍMICA DO PLURONIC® F127	92
	APÊNDICE C - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO (RMN ¹³C) DO ÁCIDO BETULÍNICO, SUA RESPECTIVA ESTRUTURA QUÍMICA E COMPARAÇÃO DE δ COM REFERÊNCIA	93
	ANEXO A – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA RECUPERAÇÃO	94
	ANEXO B – PRECISÃO ESPERADA (REPETIBILIDADE) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ANALITO	95