

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO**  
**EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**Utilização de Poli(glicerol) Dendrítico como transportador  
de Cianocobalamina Borilada para utilização na BNCT**

**Leticia Silvério Real**

Itajubá, dezembro de 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO**  
**EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**Letícia Silvério Real**

**Utilização de Poli(glicerol) Dendrítico como transportador  
de Cianocobalamina Borilada para utilização na BNCT**

Dissertação submetida ao Programa de Pós –  
Graduação em Materiais para Engenharia como  
parte dos requisitos para obtenção do Título de  
Mestre Ciências em Materiais para Engenharia

Área de Concentração: Não metais

Orientador: Prof. Dr. Alvaro A. Alencar de  
Queiroz

Dezembro de 2017

Itajubá

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO**  
**EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Letícia Silvério Real

**Utilização de Poli(glicerol) Dendrítico como transportador  
de Cianocobalamina Borilada para utilização na BNCT**

Dissertação aprovada por banca examinadora em 14 de dezembro de 2017, conferindo ao autor o título de *Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia*

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Alvaro A. Alencar de Queiroz (Orientador)

Prof. Dr. Henrique Antonio Mendonça Faria

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Elena Leyva Gonzalez

Itajubá, 2017

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por guiar meus passos e me permitir ir além. Aos meus pais e irmãos por todo apoio sempre. Ao Prof. Dr. Alvaro A. Alencar Queiroz por ter me acolhido como sua aluna orientada, por seus ensinamentos e conselhos (“pensamento positivo sempre”). Aos colegas e amigos do LAT – EFEI pela boa convivência diária, vocês fizeram meus dias melhores. Agradeço a Priscila Veloso, Thiago Arantes e Alexandro Nunes por dedicarem algumas horas de suas vidas para ajudarem na construção desse trabalho. Agradeço também ao Sr. Paulo Roberto Alves/ Shimadzu Latin America. Ao pessoal do Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química UNIFEI e a outros colaboradores da Universidade Federal de Itajubá por terem contribuído de alguma forma na construção desse trabalho. Aos dois anos de puro aprendizado em Itajubá, certamente ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

## O RIO E O OCEANO

Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece.

Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem! Avance firme e torne-se Oceano!

Osho

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipos histológicos mais frequentes de câncer que ocorrem no SNC.....	14
Tabela 2 bandas presentes nos dendrímeros PGLD <sub>G4</sub> .....	60
Tabela 3 Bandas PLGD <sub>G4</sub> oxidado.....	61
Tabela 4 bandas de absorção para a CbI.....	62
Tabela 5 bandas de absorção do BFA.....	63
Tabela 6 bandas de absorção do conjugado PGLD-CbI-BFA.....	64
Tabela 7 Comparação bandas de absorção do espectro do conjugado com os espectros de PGLD, CbI e BFA.....	68
Tabela 8 Valores de T <sub>m</sub> para PGLD, CbI, BFA e conjugado nas razões de aquecimento 10, 20 e 30°C min <sup>-1</sup> .....	74
Tabela 9 Valores calculados de E <sub>a</sub> aparente para o PGLD, CbI, BFA e conjugado. ...	74

## ÍNDICE DE ABREVIACÕES

ALA – Ácido aminolevulínico

BNTC – Boron Neutron Capture Therapy

BFA – Borofenilalanina

CbI – Cianocobalamina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DTG – Derivada Termogravimétrica

E – Energia de ativação

FI – Fator intrínseco

FTIR – Fourier – Transform Infrared Spectroscopy

GBM – Glioblastoma Multiforme

IV – Infravermelho

PGLD – Poli(glicerol) dendrítico

SCN – Sistema Nervoso Central

TC II – Transcobalamina II

TGA – Termogravimetric Analysis

UV - Ultravioleta

Vis - Visível

## Sumário

CAPÍTULO 1.....	12
Introdução e Referencial Teórico .....	12
1. 1 Câncer .....	13
1.1.1 Câncer SNC.....	14
1.1.2 Gliomas .....	14
1.1.3 Tratamentos para gliomas .....	16
1.2 BNCT .....	17
1.2.1 Interação nêutron – boro.....	17
1.2.2 Compostos utilizados na BNCT.....	19
1.3 Vitamina B12.....	22
1.3.1 Estrutura Vitamina B12.....	23
1.3.2 Propriedades Físico-Químicas da Vitamina B12.....	24
1.3.3 Aspectos da síntese orgânica total e biossíntese da cianocobalamina .....	24
1.3.4 Transportadores de Vitamina B12.....	27
1.3.5 Vitamina B12 em tumores .....	28
1.4 Polímeros Dendríticos .....	29
1.4.1 Sistemas de liberação .....	30
1.4.2 Poliglicerol dendrítico (PGLD) .....	31
Referências Capítulo 1.....	33
CAPÍTULO 2.....	36
Objetivos deste trabalho .....	36
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos .....	37
CAPÍTULO 3.....	38
Materiais e métodos .....	38
3.1 Síntese e caracterização do conjugado Cbl-BFA .....	39
3.2 Espectrometria de massa.....	42
3.3 Liofilização .....	42
3.4 Espectroscopia na região com Transformada de Fourier (FTIR) .....	43
3.5 Espectroscopia na região UV-Vis.....	44
3.6 Análise Termogravimétrica.....	45



3.7 CLAE.....	45
3.8 Estudo da liberação de Cbl-BFA do conjugado Cbl-BFA/PGLDG <sub>4</sub> .....	47
3.9 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado .....	47
CAPÍTULO 4.....	48
Fundamentação teórica dos métodos .....	48
4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR) .....	49
4.2 Espectroscopia na região do UV-Vis.....	50
4.3 Termogravimetria.....	52
4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	55
4.5 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICPOES).....	55
Referências Capítulo 4.....	57
CAPÍTULO 5.....	58
Resultados e discussão.....	58
5.1 Espectrometria de massa .....	59
5.2 Espectros FTIR .....	59
5.3 Espectroscopia eletrônica UV-Vis .....	65
5.3.1 UV-Vis PGLD <sub>G4</sub> .....	65
5.3.2 UV-Vis Cbl.....	66
5.3.3 UV-Vis BFA.....	67
5.3.4 UV-Vis Conjugado Cbl-BFA/PGLDG <sub>4</sub> .....	67
5.4 Análise Termogravimétrica (TGA) .....	70
5.4.1 TGA PGLD <sub>G4</sub> .....	70
5.4.2 Cianocobalamina .....	71
5.4.3 Borofenilalanina .....	72
5.4.4 Conjugado Cbl-BFA/PGLD <sub>G4</sub> .....	73
5.4.5 Energia de ativação .....	74
5.5 CLAE.....	75
5.6 Liberação do Conjugado .....	76
Referências Capítulo 5 .....	79
Capítulo 6 .....	80
Conclusões e perspectivas futuras.....	80

## Resumo

### Utilização de Poli(glicerol) Dendrítico como transportador de Cianocobalamina Borilada para utilização na BNCT

Letícia Silvério Real

Orientador: Dr. Alvaro Antonio Alencar Queiroz

O presente trabalho descreve a síntese e caracterização do conjugado de poli(glicerol) com vitamina B<sub>12</sub> borilada (CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>). O conjugado foi concebido com vistas a sua utilização na Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT), uma técnica de radioterapia empregada principalmente em tumores cerebrais como o glioblastoma multiforme (GBM). A BNCT consiste na administração pelo paciente de um composto que contenha <sup>10</sup>B em sua composição seguido de aplicação de um feixe de nêutrons térmicos na área tumoral. O sucesso da técnica depende da deposição do elemento <sup>10</sup>B nas células tumorais que deve se acumular em quantidades maiores nessas células do que nas saudáveis. A borofenilalanina (BFA) é um dos compostos mais estudados e utilizados na BNCT, por ser absorvido seletivamente por células de alguns tumores e não ser tóxico ao organismo. Vários estudos vêm tentando melhorar as propriedades de entrega de boro de compostos já utilizados na técnica. Neste trabalho a vitamina B<sub>12</sub> é usada como agente direcionador do BFA para células tumorais, pois vários estudos mostram que células tumorais possuem um grande requerimento de absorção de vitamina B<sub>12</sub> para sua rápida multiplicação, visto que ela é importante para processos metabólicos básicos. Unidos aos dois compostos, BFA e vitamina B<sub>12</sub>, está o PGLD um poli(glicerol) dendrítico que irá funcionar como um sistema de liberação do agente de entrega de boro no organismo.

**Palavras – Chave:** Poli(glicerol), Cianocobalamina, Borofenilalanina, BNCT.

## ABSTRACT

### Use of Dendritic Poly (glycerol) as a Borated Cyanocobalamine Carrier for use in BNCT

Letícia Silvério Real

Orientadora: Dr. Alvaro Antonio Alencar Querioz

The present work describes the synthesis and characterization of the poly (glycerol) and bore B<sub>12</sub> vitamin (CbI-BPA/PGLD<sub>G4</sub>) conjugated. Such conjugated was conceived with focus on its utilization in the Boron Neutron Capture Therapy (BNCT), a radiotherapy technique applied mostly in brain tumors as the multiform glioblastoma. The BNCT consists in the administration, by the patient, of a compound that contains <sup>10</sup>B in its composition followed by the application of a thermal neutron beam at the tumor. The techniques success depends on the deposition of <sup>10</sup>B on the tumor cells, so that it deposits more on these cells than on the healthy ones. The boronphenylalanine (BPA) is one of the most studied compounds on the BNCT, because of its selective absorbability by some tumor cells and the fact that it is not toxic to the organism. Several studies have been trying to improve the boron delivery properties of compounds already used in this technique. In this work, B<sub>12</sub> vitamin is used as a BPA delivery agent for tumor cells, since several studies show that the tumor cells have a large B<sub>12</sub> absorption requirement for its quick multiplication, since it's important for the basic metabolic processes. Connected with both compounds, BPA and B<sub>12</sub> vitamin, the dendritic poly(glycerol) that will work as a boron's delivery agent liberation system.

**Keywords:** Poly(glycerol), Cyanocobalamin, Boron phenylalanine, BNCT

# **CAPÍTULO 1**

## **Introdução e Referencial Teórico**

# **1**

### **1.1 CÂNCER**

### **1.2 BNCT**

### **1.3 VITAMINA B<sub>12</sub>**

### **1.4 POLÍMEROS DENDRÍTICOS**

## 1. 1 Câncer

Pode-se definir o câncer como um conjunto de mais de 100 doenças na qual células crescem desordenadamente, agressivamente e incontrolavelmente invadindo tecidos e órgãos, podendo espalhar – se (metástase) para outras regiões do corpo. O acúmulo dessas células formam os tumores (massa de células cancerosas). Existem diversos tipos de câncer que dependem do tipo de célula, como por exemplo, células epiteliais, células do tecido ósseo, entre outros tipos. O câncer também pode ser diferido em relação à velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir outros órgão e tecidos vizinhos ou distantes (INCA).

O câncer é uma das doenças que mais mata no mundo, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a cada ano 8,2 milhões de pessoas morrem de câncer, a maioria em países de baixa e média renda devido à falta de equipamentos, tecnologia para diagnósticos precoces e tratamentos adequados. Em países com alto acesso a serviços de saúde, muitos casos de câncer são diagnosticados já em estágio avançado, quando já se torna difícil tratar a doença.

Segundo a International Agency for Research on Cancer (Iarc) da OMS, é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, espera – se que 80% dos 20 milhões de novos casos até 2025 sejam nesses países.

No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 é de 600 mil novos casos por ano (INCA,2015). Para homens foram estimados que os tipos de câncer mais freqüente para o biênio serão o de próstata (61,200 novos casos/ano), cólon reto (17,330 novos casos/ano), estômago (12,920 novos casos/ano) e cavidade oral (11,140 novos casos/ano). Para as mulheres, as maiores incidências serão de cânceres de mama (57,960 novos casos/ano), cólon reto (17,620 novos casos/ano), colo do útero (16,340 novos casos/ano), pulmão (10,160 novos casos/ano) e estômago (7,600 novos casos/ano).

Apesar de não se encontrar entre os tipos de câncer mais incidentes no ano de 2016, o câncer do sistema nervoso central foi estimado em 5.440 casos em homens e 4.330 em mulheres para o mesmo ano pelo INCA. Certos tipos de tumores cerebrais, como o glioblastoma multiforme (GBM), são extremamente agressivos e os portadores do tumor possuem um tempo de sobrevida baixo, pois o tumor é de difícil tratamento. Muitas vezes a área em que se aloja é inoperável e em outras os tratamentos de radioterapia e quimioterapia não respondem com eficácia.

### 1.1.1 Câncer SNC

O câncer do sistema nervoso central (SNC) é o 14º tipo de câncer mais frequente em homens atingindo em torno de 3,9 a cada 100 mil homens e o 15º entre as mulheres atingindo cerca de 3,0 a cada 100 mil mulheres, apesar de ser relativamente raro contribui significativamente para a mortalidade correspondendo a cerca de 2% de todos os tumores malignos no mundo. Vale ressaltar que a incidência é maior quanto maior o nível socioeconômico, esse fenômeno deve-se à melhora ao acesso às tecnologias diagnósticas e consequente descoberta da doença.

No Brasil, o número de novos casos de câncer do SNC estimado no biênio 2016-2017 é de 5.440 casos em homens e 4.330 em mulheres (INCA, 2017).

A Tabela 1 apresenta os tipos histológicos de câncer do SNC que ocorrem com maior frequência:

Tabela 1 Tipos histológicos mais frequentes de câncer que ocorrem no SNC

<b>Tipo</b>	<b>Frequência</b>
Glioma	40% a 60%
Meningioma	20% a 35%
Neurilemomas	5% a 10%

Podendo ainda serem citados alguns outros tipos histológicos existentes, porém mais raros como: adenomas pituitários, meduloblastomas, tumores de medula espinhal e nervos periféricos.

### 1.1.2 Gliomas

Entre os tumores que começam no cérebro os gliomas são os mais comuns e perfazem cerca de 33% de todos os tumores cerebrais.

Glioma é um crescimento de células cancerosas ou tumor composto de células derivadas de tecido neuroglial, o material que suporta e protege as células nervosas. Os gliomas tipicamente se formam no cérebro ou na medula espinhal e são classificados pelo tipo de célula e localização (Encyclopædia Britannica).

Existem diferentes graus de gliomas, indicando seu potencial de crescimento e agressividade. Entre os tipos de gliomas estão os astrocitomas que são tumores de células gliais desenvolvidos a partir de células do tecido conjuntivo chamadas astrócitos e é o tumor cerebral intra-axial primário mais comum, representando quase metade de todos os tumores cerebrais primários. São frequentemente encontrados no cérebro, mas também no cerebelo (localizado na base do cérebro). Podem se desenvolver em adultos ou crianças. Astrocitomas policíticos são gliomas de cerebelo de baixo grau comumente encontrados em crianças. Existem também os astrocitomas de alto grau, denominado glioblastoma multiforme (GBM), é o tipo de tumor mais maligno de todos os de cérebro (Encyclopædia Britannica).

O GBM (Figura 1) é o tipo mais agressivo, o tempo de sobrevivência para pacientes com glioblastoma multiforme que não são submetidos a nenhum tipo de tratamento é de 3 meses. Em pacientes com tratamento adequado (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) a média de sobrevivência é de 1 a 2 anos.

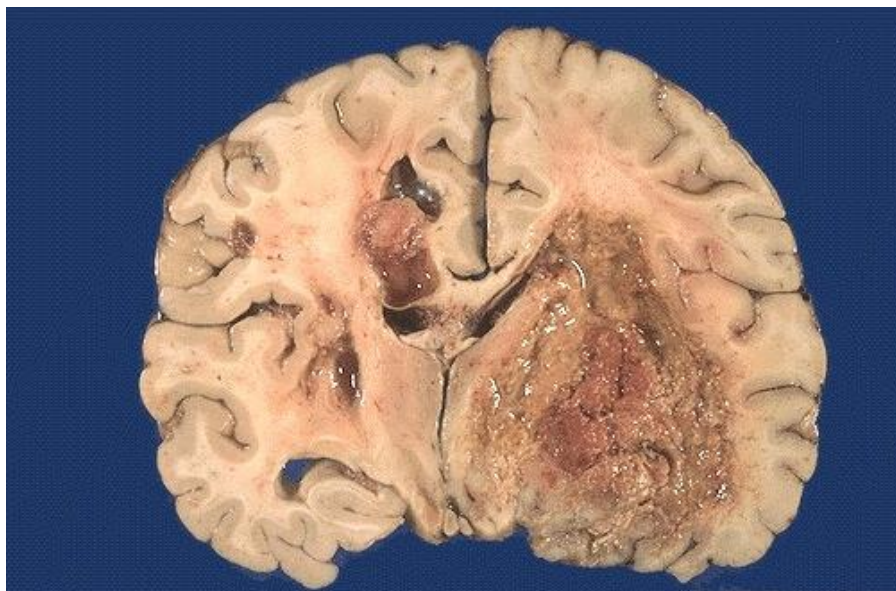


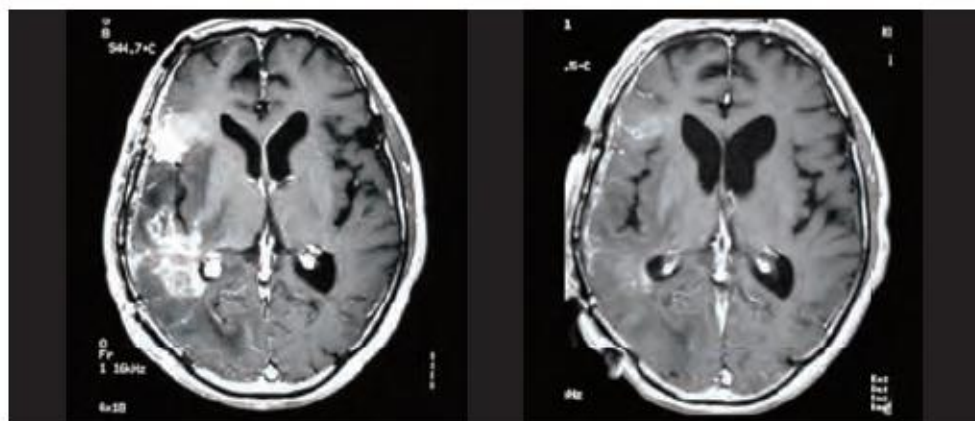
Figura 1 – A figura mostra o GBM, pior forma possível de glioma. Fonte: <https://library.med.utah.edu/>

### 1.1.3 Tratamentos para gliomas

Os tipos de tratamentos para o câncer cerebral variam de acordo com o tipo e localização do tumor, podem ser utilizados separadamente ou em conjunto. Entre os tratamentos mais utilizados estão a cirurgia de retirada do tumor, dependente da sua localização no cérebro; radioterapia que utiliza radiação ionizante para destruir ou inibir o crescimento das células anormais que formam o tumor, que pode ser utilizada após cirurgia para destruir as células cancerígenas remanescentes ou como tratamento principal; A quimioterapia que utiliza medicamentos anticancerígenos para destruir as células tumorais, porém por ser um tratamento sistêmico atingem além das células tumorais também as células sadias do organismo.

Em muitos casos quando não há destruição de 99,99% das células cancerosas a probabilidade do tumor retornar é muito grande (DALLE, 1999). Diante da ineficiência dos tratamentos convencionais para alguns tipos de tumores por vários motivos como: o tumor não responde à radiação convencional (raios X), está localizado em regiões anatômicas complicadas e/ou inoperáveis ou não responde a um tratamento químico por reproduzir – se rapidamente, surge uma terapia alternativa, chamada Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT – Boron Neutron Capture Therapy), capaz de atingir apenas células cancerosas, poupando as células sadias.

Existem altas expectativas em relação à pesquisa em BNCT para o tratamento de tumores cerebrais malignos, particularmente o glioblastoma multiforme. Uma vez que a BNCT permite que uma grande dose de radiação seja administrada de uma só vez, são nesses casos que o tumor reage (como evidenciado pela degeneração e desaparecimento das lesões na ressonância magnética) muito mais rapidamente (cerca de dois dias) ao da radioterapia (ONO, 2016).





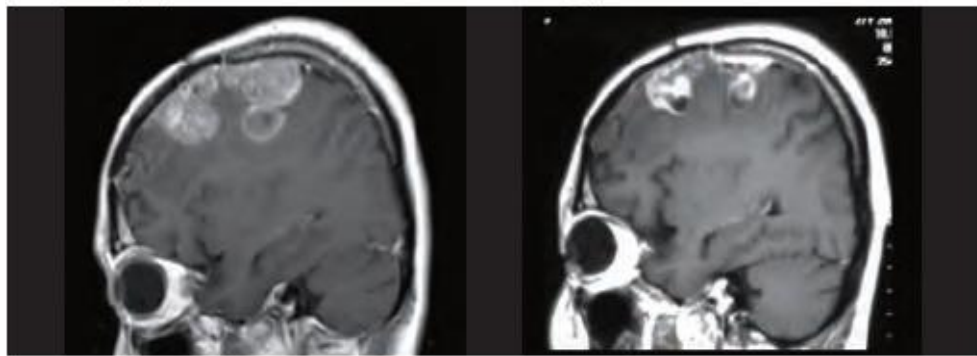


Figura 2 – A ressonância mostra a diminuição do tumor (foto lado direito) após a BNCT. Fonte: Osaka Medical College

## 1.2 BNCT

A Terapia de captura de Nêutrons pelo Boro foi sugerida como tratamento oncológico pela primeira vez pelo físico americano Gordon L. Locher em 1936, e desde então vem sendo objeto de crescente interesse (LOCHER, 1936).

A BNCT é uma forma de tratamento por radiação para diversos tipos de tumores, baseia-se na administração intravenosa ou oral ao paciente de um composto contendo o isótopo 10 do Boro ( $^{10}\text{B}$ ) em sua fórmula.

O boro é um elemento químico de número atômico 5 e existe na forma de dois isótopos com números de massa de 10 ( $^{10}\text{B}$ ) e 11 ( $^{11}\text{B}$ ) em uma proporção de 1:4, porém apenas o  $^{10}\text{B}$  é capaz de absorver (capturar) nêutrons térmicos, além de formar compostos não radioativos e quimicamente inofensivos ao organismo.

O sucesso da técnica depende da deposição do elemento nas células tumorais seguida pela irradiação com nêutrons de baixa energia. Sabe-se que alguns compostos contendo boro têm propriedade de se acumular em quantidades muito maiores nas células cancerosas do que nas células normais causando altas concentrações de boro nos tumores e baixa concentração nos demais tecidos saudáveis. Após a administração do composto de boro no paciente este é então colocado em frente a um feixe de nêutrons provenientes de um reator nuclear. O boro possui uma alta seção de choque para absorção de nêutrons, mil vezes maior em relação aos elementos que compõem o tecido corporal, hidrogênio 1H, carbono 12C e oxigênio 16 $^{\circ}$  (TIJERO, *et. al.*, 2010).

### 1.2.1 Interação nêutron – boro

O nêutron é uma partícula neutra, ou seja, possui carga elétrica nula. Sabe-se que o mesmo é estável quando ligado a um núcleo. Por não possuir carga elétrica, tal partícula não

interage eletromagneticamente com a matéria, mas por meio de interações de espalhamento ou reações nucleares, nas reações nucleares as interações podem ocorrer via fissão nuclear ou via captura neutrônica. Na terapia de captura de nêutrons pelo boro, como o próprio no diz, a interação que ocorre é a de captura neutrônica, onde um nêutron de baixa energia forma um estado ligado instável com um átomo essa energia é liberada no processo podendo ainda ser produzida uma partícula pesada (TIJERO, *et. al*, 2010).

Na BNCT são utilizados nêutrons epitermais que possuem uma energia de cerca de 0,5 eV a 40 keV que quando irradiados são capturados pelo  $^{10}\text{B}$ , tornando-o um isótopo instável, radioativo, que decai por fissão nuclear para  $^7\text{Li}$  e partículas alfa ( $^4\text{He}$ ), seguindo a relação  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ . A Figura 3 apresenta um esquema da interação entre nêutron e o  $^{10}\text{B}$  (CAMPOS, 2000).

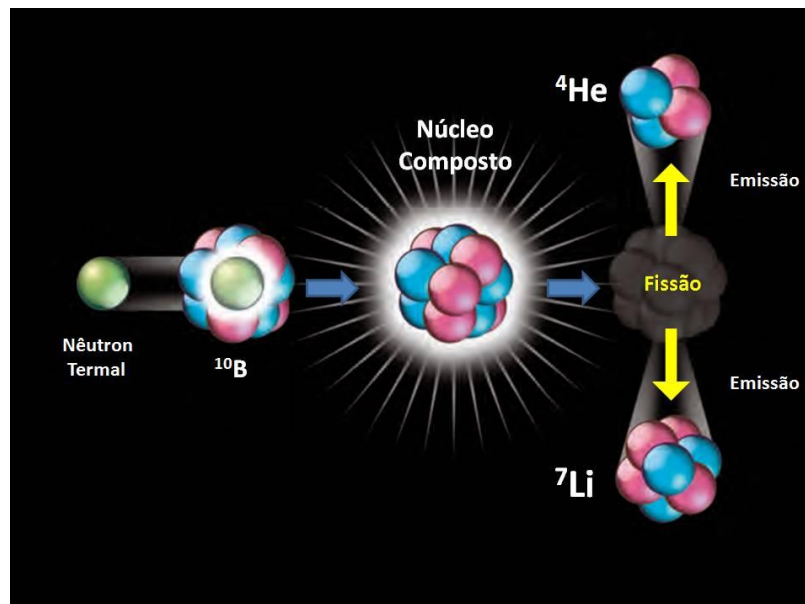


Figura 3 – Átomos de  $^{10}\text{B}$  ao se encontrarem com os nêutrons térmicos formam um núcleo composto que por fissão formam átomos de  $^4\text{He}$  e  $^7\text{Li}$  e são emitidos em direções opostas. A distância total percorrida por ambos é de  $14\ \mu\text{m}$ , que corresponde aproximadamente ao tamanho de uma célula. Fonte: ONO, 2016.

As partículas geradas como resultado da captação de nêutrons pelo boro,  $^{10}\text{Li}$  e  $^4\text{He}$ , fornecem alta energia ao longo de seu curto percurso, aproximadamente o diâmetro de uma célula ( $10\ \mu\text{m}$ ). Assim, apenas as células neoplásicas que contenham  $^{10}\text{B}$  são mortas após a irradiação de nêutrons térmicos (Figura 4).

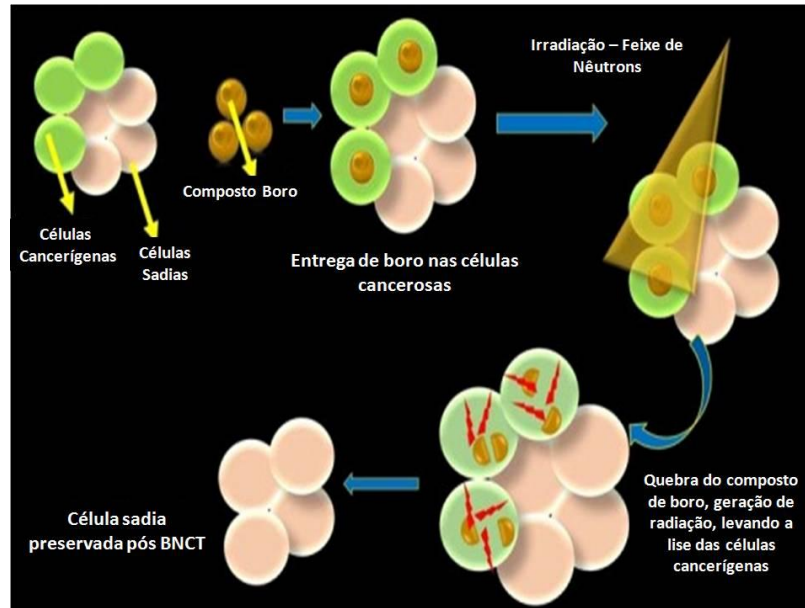


Figura 4 – O esquema mostra o composto de boro sendo absorvido pelas células e irradiado por um feixe de nêutrons resultando na morte das células que continham boro poupando as células saudáveis. Fonte: KAVITAA, 2016.

### 1.2.2 Compostos utilizados na BNCT

Para que a técnica seja eficaz os compostos de boro utilizados na BNCT devem exibir algumas propriedades principais (ONO, 2016):

1. Devem-se acumular seletivamente nas células tumorais (a proporção em células tumorais para concentração em células normais [T/N] deve ser maior ou igual a 3) e estar presente em grandes quantidades (a uma concentração de  $^{10}\text{B}$  de 20 a 40 ppm) ou pelo menos 20  $\mu\text{g}$  de  $^{10}\text{B}$  para cada grama de massa tumoral (BARTH *et al.*, 2005).
2. Não devem possuir nenhum efeito farmacêutico e devem funcionar apenas como um agente de entrega de boro.
3. Não devem ser metabolizados, mas devem permanecer em tecido tumoral por um certo período de tempo.
4. Devem apresentar baixa toxicidade, uma vez que são administrados diretamente no sangue.

A concentração de  $^{10}\text{B}$  nos tecidos é estimada a partir de taxas tecido-sangue (CODERRE e MORRIS, 1999). Medidas de concentração de  $^{10}\text{B}$  no sangue são realizadas antes e após a irradiação, com objetivo de fornecer antes da irradiação uma previsão da concentração média de  $^{10}\text{B}$  e após a irradiação obtém-se assim melhor estimativa para a concentração real durante a irradiação completa, já que existem variações significativas nas

concentrações de B no sangue entre pacientes individuais, independentemente se a mesma quantidade de BFA é infundida por peso corporal (KORTESNIEMI *et. al.* 2004).

Existem atualmente três gerações de agentes de entrega de boro utilizados na BNCT. A primeira geração de agentes de entrega de boro foi o ácido bórico e seus derivados, utilizados em testes clínicos em 1950. Porém, estas substâncias tinham pouca retenção nos tumores, ou seja, baixa concentração de boro nas células tumorais e não possuíam seletividade entre as células sadias e tumorais (GODWIN *et al.*, 1955). A partir de 1960 dois outros compostos começaram a ser utilizados nos testes clínicos a borofenilalanina (BFA) que tem a estrutura de um aminoácido e o borosulfidril (BSH) que possui a estrutura semelhante a um cluster.

Em 1987 a BFA começou a ser utilizado no tratamento de melanoma maligno (câncer de pele), então começou-se a notar que a concentração de BFA era muito maior não somente nas células de melanoma mais também em outros tipos de células tumorais. Pensa-se que esse aumento da concentração em células cancerosas podia ser explicado pelo aumento no nível de transportes de aminoácidos em células de tumores malignos (ONO, 2016).

## BFA

O L-BFA (Figura 5) inicialmente utilizado na BNCT para melanoma devido a sua semelhança com a L-fenilalanina, substância a partir da qual se inicia a biossíntese de melanina. Hoje, é utilizada na BNCT para tumores cerebrais, cabeça e pescoço, pois notou-se uma grande propensão dessa substância em se acumular em vários tipos de tumores. O BPA possui um grande grau de hidrofobia, necessitando ser combinado com alguma substância para formar um complexo solúvel em água (ONO, 2016).

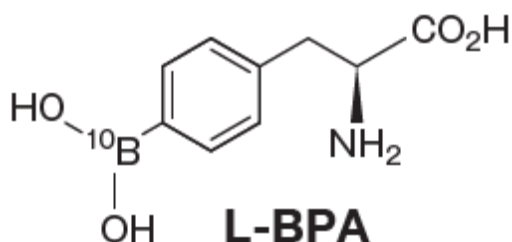


Figura 5 – Estrutura química BFA.

Alguns estudos estimam a dose endovenosa a ser aplicada de BFA entre 250 mg BFA/Kg a 900mg BFA/Kg (YAMAMOTO *et. al.* 2013)

## BSH

O BSH (Figura 6) consiste em uma série de aglomerados de boro com uma estrutura de 20 faces. É uma molécula iônica solúvel em água com 12 átomos de boro, e consegue transpassar a barreira hematoencefalica, sendo por esse motivo utilizado inicialmente para tumores cerebrais (ONO, 2016). O BSH Possui uma meia vida no tumor de aproximadamente quatro horas e meia, após este intervalo só restará metade da concentração inicial do boro no tumor, limitando também deste modo o tempo de irradiação (DALLE, 1999).

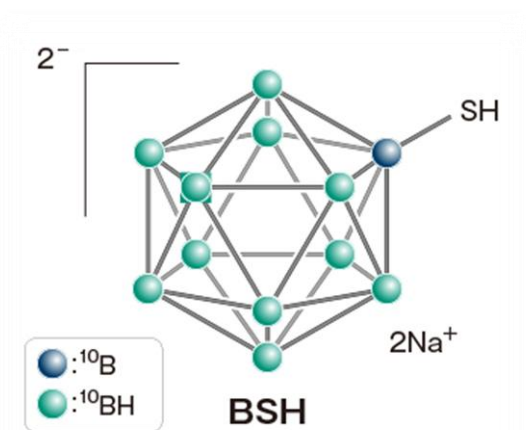


Figura 6 – Estrutura química BSH. Fonte ONO, 2016.

O BFA difere do BSH na medida em que esse é seletivamente absorvido por células cancerosas. Os compostos de boro exibem uma distribuição microscópica complexa, e a concentração de boro nas células tumorais difere quanto ao tipo de composto utilizado e também quanto ao tipo de célula tumoral. As doses a serem administradas antes do tratamento dependem de cada composto utilizado e são calculadas virtualmente e em seguida multiplicadas por um coeficiente de conversão.

A terceira geração, geração atual, vem tentando unir os compostos já utilizados com boa resposta para a técnica, BFA, BSH, e outros compostos contendo boro aliados a moléculas de segmentação de baixo e alto peso molecular como direcionadores dos agentes de boro para as células tumorais, como: mitocôndrias, lisossomos, açúcares (frutose), porfirinas, anticorpos monoclonais ou outros componentes de direção de macromoléculas, na tentativa de aumentar a concentração de <sup>10</sup>B nas células tumorais (KAVITAA, 2016).

Alguns grupos de pesquisa pelo mundo, localizados principalmente na Europa e no Japão vem buscando compostos, ou tentando melhorar de alguma maneira aqueles utilizados

na BNCT para que correspondam a todas essas propriedades acima citadas (ONO, 2016).

Neste trabalho, partindo da tendência nas pesquisas em desenvolver uma forma de aumentar a concentração de boro dentro das células tumorais, terceira geração de agentes de entrega de boro, utilizou-se a vitamina B<sub>12</sub> ligada a BFA para direcionar o composto de boro para dentro das células tumorais, utilizando de informações fornecidas por vários estudos de que as células tumorais possuem um grande requerimento de absorção de vitamina B<sub>12</sub> para sua rápida multiplicação (FLODH, ULLBERG, 1968).

### **1.3 Vitamina B12**

Durante toda sua história a vitamina B<sub>12</sub> rendeu dois prêmios Nobel. A história de sua descoberta começa com uma doença, a anemia letal causada por distúrbios gástricos descrita pela primeira vez em 1824, por Combe e Addison. A doença permaneceu mortal durante um século recebendo o nome de anemia perniciosa por este motivo. Whipple e Rabscheit-Robbins demonstraram em 1925, que a doença poderia ser combatida a partir da ingestão de grandes quantidades de fígado num experimento realizado com cães (VANNUCHI, MONTEIRO, 2010).

Eis que em 1926, Furon Minot e Murphy receberam um prêmio Nobel de Medicina, pois partindo das observações de Whipple e Rabscheit descreveram a eficácia da alimentação com fígado para o tratamento da anemia perniciosa. Alguns pesquisadores começaram a sugerir que a anemia era causada por uma incapacidade de completar alguns mecanismos da digestão gástrica, quando em 1929, Castle descreveu a existência de um fator intrínseco, secretado pelas células parietais do estômago, e que este fator agia em conjunto a um fator extrínseco, obtido a partir do fígado (VANNUCHI, MONTEIRO, 2010).

A busca pelo fator extrínseco resultou no isolamento e cristalização da vitamina B<sub>12</sub> no início do século XX por Karl Folkers da Merk e E. Lester Smith da Glaxo que isolaram independentemente a vitamina B<sub>12</sub> a partir do tecido hepático bovino.

Em 1948, Dorothy Crowfoot Hodgkin(1910-1994), pioneira na determinação de estruturas por técnicas de difração de Raios X recebeu de E. Lester Smith cristais vermelhos de vitamina B<sub>12</sub> para serem analisados. Quando Dorothy iniciou seus estudos a respeito da vitamina B<sub>12</sub> pouco se sabia sobre sua estrutura química, apenas que o cobalto estava ligado a uma estrutura formada por quatro anéis pirrol, semelhante a um anel porfirínico, porém com um carbono a menos de modo que dois anéis pirrol ligam-se diretamente, a partir de então está estrutura, até então desconhecida, passou a ser chamada de corrina, essa descoberta foi

realizada por Alexander Todd e Alan W. Johnson através de estudos de degradação da vitamina B<sub>12</sub> (VARGAS, 2012; TODD, 1958).

As primeiras fotografias de raios X tiradas por Dorothy mostraram que a molécula possuía um peso molecular da ordem de 1500, era uma molécula muito complexa para ser analisada pelas técnicas de difração de raios X conhecidas até então, por este motivo Dorothy com ajuda de seus colaboradores desenvolveu novas técnicas para determinação de grandes estruturas utilizando difração de raios X, recebendo em 1964, o prêmio Nobel de Química pela determinação de grandes estruturas bioquímicas (FERRY, 200; BBC, 2012; GONÇALVES, 2010).



Figura 7 – Dorothy Crowfoot Hodgkin ganhou em 1964 o prêmio Nobel de Química por suas determinações, usando técnicas de difração de raios X, das estruturas de importantes substâncias bioquímicas. Fonte: VARGAS, 2012.

### 1.3.1 Estrutura Vitamina B<sub>12</sub>

Após oito anos, em 1956 a estrutura da vitamina B<sub>12</sub> foi completamente elucidada por Dorothy C. Hodgkin.

A molécula de cobalamina é uma estrutura complexa formada por um átomo de cobalto situado no centro de um anel tetrapirrólico, de fórmula molecular C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P. O cobalto pode estar ligado variavelmente a grupos metila, 5'desoxiadenosil, hidróxi ou ciano, dando origem a diferentes formas da vitamina: metil – cobalamina, desoxiadenosil – cobalamina, hidróxi – cobalamina e ciano – cobalamina respectivamente, sendo as duas primeiras suas formas coenzimáticas (VANNUCHI e MONTEIRO, 2010).

Neste trabalho a forma de cobalamina utilizada foi à ligada a grupos ciano, conhecida como cianocobalamina, sua estrutura está representada na Figura 8. A cianocobalamina e a hidroxicobalamina são formas sintéticas da vitamina B<sub>12</sub>.

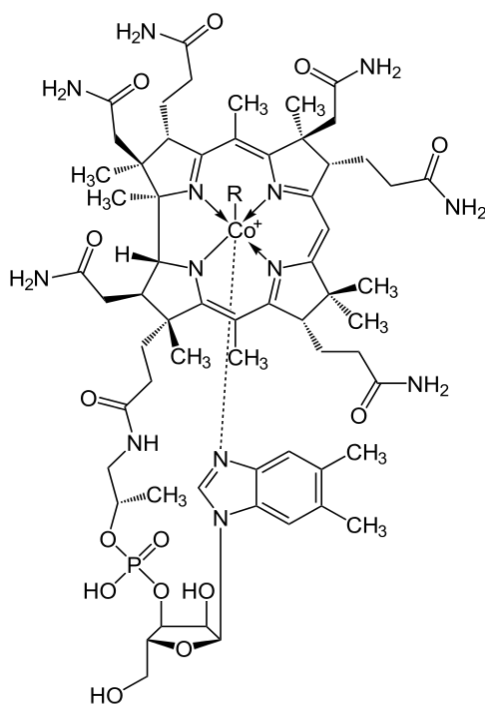


Figura 8 – Estrutura Cianocobalamina

### 1.3.2 Propriedades Físico-Químicas da Vitamina B12

A cianocobalamina (CbI) é um pó cristalino, vermelho escuro (devido ao cobalto), inodoro e insípido. Possui massa molar igual a 1355,56 g.mol<sup>-1</sup>. É solúvel em água (1g de CbI para 80g de água) e em álcool (1g de CbI para 180g de álcool) é insolúvel em acetona, clorofórmio e éter. Possui ponto de fusão maior que 300°C e pH 6 em solução aquosa (1g/L, 20°C). É lentamente decomposta em soluções alcalinas e soluções fortemente ácidas e é sensível a luz podendo sofrer degradação (MARTINDALE, 1982; THE MERK INDEX, 2001; MOURA, 2005).

### 1.3.3 Aspectos da síntese orgânica total e biossíntese da cianocobalamina

A síntese química total da vitamina B<sub>12</sub> foi eventualmente acompanhada pela elucidação da via bioquímica para a cobalamina na bactéria aeróbica *Pseudomonas*



*denitrificans*, em 1993, por Blanche e colegas na Rhône – Poulenc Rorer (RPR) em conjunto a Battersby no Instituto de Química em Cambridge, Inglaterra (BATTERSBY, 1994; BLANCHE *et al.*, 1995).

Os microrganismos são as únicas fontes naturais de vitamina B<sub>12</sub> existentes. A biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> é realizada por alguns tipos de bactérias e arqueas e, como tal, sua produção depende de fermentação microbiana. Existem duas rotas biossintéticas diferentes para a vitamina B<sub>12</sub> na natureza: (1) uma via aeróbica ou, mais precisamente, oxigênio – dependente que é encontrado em organismos como *P. denitrificans* e (2) uma via anaeróbia independente de oxigênio, investigada em organismos como *Bacillus megaterium*, *P. shermanii* e *Salmonella typhimurium*(MARTENS, *et. al.* 2001).

Abaixo é demonstrado o esquema (Figura 10) resumido sobre a rota biossintética descoberta por Battersby e seus colegas. Sabe-se que o nucleotídeo e as funções amida da vitamina B<sub>12</sub> (1) são adicionadas no final da biossíntese e que o ácido cobálico (2) (Figura 9) atua na *P. shermanii* como um precursor da vitamina.

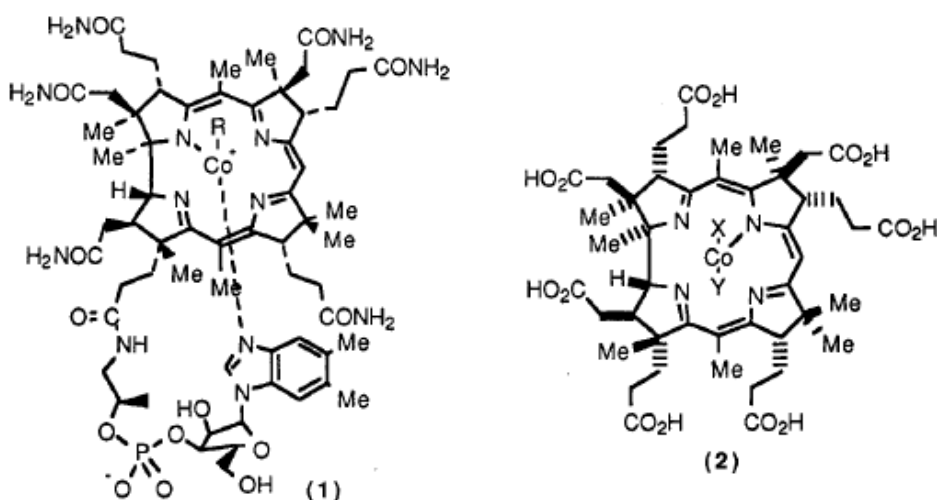


Figura 9 – Estrutura química Vitamina B<sub>12</sub> (1) e estrutura química ácido cobálico (2).

O ácido aminolevulínico (ALA) (3) é convertido em porfobilinogênio (PBG) (4), quatro moléculas que por ação da enzima hidroximetilbilano sintase (também chamada deaminase), fornecem hidroximetilbilano (5). Isto é, gera um rearranjo enzimático que por ciclização forma urogênio III (6). De fato, as etapas que desviam a via do urogênio III até a vitamina B<sub>12</sub> são de metilação. Os intermediários biossintéticos que precedem à primeira

corrina são chamadas precorrinas e um número é adicionado aos carbonos mostra os grupos metil introduzidos a partir da S-adenosilmetionina.

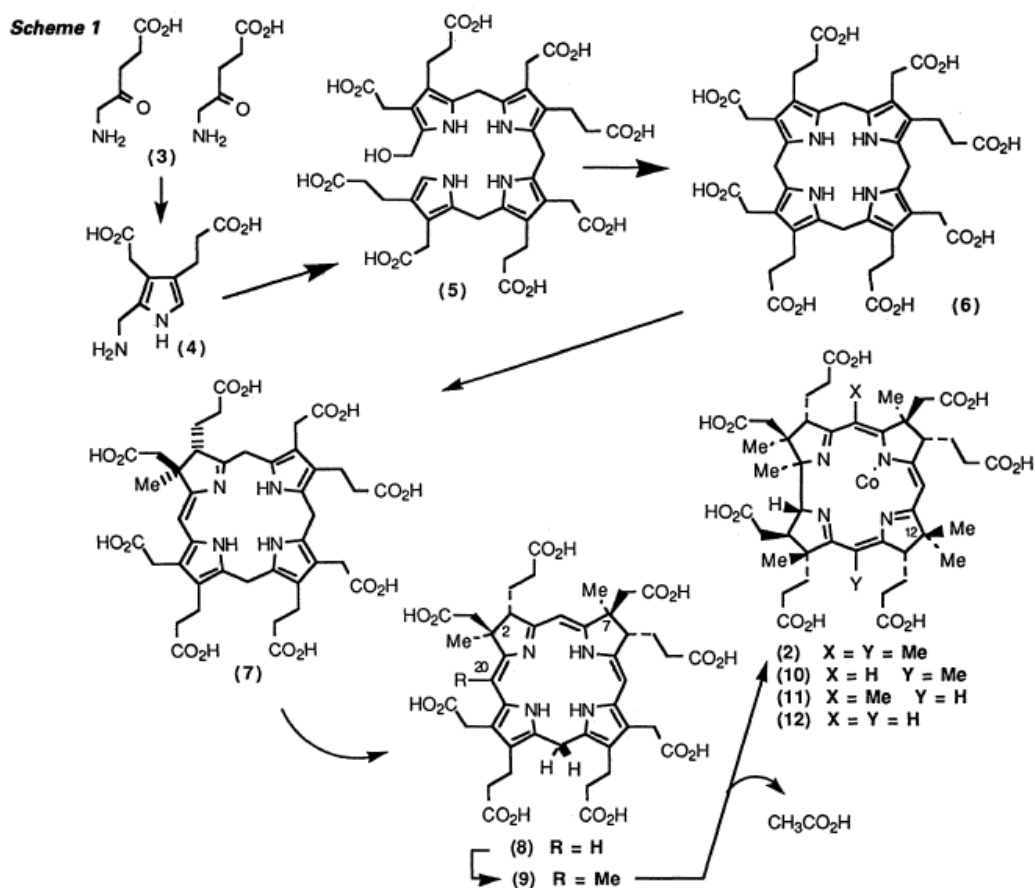


Figura 10 – Esquema resumido da via biossintética da vitamina B<sub>12</sub> por bactérias do tipo *P. shermanii*. Fonte: BATTERSBY, 1994.

Após 10 anos de trabalho, com mais de 100 pesquisadores, a síntese química completa da vitamina B<sub>12</sub> foi realizada por dois grupos o de Robert Burns Woodward em Harvard e o de Albert Eschenmoser em ETH Zurich (*Instituto Federal Suíço de Tecnologia de Zurich*), o trabalho começou em 1960 pelo grupo de ETH e em 1961 pelo grupo de Harvard (WOODWARD, 1973; ESCHENMOSER e WINTER, 1977).

Cada grupo determinou uma variante da síntese que possui cerca de 70 etapas, e ambas foram finalizadas em 1972. As sínteses diferem em sua estratégia geral de formação do anel corrina sendo que a síntese variante de Harvard fecha o anel corrina entre os anéis A e B (“variante A/B”) enquanto a síntese variante de ETH fecha o anel corrina entre os anéis A e D (“variante A/D”). A união direta dos anéis não foi considerada viável devido ao impedimento estérico, mas ambas as conexões foram possíveis através do método de contração do enxofre.

O objetivo da síntese de Woodward/Eschenmoser foi o ácido cobárico (Figura 8) um produto natural que pode ser preparado pela remoção por hidrólise da cadeia lateral mais longa da estrutura da vitamina B<sub>12</sub>. Em 1960 o ácido cobárico já havia sido convertido em vitamina B<sub>12</sub> por Bernhauer (BERNHAUER *et. al.*, 1960).

Em 1970, Robert Woodward anunciou em um simpósio em Riga a síntese do heptametilcobirinato, que possui um grande número de características do ácido cobárico, nele o núcleo está presente conforme o necessário e os grupamentos laterais estão presentes e se parecem muito com o necessário para se obter o ácido cobárico. No entanto, houve muitas dificuldades para introduzir ao heptametilbinorcobirinato os centros de quiralidade presentes no ácido cobárico e também quanto a algumas diferenças estruturais. Após todas as adversidades vencidas, a partir do heptametilcobirinato foi possível a síntese do ácido cobárico e posteriormente o acréscimo da cadeia lateral característica da vitamina B<sub>12</sub>.

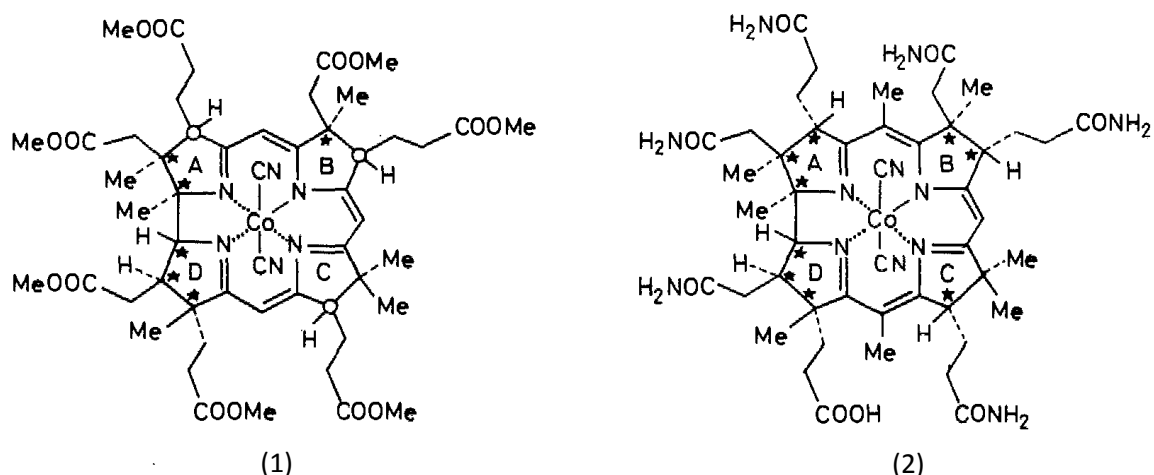


Figura 11 – Estrutura química heptametilcobirinato (1) estrutura química Ácido cobárico (2). Fonte: WOODWARD, 1973.

### 1.3.4 Transportadores de Vitamina B<sub>12</sub>

A vitamina B<sub>12</sub> depois de ingerida chega ao estômago onde é secretada uma glicoproteína pelas células parietais, conhecida como fator intrínseco (FI), indispensável à absorção da vitamina B<sub>12</sub>. O complexo vitamina B<sub>12</sub>- FI interage com receptores específicos na mucosa do íleo, ocorrendo sua absorção. A partir de então a vitamina B<sub>12</sub> já livre do FI é capturada por uma beta-globulina, a transcobalamina II (TC II), e é transportada pelo sangue depurada do plasma pelos tecidos, principalmente pelo fígado via sistema porta. O complexo vitamina B<sub>12</sub>-TC II interage com receptores celulares e é convertido em duas coenzimas uma, citosólica e outra mitocondrial.

Já dentro do espaço intracelular a vitamina é reduzida em duas formas a

desoxiadenosil-cobalamina que segue via mitocôndria e se une a metilmalonil-CoA mutase e na forma metilcobalamina que segue via citoplasma atuando em conjunto com a metionina sintetase. A primeira forma está envolvida no metabolismo dos aminoácidos, do colesterol, da timina e dos ácidos graxos. A segunda forma participa da remetilação da homocisteína a metionina, etapa em que há a ligação entre o metabolismo do folato e da cobalamina. As duas coenzimas ativas são necessárias para o metabolismo de lipídeos e carboidratos e para síntese da metionina, sendo assim também está envolvida na síntese de DNA e RNA (VANNUCHI, MONTEIRO, 2010).

### **1.3.5 Vitamina B12 em tumores**

A vitamina B<sub>12</sub> é importante para processos metabólicos básicos e necessária para o crescimento e reprodução em animais e alguns microrganismos. Muitas funções metabólicas diferentes são atribuídas à vitamina B<sub>12</sub> incluindo a participação na síntese de ácidos nucleicos (FLODH, ULLBERG, 1968). Estima-se que células caracterizadas por uma rápida divisão (células epiteliais, medula óssea, células mielóides) são aquelas que necessitam de maior quantidade de vitamina B<sub>12</sub> (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH – SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

Segundo Blum e Heinrich (1957) pacientes com neoplasias possuem uma grande requisição de vitamina B<sub>12</sub>, pois as células de carcinoma assim como as células normais necessitam de vitamina B<sub>12</sub> para seu crescimento infiltrativo.

Um estudo realizado por Hans Flodh e Sven Ullberg na Suécia, investigava o acúmulo de vitamina B<sub>12</sub> marcada em alguns tumores transplantados para obter informações sobre o grau de absorção nos tecidos neoplásicos em comparação com os normais. Após a injeção endovenosa de vitamina B<sub>12</sub> marcada, todos os tumores estudados acumularam radioatividade e houve um aumento na concentração com o passar do tempo de 1-4 dias após a administração. Em todas as neoplasias a radioatividade foi mais pronunciada nas partes que cresceram ativamente e praticamente nenhuma absorção foi observada nas áreas necróticas dos tumores.

Sendo assim, as moléculas de vitamina B<sub>12</sub> são rapidamente absorvidas por células tumorais devido às suas altas taxas metabólicas podendo assim proporcionar um mecanismo de direcionamento para tais células fornecendo a carga útil de boro necessária para um bom desempenho da BNCT.

Formado então, o composto CbI – BFA sugerindo uma entrega de boro mais eficiente e em maior concentração nas células tumorais, utilizou-se de um outro aliado para melhorar a

liberação desse composto no organismo, pois sabe-se que é necessário que o boro permaneça em altas concentrações nas células tumorais por um certo período de tempo, para que a terapia seja eficaz, é quando entra em cena o poliglicerol dendrítico (PGLD) como sistema de liberação de agentes terapêuticos no organismo. E também, outro fator de suma importância na associação do PGLD ao composto CbI – BFA é aumentar a solubilidade deste no meio aquoso, pois sabe-se do comportamento hidrofílico apresentado por alguns poliglicerois dendríticos e como já foi dito anteriormente o BFA é pouco solúvel em água (SILVA, 2008).

## 1.4 Polímeros Dendríticos

Os polímeros dendríticos são uma classe de compostos poliméricos que podem ser distinguidos dos compostos poliméricos lineares convencionais por apresentarem uma estrutura altamente simétrica e ramificada (SILVA, 2008). Possuem uma topologia específica que consiste de núcleo, camadas (gerações – unidades repetitivas de ramificações) e grupos terminais periféricos (MILITÃO, 2013). Os dendrímeros de poliglicerol podem ter sua periferia (grupos terminais) modificada quimicamente de forma a melhorar sua hidrofiliabilidade (TURK, 2007; TOMALIA, 2004).

Atualmente os dendrímeros vem sendo empregados como transportadores de compostos *in vivo* por possuírem estruturas similares a proteínas globulares e propriedades bioquímicas, no que diz respeito a biocompatibilidade como hematocompatibilidade e não citotoxicidade as células de mamíferos (MOURA, 2011; LEITE, 2008).

Os polímeros dendríticos possuem uma classificação determinada pela quantidade de gerações (unidades repetitivas) que estão ligadas covalentemente ao núcleo, sendo assim a molécula do núcleo central é chamada geração zero (G0), e a geração aumenta a cada adição de camada de unidades repetitivas (G1, G2, G3, G4, etc...) (SVENSON, TOMALIA, 2012).

O aumento de geração é caracterizado por mudanças na estrutura do dendrímero, sendo que com o aumento de ramificações a estrutura apresenta cavidades internas (a partir de G4) e aumento de grupos terminais reativos (KLAJNERT, 2001). Os dendrímeros de gerações mais baixas (0, 1 e 2) são geralmente estruturas assimétricas, flexíveis e abertas, enquanto gerações mais elevadas tornam – se rígidas, esferóides, elipsóides ou cilindros e gera uma estrutura fechada (MILITÃO, 2013; CAMINATI, 1990).

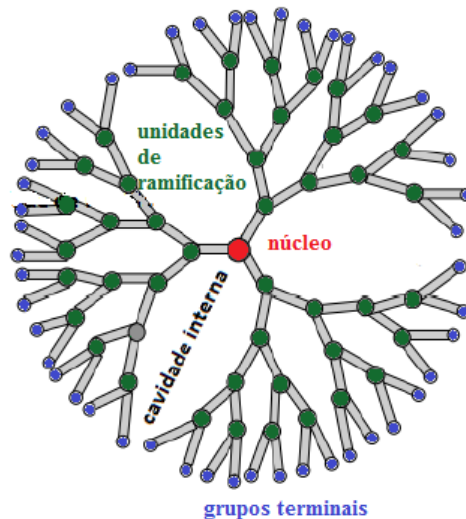


Figura 12 – Representação da geração 4 de um dendrímero. Fonte: MILITÃO, 2013.

### 1.4.1 Sistemas de liberação

Sistemas de liberação são dispositivos de administração utilizados para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo e manter sua concentração plasmática. Para isto são utilizados sistemas elaborados, tais como os que utilizam dendrímeros para o transporte do fármaco (BALDWIN, 1998).

Os dendrímeros permitem a conjugação através de ligações em sua periferia com macromoléculas como, por exemplo: ácido fólico, anticorpos monoclonais e peptídeos (OOYA, 2005). Podem também através dessas ligações de conjugação aumentar a solubilidade em meio aquoso de substâncias hidrofóbicas, sem que haja a necessidade que o dendrímero tenha um núcleo hidrofóbico para que haja encapsulamento e solubilização dessas substâncias hidrofóbicas (WOLINSKY, 2008).

Segundo Wolinsky (2008), existem alguns princípios que norteiam a utilização de dendrímeros como sistemas de liberação e veículo de entrega, a serem citados:

1. Ao introduzir-se poli (etileno glicérol) na estrutura do dendrímero aumenta – se a solubilidade em água;
2. Os dendrímeros podem ligar-se covalentemente através de seus grupos periféricos a agentes terapêuticos ou encapsulá-los em suas cavidades;
3. Nos casos de tratamento de câncer, receptores específicos podem ser ligados à superfície dos dendrímeros a fim de direcioná-los para as células tumorais.

Os agentes terapêuticos podem ser conjugados aos dendrímeros de duas maneiras: por meio de encapsulamento nas cavidades do dendrímero, a depender do tamanho da cavidade; e ligados covalentemente a grupos terminais funcionalizados.

Neste trabalho foi utilizado como dispositivo de liberação do composto CbI – BFA, o poliglicerol dendrítico de geração 4 (PGLD<sub>G4</sub>).

#### 1.4.2 Poliglicerol dendrítico (PGLD)

O PGLD possui em sua estrutura grupos hidroxila e ligações éter (Figura 13), onde é possível transformar as hidroxilas funcionais (grupos periféricos) em sítios de imobilização de substâncias de interesse (MILITÃO, 2013).

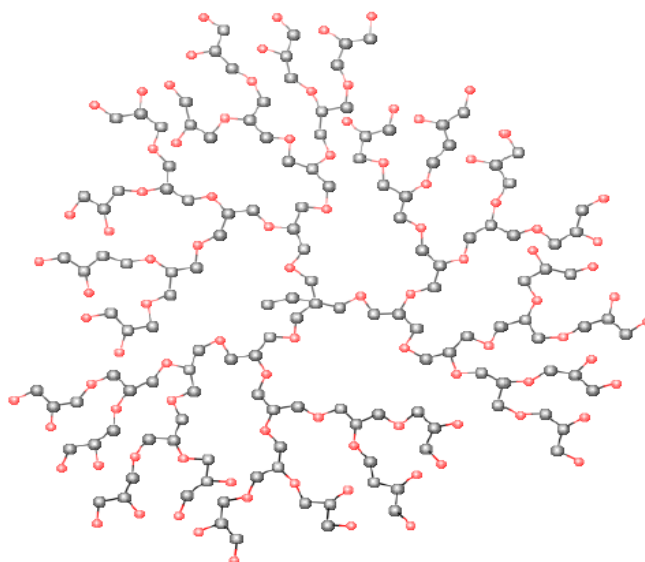


Figura 13 – PGLD geração 4, as esferas pretas representam o carbono e as esferas vermelhas representam o oxigênio Fonte: KOJIMA, 2000.

A utilização de dendrímeros para o projeto de sistemas de liberação prolongada aparece como uma alternativa interessante da nanotecnologia para o projeto de sistemas de liberação prolongada de BFA e seus derivados para utilização na terapia por BNCT. Os sistemas macromoleculares arborescentes permitem, de acordo com dados recentes da literatura, o acúmulo do fármaco nas células tumorais reduzindo ao mesmo tempo uma redução significativa do clearance renal e hepático aumentando dessa forma a biodisponibilidade do fármaco (KOJIMA, *et. al.* 2011 e LUONG *et. al.*, 2016).

Nesse trabalho, a fim de se reduzir o *clearance* (depuração) renal e hepático, o conjugado CbI-BFA foi ligado covalentemente ao PGLD<sub>G4</sub> através de uma reação de condensação do tipo aldeído-amida. Inicialmente, hidroxilas primárias foram convertidas a

grupos aldeído utilizando ácido periódico através de uma rota de síntese adaptada da patente norte americana US 8680200.



## Referências Capítulo 1

BALDWIN, S. P. e SALTZMAN, W. M. **Materials for protein delivery in tissue engineering**. v. 33, p. 71–86, 1998.

BATTERSBY, A.R. How nature builds the pigments of life: the conquest of vitamin B<sub>12</sub>. **Science**. v. 264, p. 1551–1557, 1994.

BERNHAEUER, K., FRIEDRICH, W., ZELLER, P. Synthesen auf dem Vitamin-B<sub>12</sub>-Gebiet. **Helvetica Chimia Acta**. v. 43, p. 704-712, 1960.

BLANCHE, F., CAMERON, B., CROUZET, J., DEBUSSCHE, L., THIBAUT, D., VUILHORGNE, M., LEEPER, F.J., BATTERSBY, A.R. Vitamin B<sub>12</sub>: wie das Problem seiner Biosynthese gelöst wurde. **Angew Chem** v.107, p.421–452, 1995.

CAMINATI, G.; TURRO, N. J. e TOMALIA, D. A. Photophysical investigation of starburst dendrimers and their interactions with anionic and cationic surfactants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 23, p. 8515–8522, 1990.

CAMPOS, T. P. R. Considerações sobre a Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, p. 283-292, 2000.

CODERRE, J.A., MORRIS, G.M. The radiation biology of boron neutron capture therapy. **Radiat. Res.** 151 (1), 1–18, 1999.

DALLE, H. M. Considerações sobre BNCT. **Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CNEN. Belo Horizonte**.

**Encyclopædia Britannica. Disponível em:** <<https://www.britannica.com/science/glioma>> . Acesso em: 7 de julho de 2017.

ESCHENMOSER, A., WINTNER, C.E. Natural Product Synthesis and Vitamin B<sub>12</sub>: Total synthesis of vitamin B<sub>12</sub> provided a framework for exploration in several areas of organic chemistry. **Scienc**, v. 196, p. 1410-1920.

FERRY, G. Dorothy Hodgkin: A Life. **CSH Press**, 2000 - ISBN 978-087969594-1.

FLODGH, H., ULLBERG, S. Accumulation of labelled vitamin B<sub>12</sub> in some transplants tumours. **Int. J. Cancer**, v. 3, p. 694-699, 1968.

GODWIN, J. T., FARR, L. E., SWEET, W. H.; ROBERTSON, J. S. Pathological study of eight patients with glioblastoma multiforme treated by neutron capture therapy using Boron 10. **Cancer**, v. 8, p. 601-615, 1955.

GONÇALVES, M. R. Dorothy Crowfoot Hodgkin, Edições Colibri: Lisboa, 2010. ISBN 978-972-991-3.

HENRY K. Polyglycerol Aldehydes. **Actamax Surgical Materials LLC**, Berkeley, CA (US). Patent 8,680,200, 25/03/2004.

IARC: International Agency for Research on Cancer. **World Health Organization (OMS)**. Disponível em: <<https://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 09 de julho 2017.

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016-2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>> . Acesso em: 08 de set. 2017.

KAVITAA N., NALINI, A., MANIGANDAN, T., SARUMATHI, T. Boron Neutron Capture Therapy - A Literature Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** [serial online] 2016.

KLAJNERT, B., BRYCZEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. **Acta biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 199–208, 2001.

KOJIMAC., et. al., Dendrimer-Based MRI Contrast Agents: The Effects of PEGylation on Relaxivity and Pharmacokinetics, *Nanomedicine*. 2011 Dec; 7(6): 1001–1008

KOJIMA, C. et al. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. **Bioconjugate chemistry**, v.11, n. 6, p. 910–7, 2000.

KORTESNIEMI M., SEPPALA T., AUTRINEN I., SAVOLAINEN S. Enhanced blood boron concentration estimation for BPA-F mediated BNCT. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 61, p. 823-827, 2004.

LEITE, J. F. Propriedades hemocompatíveis do dendrimer bioativo de poliglicerol conjugado com estreptoquinase. **Universidade Federal de Itajubá** - [S.l.].2008.

LOCHER, G.L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. **Am J Roentgenol Radium Ther.**, v. 36, n.1, p.1–13, 1936.

LUONG D, et. al. PAMAM dendrimers: Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. **Acta Biomater.** 2016 Oct 1;43:14-29].

MARTENS, S. H., BARG, H., WARREN, M. J., JAHN, D. Microbial Production of Vitamin B12. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v.58, p. 275-285, 2001.

MARTINDALE the extra pharmacopoeia. London: **The Pharmaceutical Press**, 1982.

MILITÃO, L. V. Análise Físico – Química e fotodinâmica de clorofila em dendrímeros de poliglicerol. **Universidade Federal de Itajubá** - [S.l.] 2013.

MOURA, R. M. Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrimer de poliglicerol salicilado Em Diferentes Linhagens Celulares. **Universidade Federal de Itajubá** - [S.l.]. 2011.

ONO, K., HATAZAWA, J., KIRIHATA, M., MARUHASHI, A. Pioneered by Japanese brainpower: New Horizons in Cancer Treatment BNCT. **BNCT Promotion and Research Society**, 2016.

OOYA, T. et. al. Self-assembly of cholesterol-hydrotopic dendrimer conjugates into micelle-like structure: Preparation and hydrotopic solubilization of paclitaxel. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 6, n.5, p. 452-456, 2005.

SILVA, A. R. P. Estudo Das Propriedades Bioquímicas De Sistemas Poliméricos Arborescentes PglD-Aas Para O Tratamento Do Câncer. **Universidade Federal de Itajuba - [S.l.]**. 2008.

SVENSON, S., TOMALIA, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 102–115, 2012.

THE MERCK Index. 13. ed. Whitehouse Station: Merck, 2001

TIJERO, M.C.. A física da terapia de captura de nêutrons pelo boro. **Revista Brasileira de Ensino de Física. Sociedade Brasileira de Física**, v. 32, n. 4, p. 4303-1-4303-7, 2010.

TODD, A., CLARCK, V. M., JOHNSON, A. W., SUTHERLAND, I. O. Chemistry of the Vitamin B<sub>12</sub> Group. Part VIII. The Products of Chromic Acid Oxidation. **Journal of the Chemical Society**, p. 3283-3289, 1958.

TOMALIA, D. A. Birth of a New Macromolecular Architecture: Dendrimers as Quantized Building Blocks for Nanoscale Synthetic Organic Chemistry. **Aldrichimica Acta**, v. 37, n. 2, 2004.

TÜRK, H. et al. Water-soluble dendritic core-shell-type architectures based on polyglycerol for solubilization of hydrophobic drugs. **Chemistry (Weinheim an derBergstrasse, Germany)**, v. 13, n. 15, p. 4187–96, doi:10.1002/chem.200601337, 2007.

VANNUCHI, H., MONTEIRO, T. H. Funções plenamente reconhecidas dos nutrientes: Cianocobalamina (Vitamina B<sub>12</sub>). **ILSI – International Life Sciences Institute**, v. 13.

VARGAS, M. D. Dorothy Crowfoot Hodgkin: Uma vida Dedicada à Ciência, Revista **Virtual Química**. v.4, n.1, p. 85-100, 2012.

WOLINSKY, J. B., GRINSTAFF, M. W. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for câncer treatment. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 9, p. 1037-1055, 2008

WOODWARD, R. B. The Total Synthesis of Vitamin B<sub>12</sub>. **Department of Chemistry, Harvard University, Cambridge, USA**.

YAMAMOTO T., TSUBOI K., NAKAI K., SAKURAI H., MATSUMURA A. Boron Neutron Capture Therapy for brains tumors. **TRC**, v. 2, n° 2, 2013.

## **CAPÍTULO 2**

### **Objetivos deste trabalho**

# **2**

#### **2.1 Objetivos Gerais**

#### **2.2 Objetivos Especificos**

## 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral da presente proposta é a síntese e caracterização de compostos transportadores de  $^{10}\text{B}$  para o tratamento de gliomas baseado na Cbl para utilização na BNCT, ampliando assim as opções de compostos que preenchem todos os requisitos necessários para o sucesso da terapia.

## 2.2 Objetivos específicos

Para a concretização dessa proposta, os seguintes objetivos específicos desse trabalho são apontados:

- (a) Desenvolvimento de rota de síntese de sistemas transportadores de quimioterápicos baseados em derivados da cianocobalamina;
- (b) Síntese e caracterização de derivado da cianocobalamina transportador de  $^{10}\text{B}$  como sistema de liberação latenciada para BNCT;
- (c) Caracterização dos derivados da cianocobalamina como agentes transportadores de  $^{10}\text{B}$  utilizando as técnicas de espectroscopia vibracional (FTIR), análise termogravimétrica (TGA).

## **CAPÍTULO 3**

### **Materiais e métodos**

Este capítulo aborda as metodologias empregadas na preparação e caracterização do conjugado PGLD-CbI-BFA neste trabalho.

# **3**

**3.1 Síntese e caracterização do conjugado.**

**3.2 Espectrometria de massa**

**3.3 Liofilização**

**3.4 Espectroscopia FTIR**

**3.5 Espectroscopia UV-Vis**

**3.6 TGA**

**3.7 CLAE**

**3.8 Estudo de liberação CbI-BFA**

**3.9 Espectrometria de emissão óptica com plasma**

### 3.1 Síntese e caracterização do conjugado CbI-BFA

Inicialmente, hidroxilas primárias do foram convertidas a grupos aldeído utilizando ácido periódico através de uma rota de síntese adaptada da patente norte americana US 8680200. Para a reação de oxidação foram utilizados 10 mL de solução (1 mmol) de periodato de potássio, preparada com solução tampão acetato (pH 5,0), com 500 mg de PGLD que permaneceu sob agitação magnética durante 80 minutos. A reação foi realizada em béquer de vidro sob pressão atmosférica normal, temperatura de 19 °C e pouca luz ambiente evitando a aceleração do processo de oxidação. Após a oxidação o PGLD foi liofilizado para ser utilizado na etapa seguinte.

A síntese do conjugado CbI-BFA se deu após a succinilação da CbI(A) (37,0 mmol) com anidrido succínico (1) (1,8 mmol, Sigma-Aldrich) e 4-dimetilamio piridina como catalisador (19,0 μmol). Após 24 h de reação à temperatura ambiente (20 °C) adicionou-se a borofenilalanina (BFA) (2). Após 24h de reação à temperatura ambiente obteve-se o conjugado CbI -BFA (C). A Figura 14 ilustra as principais etapas envolvidas na obtenção do conjugado CbI-BFA.

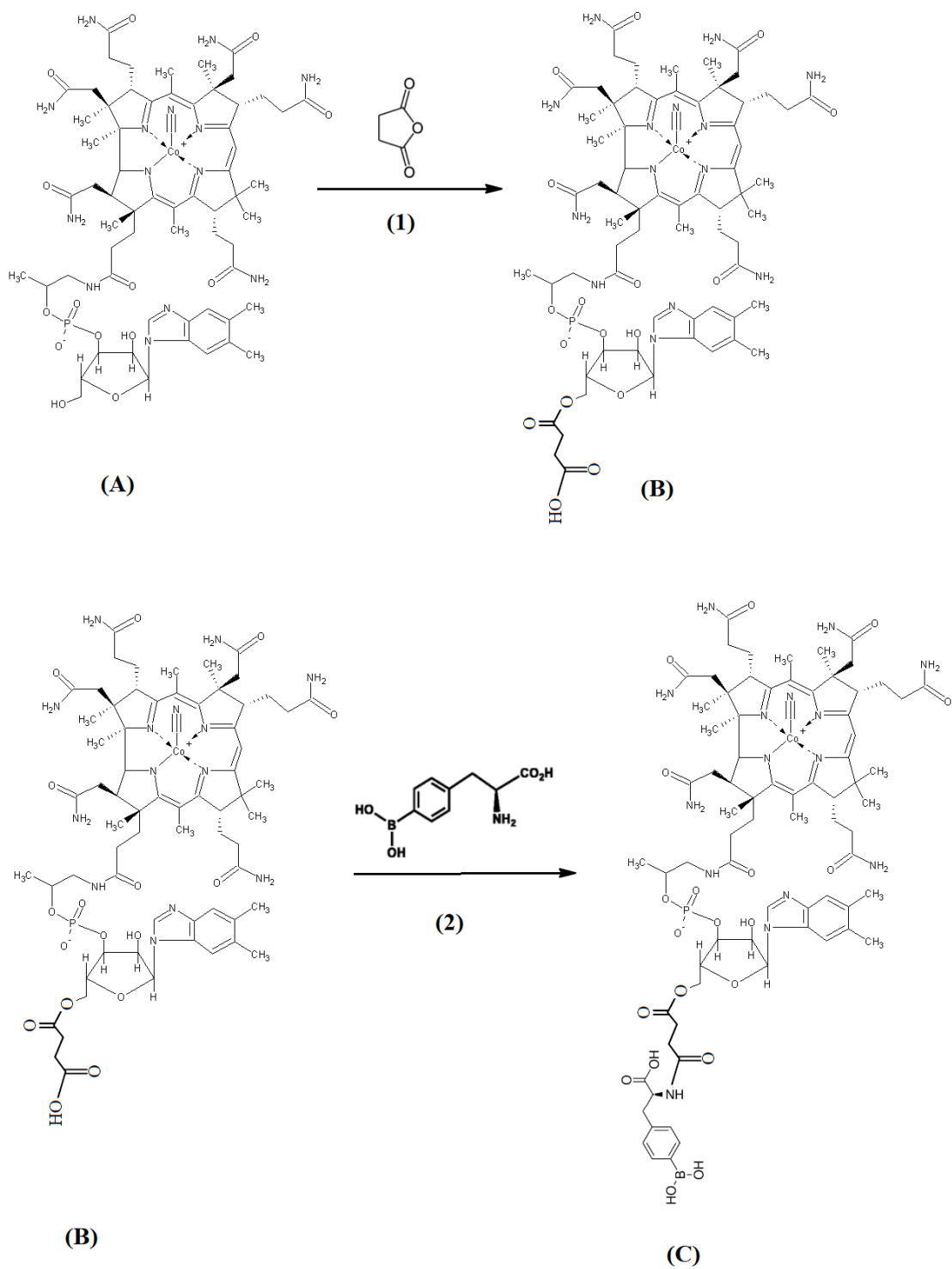


Figura 14 – A ilustração das principais etapas envolvidas na obtenção do conjugado Cbl-BFA

A Figura 15 ilustra as etapas de síntese para a imobilização do Cbl-BFA no PGLD<sub>G4</sub>. PGLD<sub>G4</sub> (A), derivado aldeídico do PGLD (B) e Cbl-BFA/PGLD<sub>G4</sub> (C).



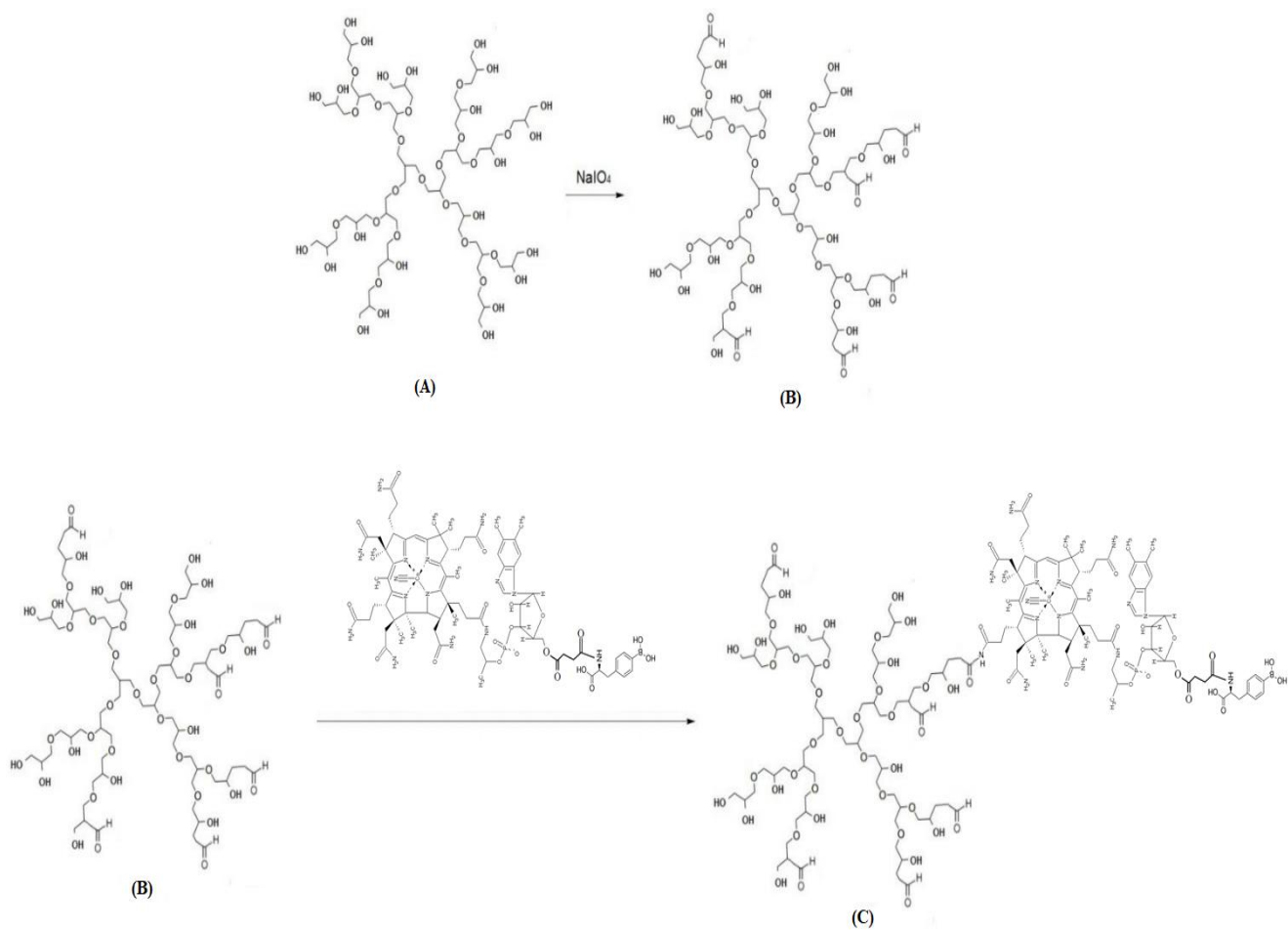


Figura 15 – Ilustração das etapas de síntese para a imobilização do Cbl-BFA no PGLD<sub>G4</sub>. PGLD<sub>G4</sub> (A), derivado aldeído do PGLD (B) e Cbl-BFA/PGLD<sub>G4</sub> (C).

## 3.2 Espectrometria de massa

A estrutura do conjugado CbI-BFA foi confirmada através da espectrometria de massas (Figura 16). Para a obtenção dos espectros de massas, o conjugado foi dissolvido em metanol/formiato de amônio 10 mM na proporção 1:1 de forma a se atingir uma concentração final de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As amostras foram introduzidas no equipamento por injeção direta via bomba infusora com fluxo de  $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os espectros foram adquiridos no modo *fullscan* (ESI-MS) em alta resolução tanto no modo positivo como no modo negativo. Para a dissociação dos íons utilizou-se argônio como gás de colisão (ESI-MS/MS). A voltagem do capilar e do cone foram 3,0 kV e 28 V, respectivamente. A temperatura da fonte foi de  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  e dessolvatação a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ . A aquisição dos dados foi feita na região de  $m/z$  300 a 1400.



Figura 16 – Espectrômetro GC-MS/MS TQ 8040. Fonte: SHIMADZU.

## 3.3 Liofilização

A liofilização do PGLD oxidado e do conjugado PGLD-CbI-BFA foi executada no Laboratório de Biomateriais da UNIFEI no aparelho liofilizador (Figura 17) da JJ Científica modelo LJJ04. Os precipitados obtidos foram colocados em Tubo Falcon de 15 mL e congelados a aproximadamente  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  e então colocados sob vácuo fazendo com que a água

ou solução aquosa ainda presente no precipitado passasse do estado sólido para o estado gasoso (sublimação) sendo assim retirada do composto.



Figura 17– Liofilizador JJ Científica modelo LJJ04. Fonte: Laboratório de Biomateriais UNIFEI.

### **3.4 Espectroscopia na região com Transformada de Fourier (FTIR)**

Neste trabalho a técnica FTIR foi realizada nos reagentes que formaram o conjugado (PGLD, PGLD oxidado, CbI e BFA) e no produto final (PGLD-CbI-BFA), com finalidade de monitorar as transformações dos grupos funcionais e para caracterização do produto final. O equipamento utilizado foi o da marca SHIMADZU modelo IRTracer-100 (Figura 18). A faixa espectral utilizada foi de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ . O equipamento encontra-se no Laboratório de Alta Tensão (LAT) UNIFEI.



Figura 18- SHIMADZU modelo IRTracer-100. Fonte: Laboratório de Alta Tensão – UNIFEI

### 3.5 Espectroscopia na região UV-Vis

As análises UV-Vis foram utilizadas em diversas soluções neste trabalho para determinação de curvas analíticas e para verificação de deslocamento de bandas após algumas reações. O aparelho utilizado foi o da marca VARIAN modelo Cary 50 Bio (Figura 19). O aparelho se encontra no Laboratório de Química Analítica – IQ UNIFEI.



Figura19 – UV-Vis VARIAN CARY 50. Fonte: Laboratório de Alta Tensão – UNIFEI.

### 3.6 Análise Termogravimétrica

As análises térmicas foram realizadas a fim de determinar a estabilidade térmica do PGLD, da CbI e do BFA. Todas as análises foram realizadas em cadinho de platina sob atmosfera de N<sub>2</sub> (100 mL/min) desde a temperatura ambiente (25°C) até 800°C. O equipamento utilizado foi o da marca SHIMADZU modelo TGA-50, que encontra-se no Laboratório de Alta Tensão (LAT) UNIFEI. Para os cálculos de energia de ativação foram utilizados os métodos Kissinger e Osawa.



Figura 20– Aparelho termogravimétrico SHIMADZU modelo TGA-50. Fonte: LAT – UNIFEI.

### 3.7 CLAE

A separação do CbI-BFA livre de CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> foi efetuada por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Shimadzu composto de forno (CTO-20A), injetor automático (SIL-30AC) e bomba (SIL-30AD), acoplado a detectores de rede de fotodiodos UV/Vis (Shimadzu SPDM20A). A coluna utilizada foi Trentec Reprosil Pur RP C18, 120 ODS3 5µm; 125x3,0mm. A fase móvel (A), utilizada para a limpeza da coluna foi constituída por acetonitrila/água na proporção 70:30 (v/v) nos primeiros 10 minutos para limpeza da coluna. A fase móvel (B) foi constituída por tampão fosfato 0,03M, pH 7,0/methanol na proporção 80/20 (v/v); velocidade de 0.5mL/min; tempo de análise 30min;

volume injetado de 100  $\mu$ L e detecção de UV a 361nm. As Figuras 21 e 22 ilustram o HPLC Shimadzu utilizado.



Figura 21 – HPLC SHIMADZU



Figura 22– Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) SHIMADZU.

### 3.8 Estudo da liberação de CbI-BFA do conjugado CbI-BFA/PGLDG4

O estudo de liberação *in vitro* do CbI-BFA do PGLD<sub>G4</sub> foi conduzido a partir da técnica de difusão em sacos de diálise, onde 3,0 mL de solução do CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> foi adicionado em um saco de diálise (Sigma 33 mm x 21 mm, *cut-off* de 3,5kD). Para o estudo da liberação o saco de diálise foi imerso em 100 mL de tampão fosfato pH 7,4, sob agitação constante (80 rpm) à  $37 \pm 0,5$  °C. Alíquotas de 1mL do meio foram removidas nos intervalos de tempo de 1-240 min e submetidos a doseamento de CbI-BFA por CLAE. O volume retirado do saco de diálise foi repostado com tampão fosfato após cada coleta. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.9 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado

O equipamento de ICP-OES utilizado foi o Spectro, modelo Arcos com visão radial (SOP). O equipamento possui sistema óptico selado e purgado com argônio, que permite a detecção e medição de comprimentos de ondas na faixa entre 130 a 770 nm, possibilitando a análise de elementos que apresentam emissão atômica em baixos comprimentos de onda. A Figura 23 ilustra o equipamento utilizado.

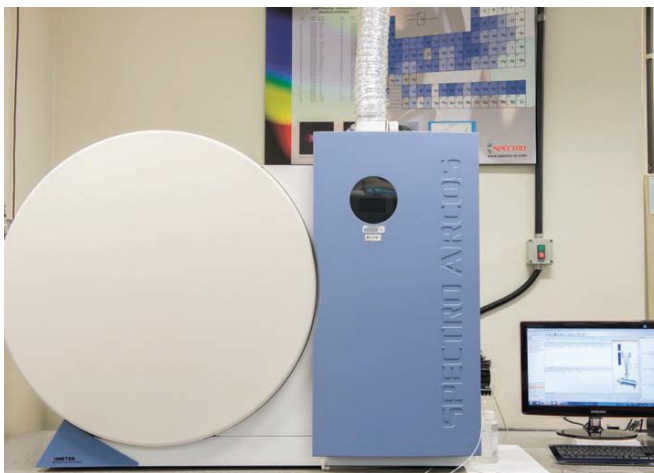


Figura 23 – Espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado. Fonte: Central analítica do IQ-USP.

## **CAPÍTULO 4**

### **Fundamentação teórica dos métodos**

Neste capítulo serão fornecidos embasamentos teóricos para uma melhor compreensão sobre as técnicas utilizadas neste trabalho.

# **4**

**4.1 Espectroscopia FTIR**

**4.2 Espectroscopia UV-Vis**

**4.3 TGA**

**4.4 CLAE**

**4.5 Espectrometria de Emissão Óptica com plasma**



## 4.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) é muito usada para investigar a composição de uma amostra, muito utilizada também nas áreas de síntese e transformações orgânicas. O espectro IV corresponde, aproximadamente, à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. As regiões espectrais do IV são IV próximo ( $12800$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ), IV médio ( $4000$  a  $200\text{ cm}^{-1}$ ) e IV longínquo ( $200$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ ) em vácuo (SHEPPARD, 1985).

As moléculas sofrem vibrações e movimentos de translação e rotação. Quando um feixe de radiação IV é absorvido por uma molécula a energia do feixe é convertida em energia vibracional. Para uma vibração apareça no espectro, a molécula precisa sofrer uma variação em seu momento dipolar durante essa vibração (LEVIN e BHARGAVA, 2005). O processo é quantizado, porém o espectro vibracional aparece como uma série de bandas, porque cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional (SKOOG, 2002). As vibrações moleculares podem ser classificadas em estiramentos e deformações angulares (Figura 24).

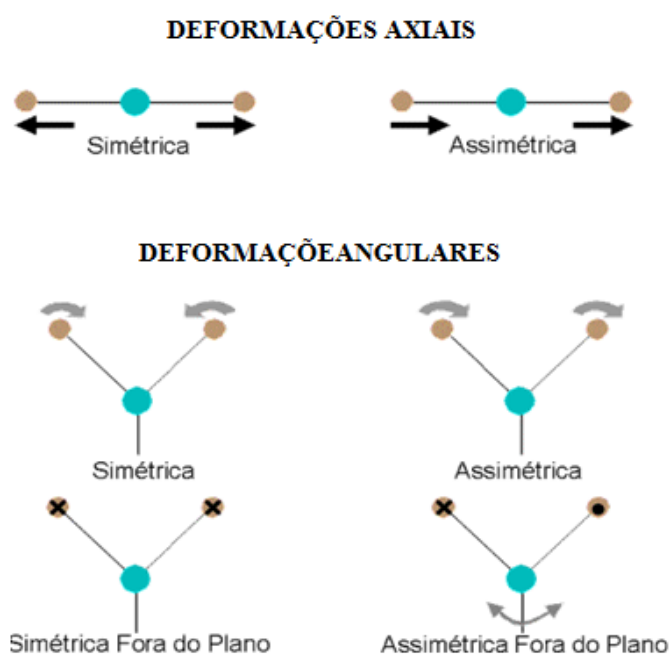


Figura 24 – Movimentos de vibração da molécula, deformações axiais e deformações angulares.

A espectroscopia com Transformada de Fourier baseia – se no interferômetro de Michelson (Figura 25), que consiste em uma fonte de radiação na região espectral do IV, um divisor de feixes, espelhos e um fotodetector.

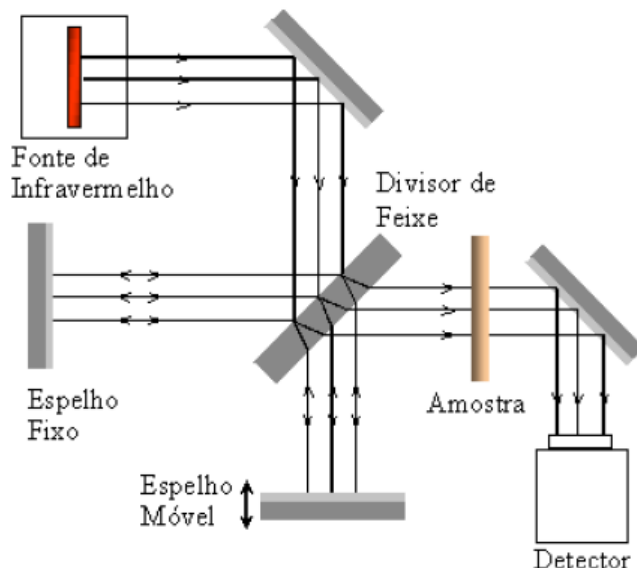


Figura 25 – Interferômetro de Michelson. Fonte: <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>

Em um equipamento FTIR o feixe de radiação é colimado e separado pelo divisor de feixes, uma parte do feixe é direcionada para um espelho fixo e a outra para um espelho móvel. Após a reflexão, os dois feixes que percorreram distâncias diferentes se encontram e sofrem interferência. A diferença dos caminhos percorridos pelo feixe é chamada de atraso, e o gráfico da intensidade em função do atraso é chamado interferograma (PERKINS, 1986). O espectro infravermelho é obtido a partir da transformada de Fourier do interferograma. Os espectrofotômetros FTIR são mais rápidos e mais baratos que os convencionais.

## 4.2 Espectroscopia na região do UV-Vis

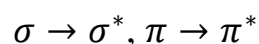
A espectroscopia de UV-Visível compreende a região de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 100 a 800 nm. Os átomos e moléculas absorvem energia emitida nesses comprimentos de onda e sofrem transições eletrônicas de seus elétrons de valência dos seus estados fundamentais a estados excitados. Desta forma cada transição eletrônica que ocorre resultará em uma absorção específica e característica (SILVERSTEIN *et. al.* 2006).

Os grupos cromóforos são grupos funcionais que possuem elétrons capazes de passar do estado fundamental para um estado energético excitado, quando esses elétrons retornam ao estado fundamental emitem um fóton luz equivalente a banda no espectro. Os elétrons de valência podem, geralmente, ser encontrado em um dos seguintes orbitais:

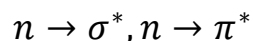
- Orbitais ligantes simples,  $\sigma$
- Orbitais ligantes  $\pi$  (duplas e triplas ligações)
- Orbitais não-ligantes (par isolado de elétrons)

Quando a radiação UV-Vis é absorvida ocorre a transição dos elétrons desses orbitais para orbitais vazios, como  $\sigma^*$  ou  $\pi^*$ . Devido às restrições envolvendo simetria, apenas quatro transições permitidas são observadas (FARIAS, 2009) :

- Elétrons não ligantes para orbitais antiligantes de mesma simetria:



- Elétrons de orbitais atômicos para orbitais moleculares antiligantes:



Através da Lei de Lambert Beer (SKOOG *et. al.* 2008) é possível avaliar a concentração de uma solução por meio de qualquer banda presente no espectro da mesma, já que a concentração da espécie está diretamente relacionada com a absorvância:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Em que A é a absorvância,  $I_0$  é a intensidade do feixe incidente, I a intensidade do feixe transmitido, c é a concentração da solução, l é o caminho óptico e  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar.

## 4.3 Termogravimetria

As análises térmicas podem ser definidas como um conjunto de técnicas nas quais se acompanham as variações em uma propriedade física de uma amostra e/ou de seus produtos de reação, enquanto a mesma é submetida a uma programação de temperatura (MACKENZIE, 1979).

As técnicas de análises térmicas permitem determinar a entalpia, a capacidade calorífica e a resistência térmica total ao fluxo calorífico, durante a decomposição térmica do material. Permitem também determinar a curva de decomposição térmica em função do tempo e/ou temperatura (KLERK, 1996).

### **Análise termogravimétrica (TGA)**

É a técnica termoanalítica que acompanha a perda e/ou ganho de massa da amostra em função do tempo ou temperatura (DENARI, 2012). Em uma análise termogravimétrica, a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta (IONASHIRO, 2004).

Utilizando dados obtidos nas análises termogravimétricas é possível obter parâmetros cinéticos a respeito do composto entre eles a energia de ativação, que pode ser obtida através de cálculos.

Três métodos termogravimétricos são normalmente utilizados para determinação de parâmetros cinéticos: termogravimetria isotérmica, na qual a perda de massa é analisada em função do tempo a uma temperatura constante, termogravimetria semi-isotérmica, na qual a amostra é aquecida em uma série de temperaturas diferentes e termogravimetria dinâmica na qual a amostra é submetida a uma rampa de aquecimento em diferentes taxas (FLYNN, 1966).

### **Cálculos energia de ativação**

Neste trabalho foram utilizados dois modelos de cálculos para determinação da energia de ativação da cianocobalamina o método Kissinger (ANALYTICAL CHEMISTRY, 1957) e o método Ozawa (CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, 1965). Foram desenvolvidos diversos modelos de cálculos para determinação dos parâmetros cinéticos de decomposição térmica. Todo estudo cinético descreve-se inicialmente pela equação básica de taxa de

conversão  $\alpha$  para degradação térmica em função da concentração de um dos reagentes  $g(\alpha)$  por meio da constante de velocidade  $k$ , à temperatura constante, assim:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k \cdot g(\alpha) \quad (2)$$

Então, introduz-se o efeito da temperatura pela equação de Arrhenius para determinação da constante  $k = A \exp(E/RT)$ , onde  $A$  é o fator pré-exponencial (1/sec),  $E$  é a energia de ativação (J/mol),  $R$  é a constante gases (8,314 J/mol.K) e  $T$  a temperatura de reação (K). Portanto, substituindo-se  $k$  na equação (1) e assumindo que  $g(\alpha)=(1-\alpha)^n$  (1), obtém-se:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A(1 - \alpha)^n \exp\left(\frac{E}{RT}\right) \quad (3)$$

Considerando a taxa de conversão  $\alpha$ , proporcional ao calor envolvido, e assumindo a dependência da temperatura com a equação de Arrhenius, a equação (3) torna-se base para métodos cinéticos dinâmicos que utilizam múltiplas varreduras como o método de Kissinger e Osawa.

Se a equação básica (2) é usada e uma taxa mínima de aquecimento  $\beta = \frac{dT}{dt}$  é empregada, pode ser mostrado que:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \left(\frac{A}{\beta}\right) \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) (1 - \alpha)^n \quad (4)$$

A taxa máxima ocorre quando  $\frac{d\alpha^2}{dT^2} = 0$ , a diferenciação da Equação 4 em relação a temperatura  $T$  e ajustada para zero, resultando em:

$$\frac{E}{RT_m^2 n (1 - \alpha_m)^{n-1}} = \frac{A}{\beta} \exp\left(\frac{-E}{RT_m}\right) \quad (5)$$

Onde,  $T_m$ ,  $H_m$ , e  $\alpha_m$  são a temperatura de pico, a altura do pico na curva DTG e o grau de conversão à temperatura de pico, respectivamente.

## Método Kissinger

Kissinger, assumiu que  $n(1 - \alpha)^{n-1}$  é independente da velocidade de aquecimento  $\beta = \frac{dT}{dt}$  e muito próximo a unidade para reação de primeira ordem (KIM E OH, 2005). Assim, a partir da derivada da Equação (4) obtém-se a equação a seguir:

$$\frac{d\left\{\ln\left(\frac{\beta}{T_m^2}\right)\right\}}{d\left(\frac{1}{T_m}\right)} = \frac{-E}{R} \quad (6)$$

Assim, o valor da energia de ativação,  $E$ , é obtido a partir do gráfico  $\ln\left(\frac{\beta}{T_m^2}\right)$  versus  $\frac{1}{T_m}$  para uma série de taxas de aquecimento diferentes,  $\beta$ , onde  $\frac{-E}{R}$  corresponde a inclinação da reta.

## Método Osawa

Este método determina a energia de ativação,  $E$ , diretamente a partir de dados de perda de peso e temperatura obtidos a várias taxas de aquecimento (KIM e OH, 2005). A técnica assume que  $A$ ,  $(1 - \alpha)^n$ , e  $E$  são independentes de  $T$ , enquanto  $A$  e  $E$  são independentes de  $\alpha$ . Da Equação 4.3, pode ser mostrado que:

$$\frac{d\alpha}{(1-\alpha)^n} = \frac{A}{\beta} \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) dT \quad (7)$$

Em que, da integração, segue a seguinte expressão:

$$F(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{(1-\alpha)^n} = \frac{A}{\beta} \int_{T_o}^T \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) dT \quad (8)$$

As variáveis dadas pela Equação 8 podem ser separadas e integradas para dar, em forma de logaritmo a equação a seguir:

$$\log F(\alpha) = \log\left(\frac{AE}{R}\right) - \log\beta + \log p\left(\frac{E}{RT}\right) \quad (9)$$

Utilizando a aproximação de Doyle's para integral, o que permite  $\frac{E}{RT} > 20$ , a Equação (9) pode ser expressa como:

$$\log F(\alpha) = \log\left(\frac{AE}{R}\right) - \log\beta - 2,315 - 0,4567 \frac{E}{RT} \quad (10)$$

A energia de ativação, E, pode então ser obtida a partir de um gráfico de  $\log\beta$  versus  $\frac{1}{T}$  para um grau de conversão fixo porque a inclinação de tal linha é dada por  $-0,4567\frac{E}{R}$ .

#### **4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação, identificação e quantificação de compostos químicos em solução (HAYES *et al.*, 2014). Na CLAE a separação de misturas é realizada pela distribuição de seus componentes em uma fase estacionária e uma fase móvel através de interações químicas e físicas.

O equipamento de HPLC consiste de uma bomba que movimenta a fase móvel e a amostra através de uma coluna que contém a fase estacionária e um detector que mostra os tempos de retenção de cada componente da amostra com as fases móvel e estacionária de acordo com as interações da amostra com essas fases (MALVIYA *et al.*, 2010). A cromatografia pode ser classificada por polaridade da fase estacionária, na cromatografia em fase normal a fase estacionária é polar (ex: sílica gel), já na cromatografia em fase reversa a fase estacionária possui baixa polaridade (ex: sílica ligada a C18). O cromatografia em fase normal é aplicável em análise de substâncias insolúveis em água, por exemplo, já a cromatografia em fase reversa permite análise de substância hidrossolúveis e/ou iônicas até substância lipofílica.

Muitos tipos de detectores são utilizados em CLAE como detector espectrofotométrico UV – Vis, detector por índice de refração, detector por fluorescência, detector eletroquímico. Neste trabalho foi utilizado o detector por espectrofotométrico UV – Vis que baseia-se na absorvância de luz por parte da amostra (COLLINS e GUIMARÃES, 1988).

#### **4.5 Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado (ICPOES)**

É uma técnica baseada na medida da intensidade da radiação emitida, quando um átomo ou íon excitado retorna ao seu estado fundamental. Esta técnica utiliza o plasma de argônio (uma nuvem de gás parcialmente ionizada e com elevada temperatura). As fontes de plasma operam com elevada temperatura (7000-15000 K) e alta densidade eletrônica ( $1 - 3 \times 10^{15}$  e /  $\text{cm}^3$ ). Nessas temperaturas, em que normalmente operam as fontes de ICP, há energia suficiente para dissociação de compostos com elevada energia de dissociação, gerando os átomos e íons necessários para que ocorram transições eletrônicas. A produção de

espectro se dá pela nebulização da amostra em solução no interior do plasma, que é sustentado por um campo magnético.



## Referências Capítulo 4

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 1988, p 179 - 243.

DENARI, G.B. Princípios e Aplicações de Análise Térmica. Instituto de Química, USP, São Carlos, 2012.

FARIAS, R. F. De. Química de Coordenação - Fundamentos e Atualidades -. *Editora Átomo*, v. 2a ed, 2009.

FLYNN, J. H. & WALL, L. A.- J. Res. Natl. Bur. Stand., 70A, p.487, 1966

HAYES, R.; AHMED, A.; EDGE, T.; ZHANG, H. Coreshell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 3652, 2014

IONASHIRO, M. Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial. Araraquara: Giz Editorial, 2004.

KIM H. T., OH, S. C. Kinetics of Thermal Degradation of Waste Polypropylene and High density Polyethylene. **J. Ind. Chem.**, v 11, n 5, p. 648-656, 2005.

KLERK WP Thermal Analysis of some Propellants and explosives with DSC and TG/DTA 1996

LEVIN, I. W. e BHARGAVA, R. Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: integrating microscopy and molecular recognition. **Annual review of physical chemistry**, v. 56, n. 1, p. 429–74, 2005.

MACKENZIE, R. C. De calore: Prelude to thermal analysis. **Thermochemica Acta**, v. 73, p. 251-306, 1979.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, p. 2226, 2010

PERKINS, W. D. Fourier Transform- infrared spectroscopy. **Journal of Chemical Education**, 63, (1), 1986.

SILVERSTEIN, ROBERT M.; WEBSTER, FRANCIS X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. *Saraiva*, v. Sétima Edição, n. LTC, 2006.

SHEPPARD, H. A. WILLIS e I. C. **Rigg, Pure & Appl. Chem.**, 57 119851, 105.

SKOOG, DOUGLA A., HOLLER, F. JAMES, NIEMAN, T. A. A. Princípios de Análise Instrumental. *Thomson*, v. 5a Edição., p. São Paulo – SP, 200

## **CAPÍTULO 5**

### **Resultados e discussão**

Neste capítulo serão demonstrados e discutidos os resultados obtidos através das análises realizadas por espectrometria de massa mostrando a presença do conjugado. Nas análises espectroscópicas FTIR e UV-Vis será possível notar no espectro do conjugado a presença de bandas presentes também nos espectros dos compostos isolados. Poderá ser visto também pela cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE a ordem de eluição dos compostos presentes no conjugado. E finalmente será demonstrada a liberação do conjugado.

# **5**

### **5.1 Espectrometria de massa**

### **5.2 Espectroscopia FTIR**

### **5.3 Espectroscopia UV-Vis**

### **5.4 TGA**

### **5.5 CLAE**

### **5.6 Liberação do Conjugado**

## 5.1 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi realizada para identificar a formação do conjugado CbI-BFA por meio de medição de massa. A Figura 26 esquematiza a fragmentação do conjugado CbI-BFA. A presença do conjugado M+H pode ser observado em 1565,37 m/Z. Observa-se ao mesmo tempo como impureza a CbI em M+H em 1356,58 m/Z.

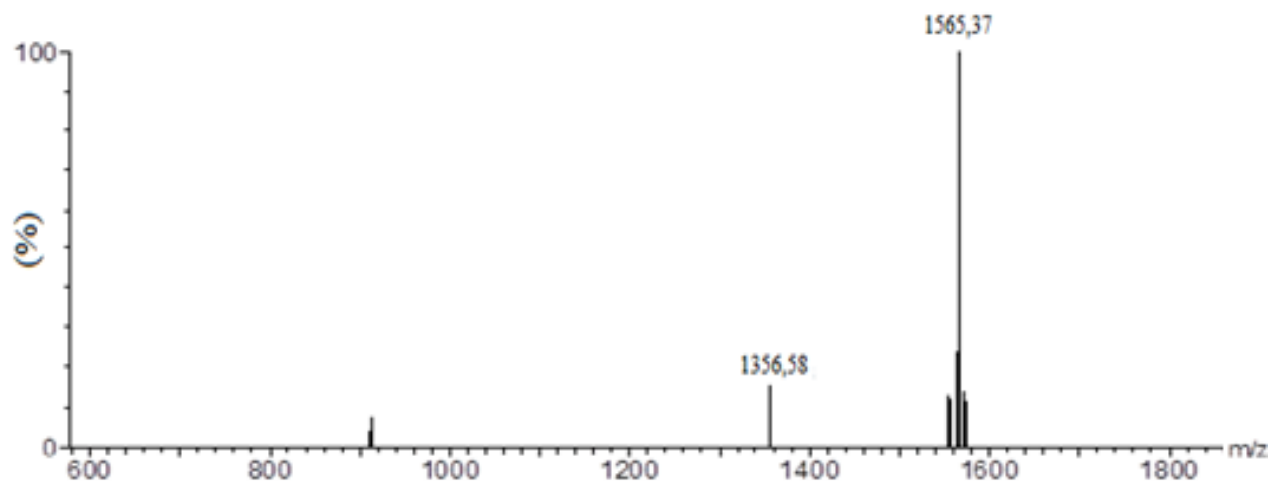


Figura 26 - Espectrometria de massas do conjugado CbI-BFA.

A partir dos resultados obtidos na espectrometria de massa foi possível constatar a formação do conjugado CbI-BFA como previsto em teoria.

## 5.2 Espectros FTIR

Através dos espectros obtidos na região do infravermelho por Transformada de Fourier realizada em todas as etapas da síntese, foi possível a verificação de mudança de grupos funcionais referentes a cada etapa como previsto em teoria.

A Figura 27 mostra os espectros de absorção para o PGLD<sub>G4</sub> e para o PGLD<sub>G4</sub> após a oxidação com periodado de potássio.

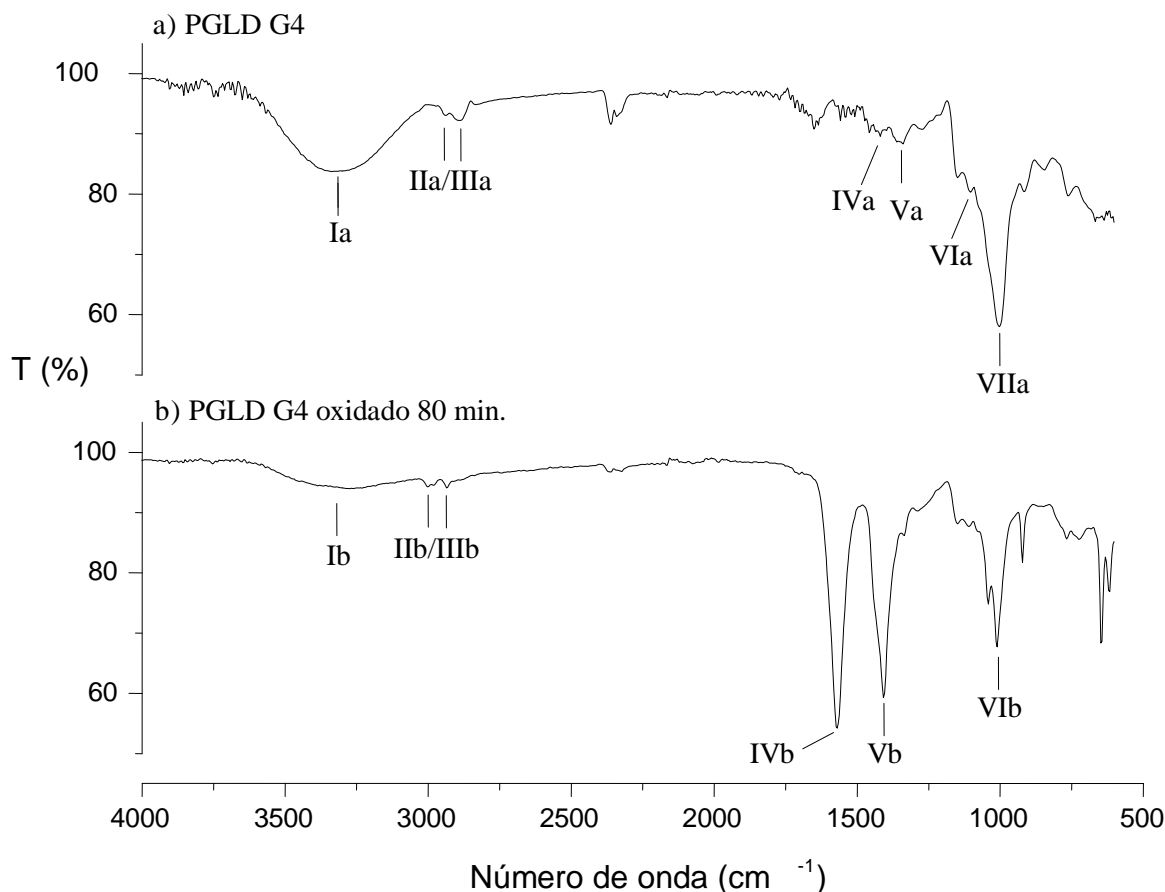


Figura 27- Espectros FTIR. a) PGLD<sub>G4</sub>; b) produto de oxidação do PGLD<sub>G4</sub>.

Pode-se verificar que ocorreu mudança na intensidade da banda referente à hidroxila após a oxidação e também o surgimento de novas bandas. O espectro demonstra que ocorreu mudança de função da hidroxila após a oxidação do PGLD<sub>G4</sub>.

As Tabelas 2 e 3 mostram as bandas presentes nos dendrímeros PGLD<sub>G4</sub> e PGLD<sub>G4</sub> oxidado, respectivamente:

Tabela 2 - Bandas presentes nos dendrímeros PGLD<sub>G4</sub>

	<b>Banda</b>	<b>Grupos</b>
<b>Ia</b>	3330	Estiramento O-H
<b>IIa/IIIa</b>	2935/2890	Vibração assimétrica CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>IVa</b>	1415	Deformação angular de CH <sub>2</sub>
<b>Va</b>	1338	Estiramento e deformação axial C-O
<b>VIa</b>	1108	Estiramento C-C
<b>VIIa</b>	1006	Estiramento C-O de éter

As bandas presentes no espectro obtido na região do infravermelho para o PGLD<sub>G4</sub> assemelham-se às encontradas na literatura, MILITÃO (2013), para o mesmo composto.

Tabela 3 - Bandas PLGD<sub>G4</sub> oxidado

	<b>Banda</b>	<b>Grupos</b>
<b>Ib</b>	3305	Estiramento O-H
<b>IIIb/IIIb</b>	2997/2931	Vibração assimétrica CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
<b>IVb</b>	1570	Estiramento O-H aldeído
<b>Vb</b>	1408	Deformação angular de CH <sub>2</sub>
<b>VIb</b>	1342	Estiramento e deformação axial C-O

Após a oxidação do PGLD<sub>G4</sub> é possível notar algumas mudanças no espectro como o aparecimento de uma banda em 1570 cm<sup>-1</sup>, possivelmente referente à ligação dupla carbono e oxigênio do grupo aldeído. Nota-se, também, a diminuição na intensidade da banda na região 3305 cm<sup>-1</sup>, referente à ligação da hidroxila, comparando-a com o espectro do PGLD<sub>G4</sub>, essa diminuição pode ter ocorrido devido à oxidação do grupo álcool a aldeído.

A Figura 28 mostra o espectro FTIR para a CbI pura, que poderá ser comparada mais adiante com o espectro FTIR do conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>.

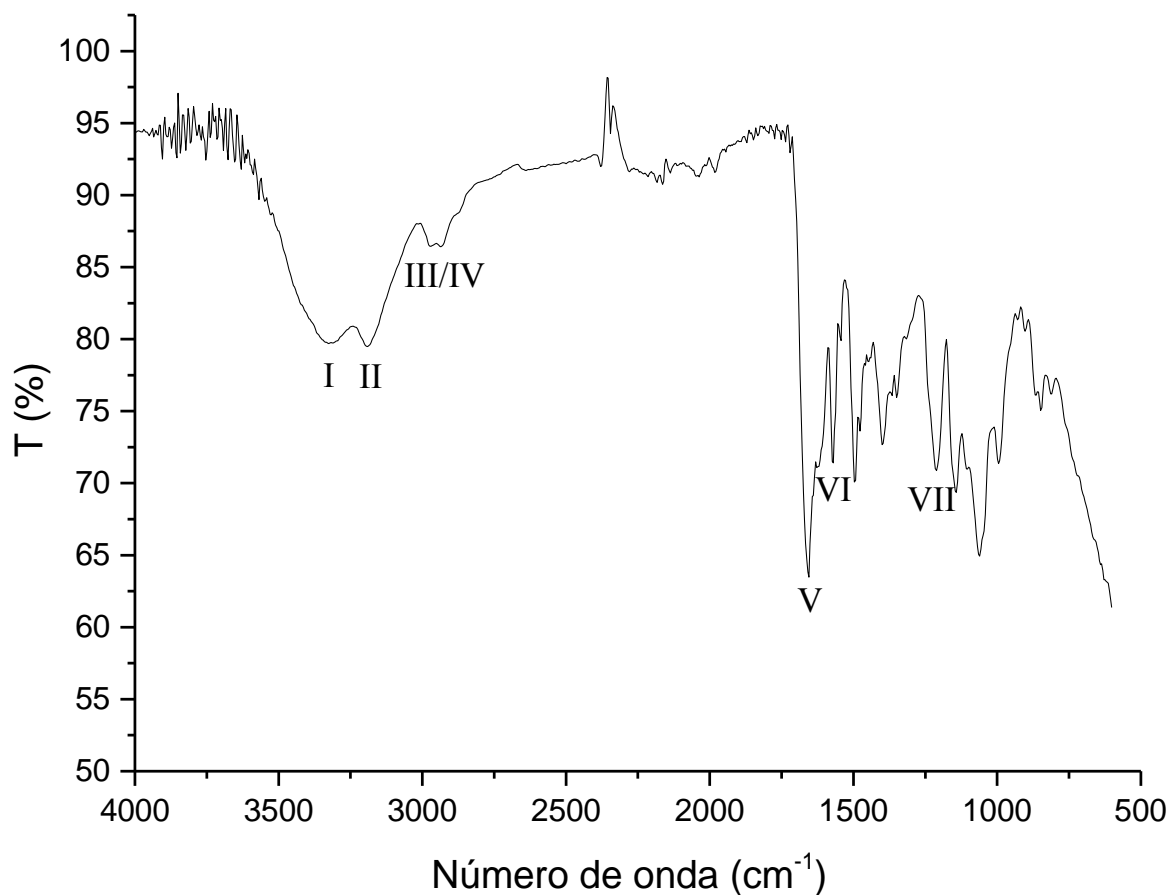


Figura 28 - Espectro FTIR para a CbI pura

A Tabela 4 mostra as bandas de absorção para a CbI.

Tabela 4 bandas de absorção para a CbI

	<b>Banda</b>	<b>Grupos</b>
<b>I</b>	3330	Estiramento O-H
<b>II</b>	3190	Estiramento N-H
<b>III /IV</b>	2970/2930	Estiramento C-H
<b>V</b>	1655	Estiramento C=O grupo amida*
<b>VI</b>	1573	C=C
<b>VII</b>	1215	Estiramento P=O

\*Observa-se um ombro nesta banda que corresponde a deformação angular de NH<sub>2</sub>.

Através do espectro obtido foi possível comprovar a presença das principais bandas de absorção presentes na CbI apresentado nas referências GUOZ. et. al, (2005) e STANDARINFRARED PRIM SPECTRA(1961).

A Figura 29 mostra o espectro FTIR para a borofenilalanina (BFA).

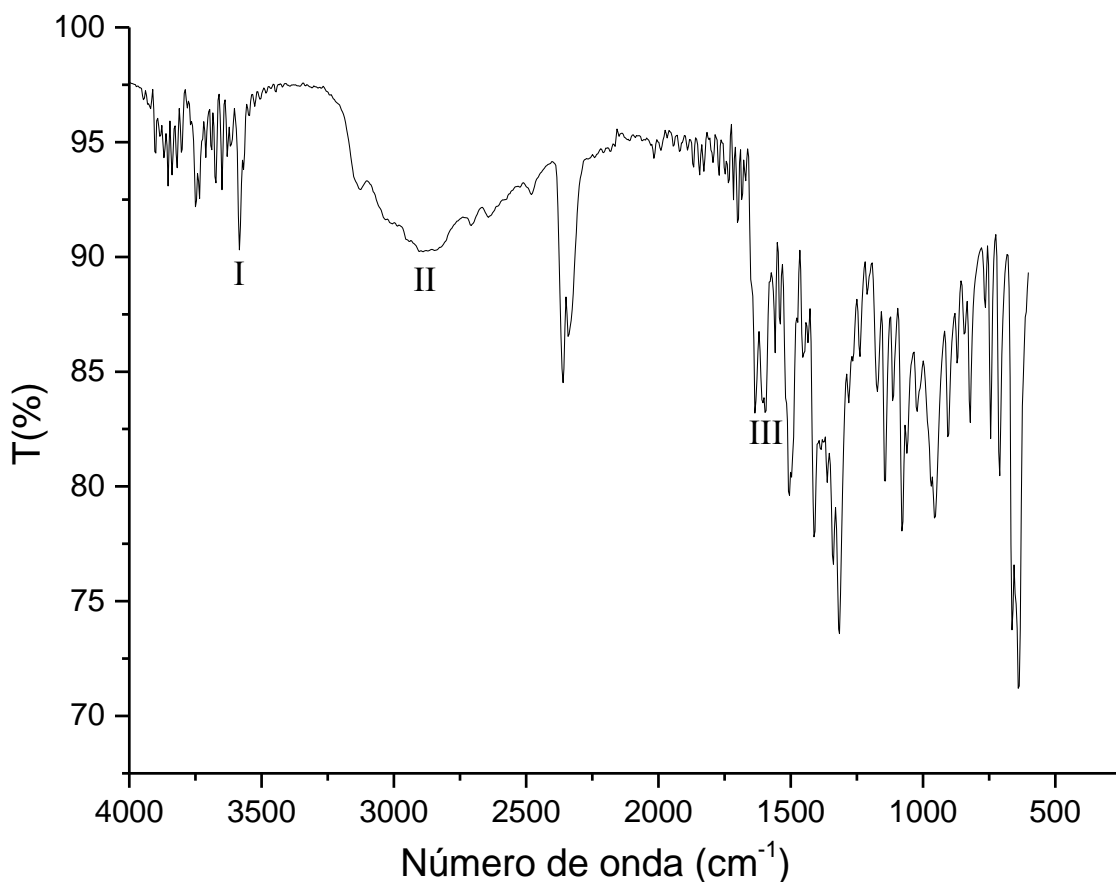


Figura 29- Espectro FTIR do BFA

A Tabela 5 apresenta as principais bandas de absorção do no espectro BFA:

Tabela 5 bandas de absorção do BFA

	<b>Banda</b>	<b>Grupos</b>
<b>I</b>	3583	Estiramento O-H dímeros
<b>II</b>	2906	Estiramento N-H
<b>III</b>	1908	C=O de ácido carboxílico

As bandas obtidas são iguais as apresentadas na referência TOMIYASU, H *et. al* (1999).

A Figura 30 mostrado o produto final da síntese o conjugado CbI-BFA.

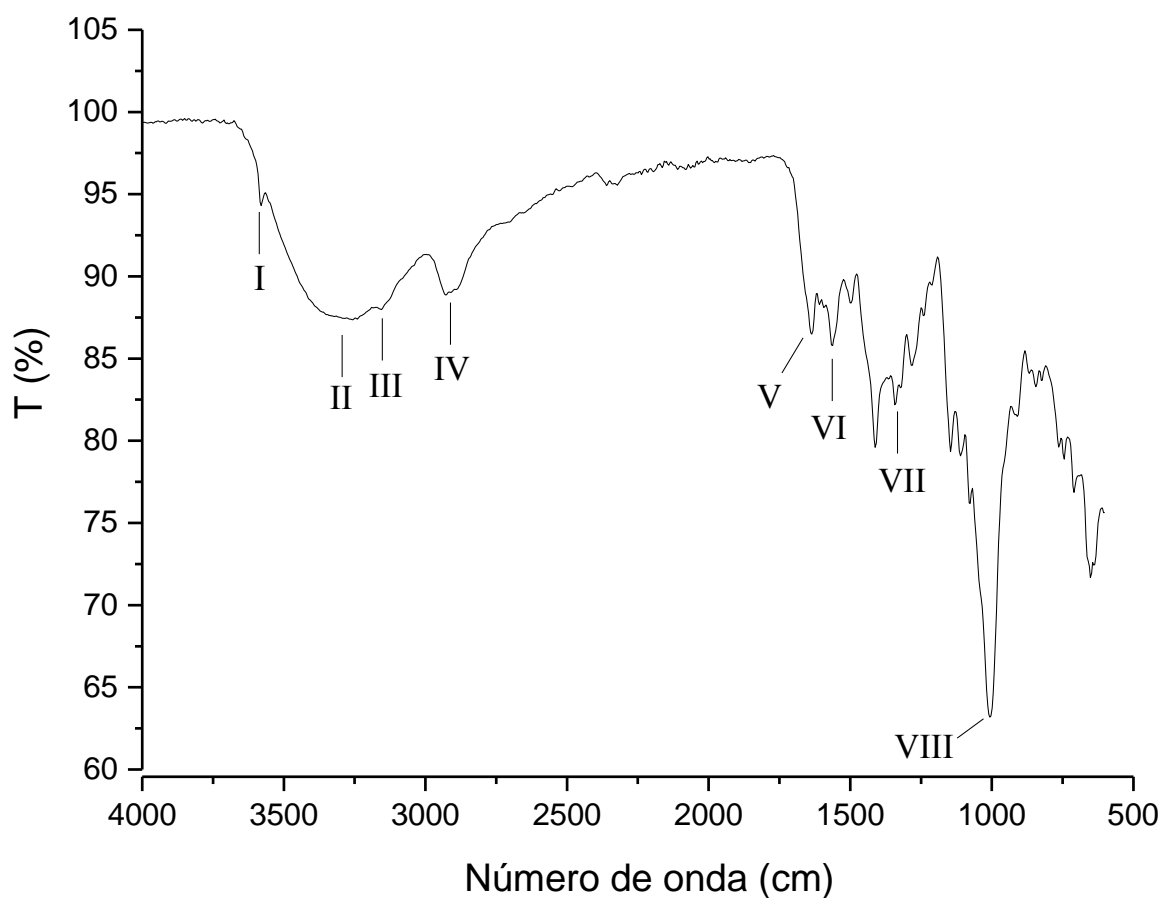


Figura 30 - Produto final conjugado CbI-BFA/PGLD

Tabela 6 mostra as bandas de absorção do conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>.

Tabela 6 - Bandas de absorção do conjugado CbI

	<b>Banda</b>	<b>Grupos</b>
<b>I</b>	3583	Estiramento O-H ligações diméricas
<b>II</b>	3290	Estiramento O-H
<b>III</b>	3155	Estiramento N-H
<b>IV</b>	2930	C-H de alifáticos, CH <sub>3</sub> e CH <sub>2</sub>
<b>V</b>	1640	C=O de amida
<b>VI</b>	1562	Deformação angular grupo amina
<b>VII</b>	1338	Estiramento e deformação axial C-O
<b>VIII</b>	1006	Estiramento C-O éter



Possivelmente a banda em  $3583\text{ cm}^{-1}$  pertence ao dímero OH ligado ao boro no composto BFA, ocorre também uma banda em  $1562\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo amina presente no composto BFA. As bandas  $3290\text{ cm}^{-1}$ ,  $3155\text{ cm}^{-1}$ ,  $1640\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento O-H, N-H e carbonila do grupo amida respectivamente podem ser atribuídas a cianocobalamina.

### 5.3 Espectroscopia eletrônica UV-Vis

A espectrometria na região do UV-Vis foi utilizada para determinação dos picos de máxima absorção do PGLD<sub>G4</sub>, CbI, BFA e do conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>.

#### 5.3.1 UV-Vis PGLD<sub>G4</sub>

A Figura 31 mostra o espectro de absorção no UV-Vis para o PGLD<sub>G4</sub> na concentração 0,10M.

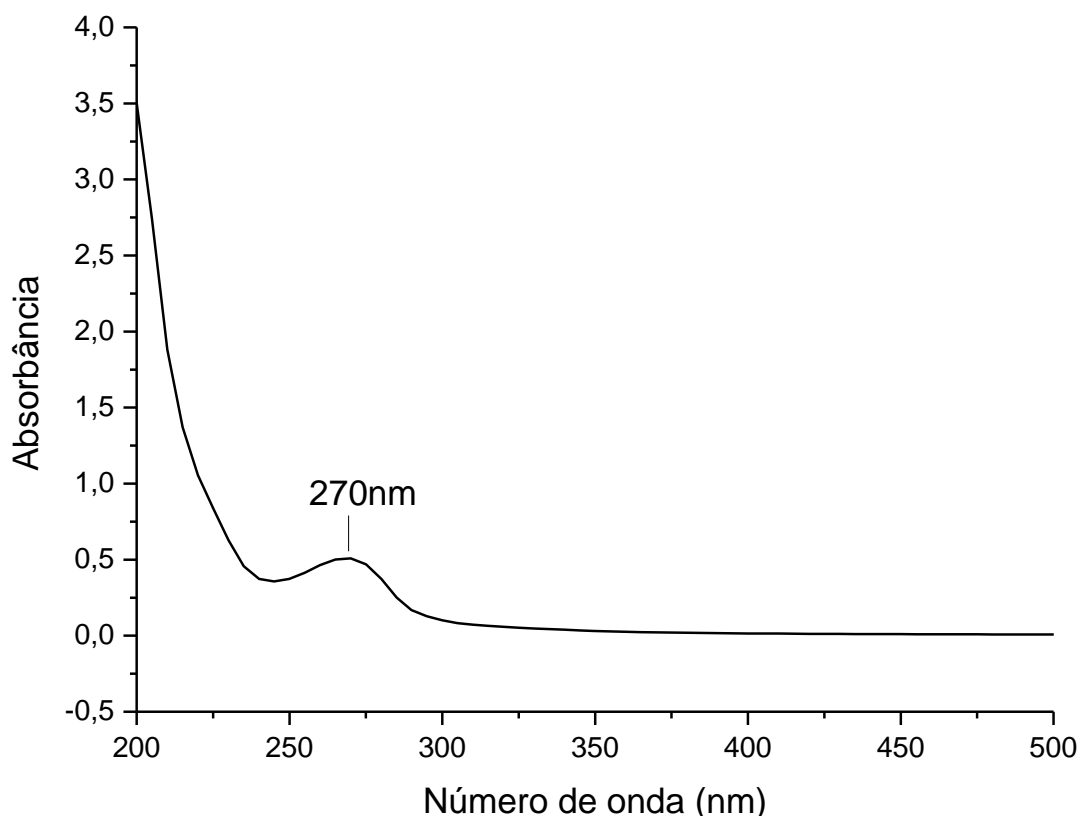


Figura 31- Espectro de absorção UV-Vis PGLD<sub>G4</sub>

O espectro revela que o dendrímero PGLD G<sub>4</sub>exibe banda de absorção na região do espectro UV-Vis, referente aos grupos O-H-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-C-, e está de acordo com o encontrado em MILITÃO(2013).

### 5.3.2 UV-Vis CbI

A Figura 32 mostra os espectro UV-Vis da CbI.

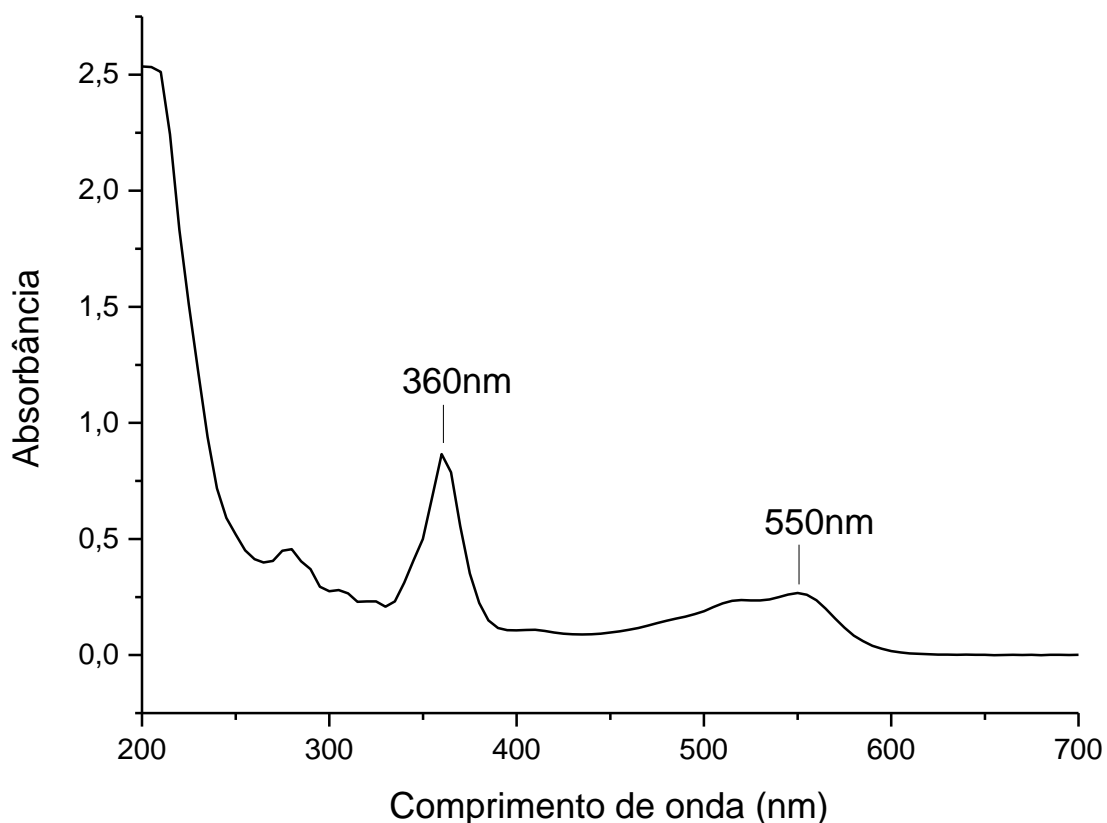


Figura 32- Espectro de absorção UV-Vis CbI

Através do espectro podem-se notar os picos mais distintos em 360 e 550 nm, na região do UV próximo e do visível, são conhecidas como bandas  $\gamma$  e  $\alpha$  respectivamente, as bandas nesses comprimentos de onda são atribuídas à absorção eletrônica do anel corrina e são associadas com a transição eletrônica permitida  $\pi \rightarrow \pi^*$ . As bandas são as mesmas encontradas em espectroscopia molecular.

### 5.3.3 UV-Vis BFA

A Figura 33 mostra o espectro UV-Vis do BFA.

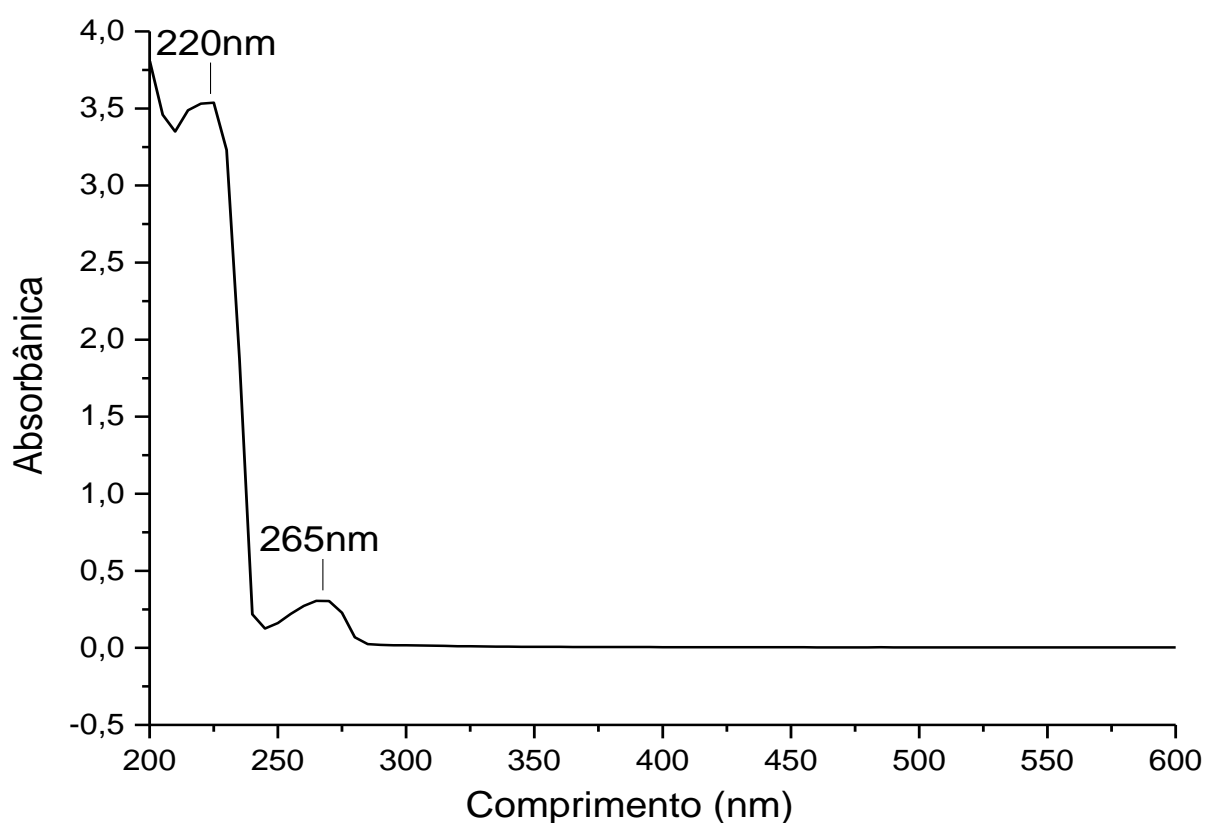


Figura 33 - Espectro de absorção UV-Vis BFA

O espectro UV-Vis mostra duas bandas de absorção em 220 e 265 nm. A primeira banda é referente à transição  $n \rightarrow \sigma^*$  (onde  $n$  é o orbital HOMO e  $\sigma$  é o orbital LUMO) do grupo OH. A banda é referente ao grupo carboxílico presente no BFA.

### 5.3.4 UV-Vis Conjugado CbI-BFA/PGLDG<sub>4</sub>

A Figura 34 mostra os espectro UV-Vis do conjugado CbI-BFA/PGLDG<sub>4</sub>.

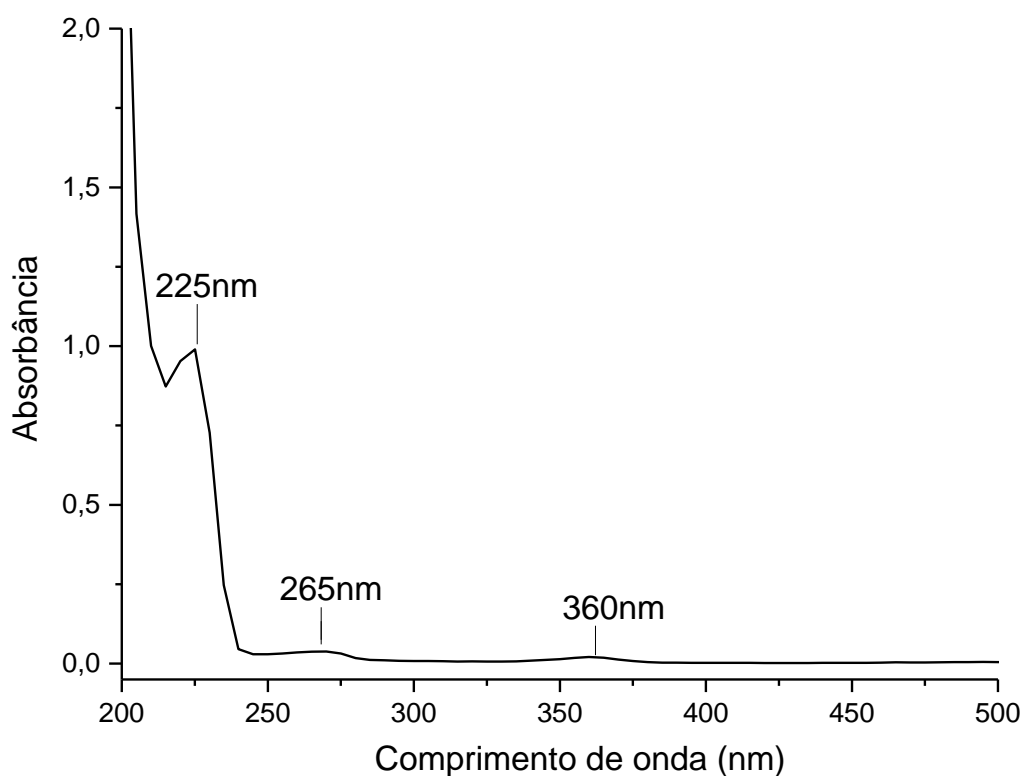


Figura 34- Espectro de absorção UV-Vis Conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>

Pode-se notar a partir do espectro UV-Vis do conjugado três bandas distintas, que estão possivelmente relacionados aos três constituintes que formam o conjugado.

A Tabela 7 mostra à quais compostos as bandas de absorção do espectro do conjugado podem estar relacionadas.

Tabela 7- Comparação bandas de absorção do espectro do conjugado com os espectros de PGLD, CbI e BFA.

<b>Conjugado (nm)</b>	<b>BPA (nm)</b>	<b>CbI (nm)</b>	<b>PGLD(nm)</b>
<b>225</b>	220	-	-
<b>265</b>	265	-	270
<b>360</b>	-	360	-

A Figura 35 abaixo mostra a sobreposição das bandas do conjugado PGLD-CbI-BPA com cada um dos compostos.

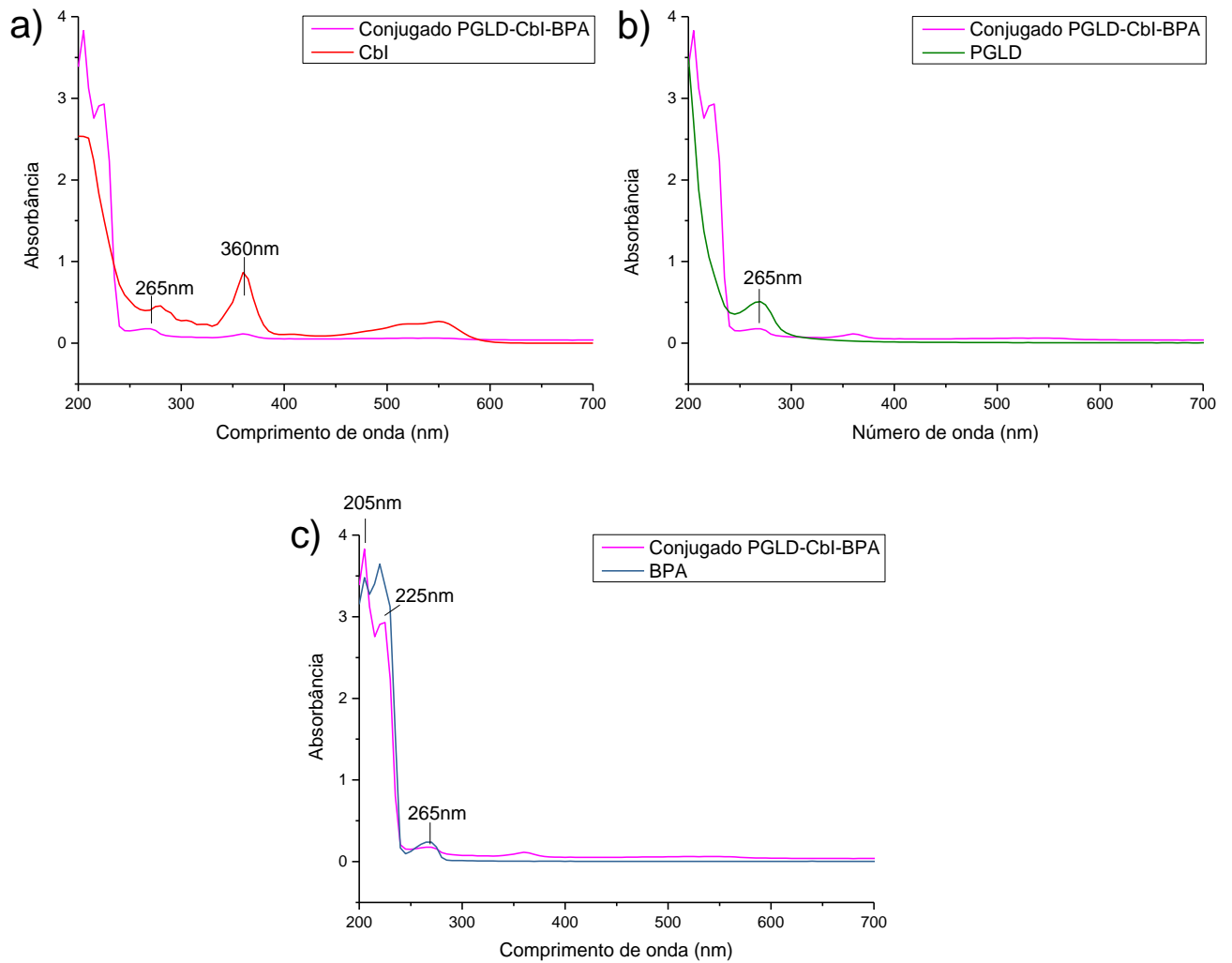


Figura 35 – Sobreposição das bandas do conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> com a) CbI, b) PGLD, c) BFA

## 5.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A caracterização termogravimétrica revela o comportamento de perda de massa com o aumento da temperatura. Foram realizadas as análises termogravimétricas a fim de determinar a estabilidade do conjugado PGLD-CbI-BFA. As estabilidades térmicas dos constituintes do conjugado foram realizadas a nível de comparação. Também foram calculadas as energias de ativação a partir do método Kissinger e do método Osawa.

Todas as análises foram realizadas em cadinho de platina aberto, com as razões de aquecimento de 5, 10, 20 e 30°Cmin<sup>-1</sup> de 20°C até 800°C sob vazão de nitrogênio 25 mLmin<sup>-1</sup>.

### 5.4.1 TGA PGLD<sub>G4</sub>

#### Perda de massa

A Figura 36 mostra a curva TGA referente à perda de massa do PGLD<sub>G4</sub> e também a curva DTG que mostra a temperatura em que a velocidade de reação foi máxima para razão de aquecimento 30°C min<sup>-1</sup>.

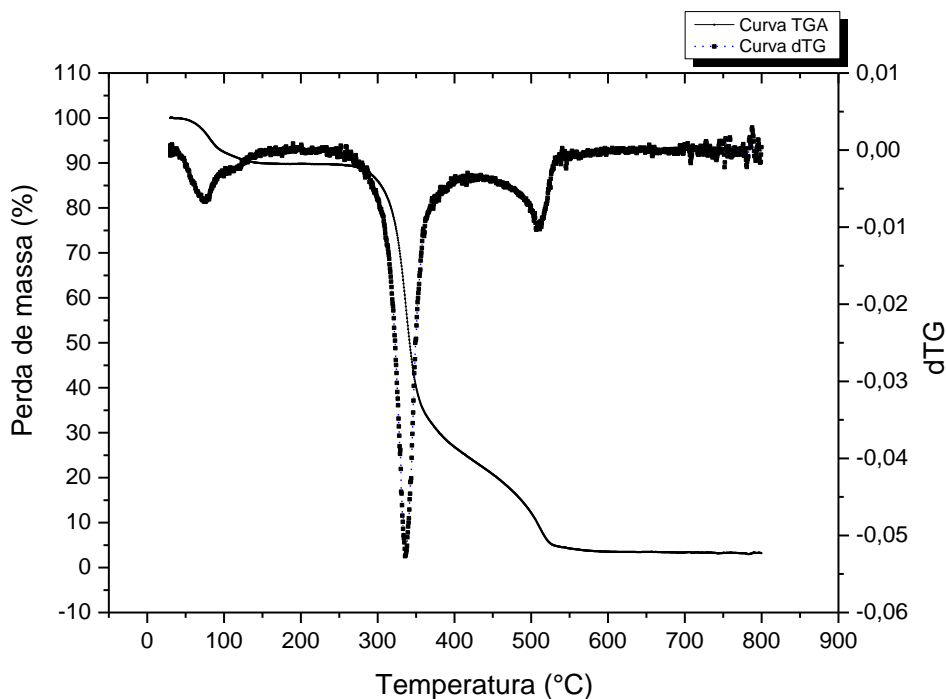


Figura 36 - Curva TGA e dTG para o PGLD<sub>G4</sub> para razão de 30°C min<sup>-1</sup>.

A curva TGA mostra uma primeira perda de massa de aproximadamente 10% entre 25°C a 120°C possivelmente referente à perda de água (aprisionada ou ligada). Observa-se

então, que o dendrímero é estável até aproximadamente 270°C quando se inicia um segundo *on set* entre aproximadamente 275°C até 370° C, com perda de massa de aproximadamente 70% da massa total, provavelmente referente a condensação das hidroxilas primárias presentes no dendrímero. Um terceiro *on set* se inicia em 370°C até 540°C pode estar relacionado com a pirólise do dendrímero com formação de moléculas de baixo peso molecular. O resíduo de 3% pode ser devido a formação parcial de carbono elementar durante a segunda etapa de decomposição. As curvas estão de acordo com as encontradas para o PGLD<sub>G4</sub> em MILITÃO (2013).

## 5.4.2 Cianocobalamina

### Perda de massa

A Figura 37 mostra a curva TGA referente à perda de massa da CbI e também a curva DTG para razão de aquecimento 10° C min<sup>-1</sup>.

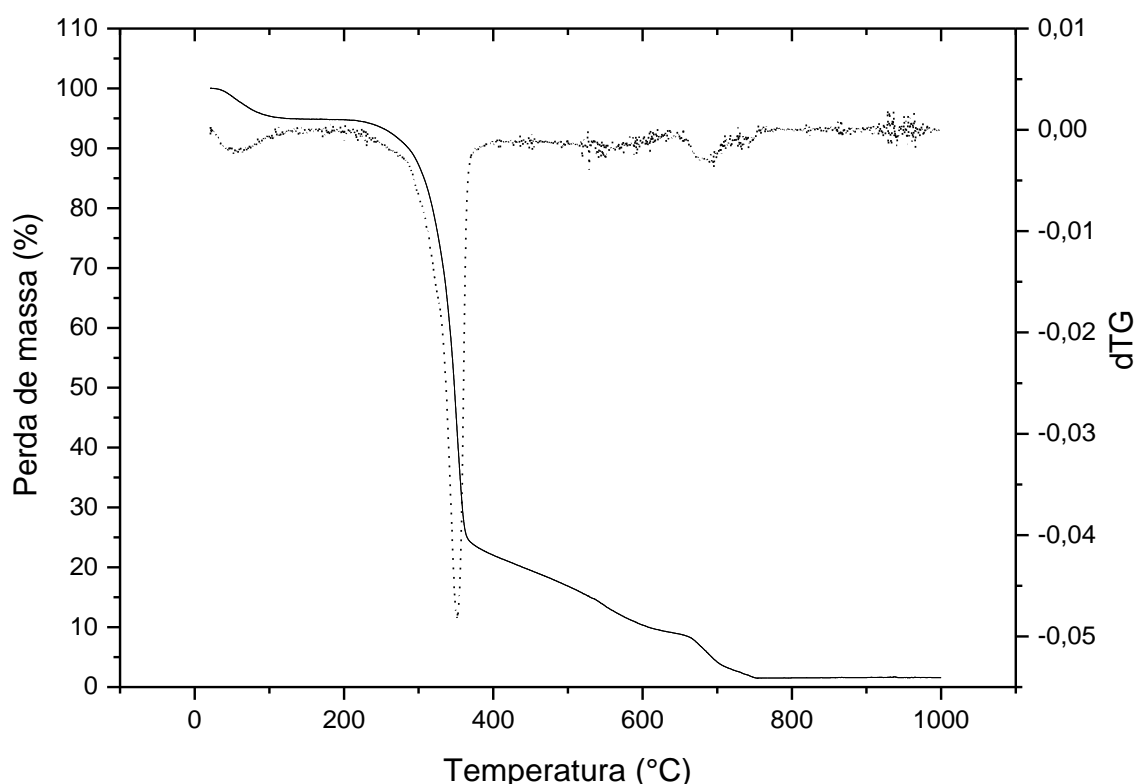


Figura 37- Curva TGA e dTG para CbI para razão de 10°C min<sup>-1</sup>

As curvas termogravimétricas exibem uma perda aproximada de 5% da massa total no intervalo de 25 a 100°C que corresponde provavelmente à perda de água. A cianocobalamina

se mantém estável até aproximadamente 219°C quando se inicia a degradação (*on set*) até 330°C, cerca de 70% da massa total. Observa-se um segundo intervalo de perda de massa por volta de 520°C, cerca de 98% da massa total, a partir dessa temperatura não houve mais perda de massa. Para a cianocobalamina a perda térmica de massa está associada à remoção dos grupos cianetos e amida, ambos atuando como um forte estabilizador da estrutura da cianocobalamina.

Pode-se visualizar a partir da curva dTG a temperatura em que a velocidade da reação foi máxima, representada pelo pico. Os valores da temperatura em cada pico foram 321°C, 352°C, razão de aquecimento 10°C min<sup>-1</sup> respectivamente.

### 5.4.3 Borofenilalanina

#### Perda de massa

A Figura 38 mostra a curva TGA referente à perda de massa do BFA e também a curva dTG que mostra a temperatura em que a velocidade de reação foi máxima.

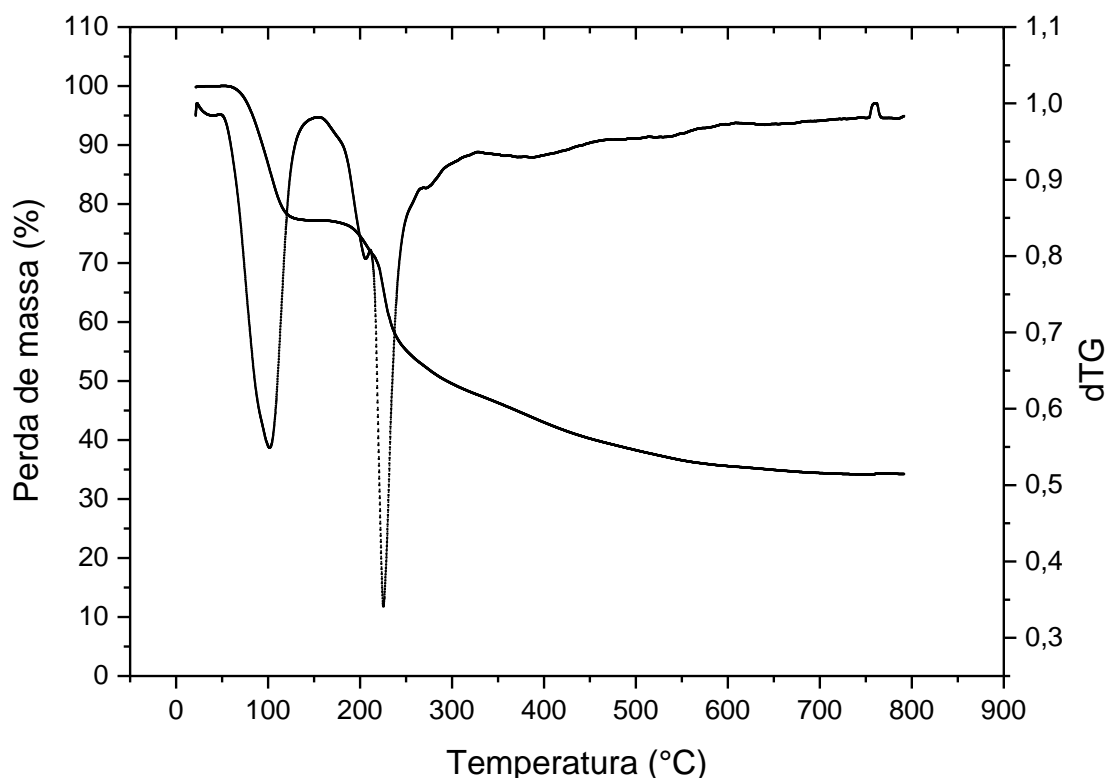


Figura 38 - Curva TGA e dTG para BFA para razão de 10°C min<sup>-1</sup>.

A curva TGA mostra a primeira perda de massa do BFA de 20% da massa total no intervalo de 27°C até 145°C que possivelmente corresponde a perda de água. A massa de



BFA se mantém estável até 200°C quando se inicia uma nova degradação (*on set*) até 774°C com perda de 64% da massa total. Através das curvas dTG pode – se observar que a temperatura máxima de degradação ocorreu em 235° C para a razão de aquecimento 10°C min<sup>-1</sup>.

#### 5.4.4 Conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>

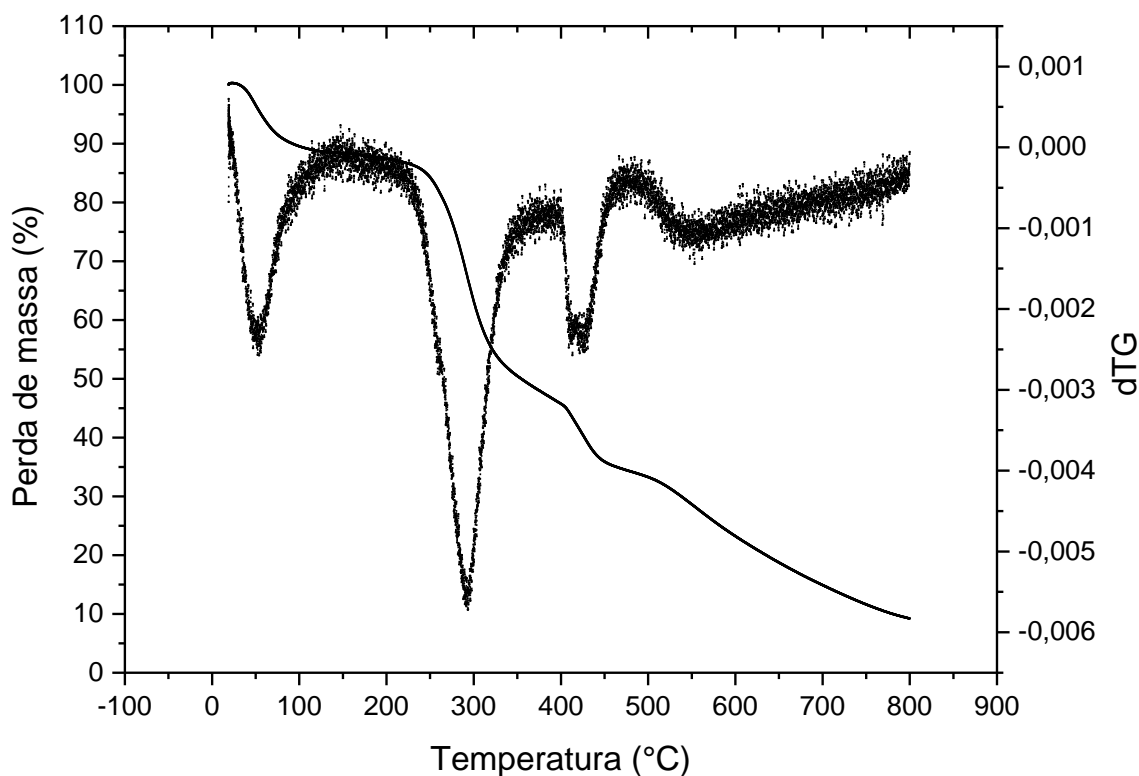


Figura 39- Curva TGA e dTG para o conjugada CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> na razão de aquecimento 10°C min<sup>-1</sup>

Pode-se observar através da curva TGA, que a primeira perda de massa ocorre entre 30°C a 120°C com perda de massa de aproximadamente 10% da massa total, muito provavelmente nesta etapa ocorreu perda de água (ligada ou aprisionada nas cavidades do dendrímero). Um segundo *on set* ocorre a partir de 230° C, com uma máxima velocidade de degradação em 293°C (T<sub>m</sub>), permanecendo com perda de massa até 800°C. Ao final da corrida restaram 22% da massa total.

A Tabela 8 abaixo mostra os valores de temperatura onde ocorre a velocidade máxima de degradação (T<sub>m</sub>) demonstrada pela curva dTG para todos os compostos que formaram o conjugado e para o conjugado, nas razões 10, 20 e 30°C min<sup>-1</sup>.

Tabela 8 - Valores de Tm para PGLD<sub>G4</sub>, CbI, BFA e conjugado nas razões de aquecimento 10, 20 e 30°C min<sup>-1</sup>.

	10° (Cmin <sup>-1</sup> )	20(Cmin <sup>-1</sup> )	30(Cmin <sup>-1</sup> )
<b>PGLD<sub>G4</sub></b>	335	335	335
<b>CbI</b>	352	350	370
<b>BFA</b>	293	235	235
<b>CONJUGADO</b>	293	305	306

As Tms foram utilizadas nos métodos Kissinger e Osawa para calcular a energia de ativação de cada substância.

#### 5.4.5 Energia de ativação

Como demonstrado no capítulo 4 a energia de ativação (Ea) de uma substância pode ser calculada por diferentes métodos como o de Kissinger e Osawa. A Tabela 9 mostra a energia de ativação calculada para cada substância utilizada na síntese do conjugado e também para o conjugado.

Tabela 9- Valores calculados de Ea aparente para o PGLD<sub>G4</sub>, CbI, BFA e conjugado.

	<b>Ea (J/mol)</b> <b>Kissinger</b>	<b>Ea (J/mol)</b> <b>Osawa</b>
<b>PGLD<sub>G4</sub></b>	5,5008 x 10 <sup>5</sup>	5,3273 x 10 <sup>5</sup>
<b>CbI</b>	1,0452 x 10 <sup>6</sup>	1,0105 x 10 <sup>6</sup>
<b>BFA</b>	1,2373 x 10 <sup>5</sup>	1,2550 x 10 <sup>5</sup>
<b>CONJUGADO</b>	1,8996 x 10 <sup>5</sup>	1,8969x10 <sup>5</sup>

Comparando-se a energia de ativação (Ea) entre o conjugado e o PGLD<sub>G4</sub> nota – se que é menor no conjugado. Isto pode ser explicado pelo impedimento estérico que justifica o fato de que com a incorporação da CbI e do BFA a energia de ativação diminua, favorecida nesse caso por um maior impedimento estérico e conseqüente diminuição nas interações intermoleculares do dendrímero.

Neste trabalho foi calculada a energia de ativação aparente, pois se considera que a velocidade de decomposição por unidade de área de interface é constante, o que não é completamente verdade(MILITÃO, 2013).

## 5.5 CLAE

A Figura 40 mostra a cromatografia CLAE do CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>. A separação ocorre de acordo com a polaridade alcançada resultante do processo de síntese. Como os compostos mais hidrofóbicos interagem menos com a fase estacionária (coluna), estes eluem primeiro. Logo, a seguinte ordem de classificação foi alcançada em ordem crescente de hidrofobicidade BFA (1) < CbI-BFA (2) < CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> (3) < CbI(4)

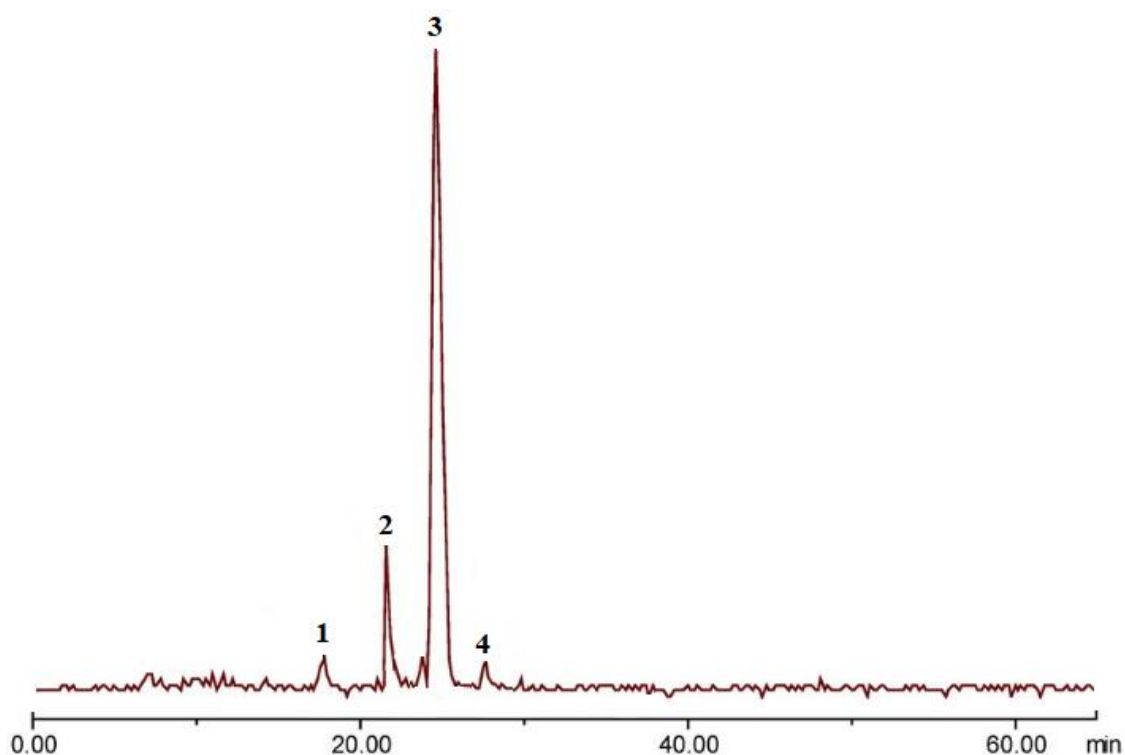


Figura 40 - Cromatograma CLAE de BFA(1), CbI-BFA (2), CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub>(3) e CbI(4).

A integração dos sinais forneceu a eficiência do porcentual de imobilização do CbI-BFA no PGLD<sub>G4</sub>: 72,8% relativamente à massa inicial do conjugado.

## 5.6 Liberação do Conjugado

O perfil de liberação do CbI-BFA contida no PGLD<sub>G4</sub> está representado na Figura 41. Observa-se uma tendência cinética de rápida liberação do CbI-BFA do PGLD<sub>G4</sub> após cerca de 100 min atingindo-se a cinética de ordem zero em aproximadamente 50 minutos. Esses dados mostram a eficiência do PGLD<sub>G4</sub> como agente transportador do CbI-BFA. Nesse caso, o composto apresenta-se promissor como sistema transportador de derivados do boro para aplicação na BNCT.

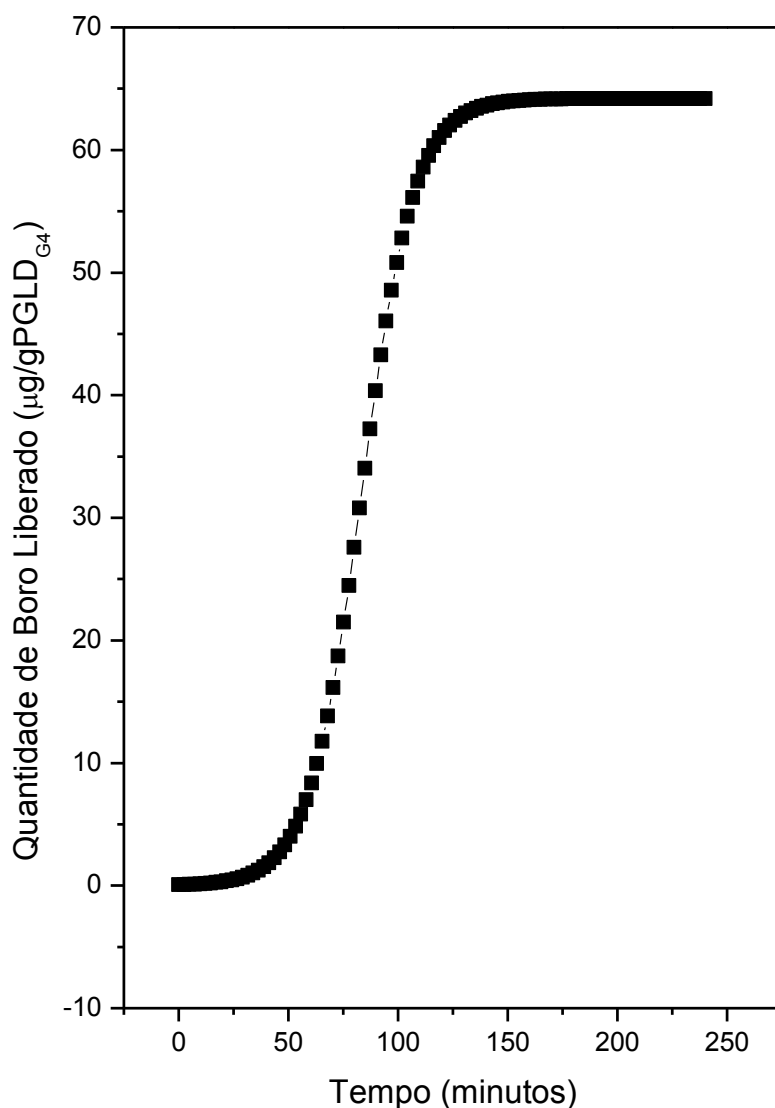


Figura 41 - Perfil da cinética de liberação de boro resultante da liberação de CbI-BFA do PGLD<sub>G4</sub>, *in vitro* em tampão PBS 7,4 a 37 ± °C. O conteúdo de boro no conjugado VB<sub>12</sub>-BFA foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

De acordo com estudos já publicados existem variações significativas nas concentrações de boro no sangue entre pacientes individuais, independente se a mesma quantidade de BFA é administrada por peso corporal. É importante que a dosagem de boro nas células tumorais seja de 20 µg de boro para cada grama de massa tumoral para que a técnica BNCT ocorra com sucesso. Portanto o PGLD<sub>G4</sub> garante que o conjugado CbI-BFA

não seja metabolizado pelo fígado e rins, aumentando a concentração do mesmo no sangue e seu tempo de permanência como agente terapêutico na circulação.

Desta maneira, os resultados desse trabalho demonstram que é possível se introduzir na periferia do PGLD<sub>G4</sub> a Cianocobalamina borilada com o fim específico de se obter uma elevada densidade de boro, o conjugado se mostra promissor para aplicação na BNCT.

## Referências Capítulo 5

ASTM E698 11, Standard Test Method for Arrhenius Kinetic Constants for Thermally Unstable Materials Using Differential Scanning Calorimetry and the Flynn/Wall/Ozawa Method, ASTM International Standard, 2014

DENARI, G.B. Princípios e Aplicações de Análise Térmica. Instituto de Química, USP, São Carlos, 2012.

IONASHIRO, M. Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial. Araraquara: Giz Editorial, 2004.

GUO, Z.; ZHU, G.; GAO, B. et al. Adsorption of vitamin B12 on ordered mesoporous carbon coated with PMMA. Carbon, v. 43, p. 2344-2351, 2005.

KIM H. T., OH, S. C. Kinetics of Thermal Degradation of Waste Polypropylene and High density Polyethylene. **J. Ind. Chem.**, v 11, n 5, p. 648-656, 2005.

KLERK WP Thermal Analysis of some Propellants and explosives with DSC and TG/DTA 1996

MACKENZIE, R. C. De calore: Prelude to thermal analysis. **Thermochimica Acta**, v. 73, p. 251-306, 1979.

MILITÃO, L. V. Análise Físico – Química e fotodinâmica de clorofila em dendrímeros de poliglicerol. **Universidade Federal de Itajubá** - [S.1] 2013.

Molecular Spectroscopy, Chemical Society. Specialist periodical reports Volume 4 pg 184.

STANDARD Infrared Prim Spectra. Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1961. v. 10

TOMIYASU H., PARK K.C., YOSHINO K. A high-yield synthesis of 4-borono-dl-phenylalanine. Synthesis, 2041-2044, 1999.

## Capítulo 6

### Conclusões e perspectivas futuras

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões relativas ao trabalho e suas perspectivas futuras considerando a utilização do conjugado CbI-BPA/PGLD<sub>G4</sub>.

5



Os resultados deste trabalho mostraram que o objetivo de síntese do conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> foram alcançados satisfatoriamente.

A estrutura do conjugado CbI-BFA foi confirmada por espectrometria de massas que mostrou a presença do conjugado em 1565,37 m/z e a cianocobalamina como impureza em 1356,50 m/z.

As análises espectroscópicas FTIR e UV-Vis permitiram verificar a presença dos grupos funcionais da cianocobalamina, borofenilalanina e PGLD<sub>G4</sub> nos espectros do produto final da síntese.

A integração dos sinais da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) forneceu o percentual de 72,8% de imobilização do conjugado CbI-BFA no PGLD<sub>G4</sub>.

A presença de boro no conjugado pode ser confirmada por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado.

A eficiência do PGLD<sub>G4</sub> como sistema transportador da CbI-BFA foi confirmada através da cinética de liberação do conjugado CbI-BFA.

O conjugado CbI-BFA/PGLD<sub>G4</sub> mostra-se promissor como sistema de entrega de boro com potencial uso na BNCT, porém ainda há necessidade de estudos de citotoxicidade e *in vivo* para garantir sua aplicabilidade na técnica.