

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Alexandre Gonçalves Dal-Bó**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS  
ANFIFÍLICOS FUNCIONALIZADOS COM (OLIGO-E  
POLISSACARÍDEOS)**

Florianópolis

2011



**Alexandre Gonçalves Dal-Bó**

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS  
ANFIFÍLICOS FUNCIONALIZADOS COM (OLIGO-E  
POLISSACARÍDEOS)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Físico-Química.  
Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte elaborada pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

D137p Dal-Bó, Alexandre Gonçalves

Preparação e caracterização de novos anfílicos  
funcionalizados com (Oligo-e Polissacarídeos) [tese] /  
Alexandre Gonçalves Dal-Bó ; orientador, Valdir Soldi. –  
Florianópolis, SC, 2011.

281 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-  
Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Anfílicos. 3. Polissacarídeos. I. Soldi,  
Valdir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa  
de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Alexandre Gonçalves Dal-Bó

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS  
ANFIFÍLICOS FUNCIONALIZADOS COM (OLIGO-E  
POLISSACARÍDEOS)**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química

Florianópolis, 25 de abril de 2011.

---

Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

---

Prof. Dra. Nádyá P. da Silveira  
Relatora (IQ – UFRGS)

---

Prof. Dr. Valdir Soldi  
Orientador (UFSC)

---

Prof. Dr. Jean-Jacque Robin  
Relator (ICG – Montpellier, França)

---

Prof. Dr. Redouane Borsali  
(CERMAV – Grenoble, França)

---

Prof. Dr. Cristiano Giacomelli  
(CCNE – UFSM)

---

Prof. Dr. Sébastien Fort  
(CERMAV – Grenoble, França)



Dedico esta Tese a pessoas muito especiais em minha vida: minha esposa Emanuela, meus pais Ari e Neide e meus irmãos Fernando e Rodrigo; as maiores fontes de felicidade nessa minha vida.



## AGRADECIMENTOS

Ao orientador professor Dr. Valdir Soldi por toda dedicação, conhecimentos transmitidos e pela amizade adquirida ao longo do tempo.

Aos orientadores Dr. Sebastien Fort e Dr. Redouane Borsali que me receberam no CERMAV em Grenoble durante parte do meu doutorado, aos pesquisadores Isabelle Pignot-Paintrand, Cyrille Rochas, Jean Bruno e Sami Halila.

Ao professor Dr. Fernando C. Giacomelli, Universidade Federal do ABC, pela ajuda durante os ajustes do perfis de espalhamento de raios-X medidas de SAXS.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões.

Ao Jadir e a Graça pela amizade e serviços prestados.

A minha família por toda a confiança que foram em mim confinadas.

A minha esposa Emanuela Valério Mendes.

Aos meus amigos Ângelo Adolfo Ruzza, Arlindo Cristiano Felipe, Davi da Silva, Dino Zanette, Gilson Rodrigo de Miranda, Marly da Silveira Soldi e Rogério Laus.

A todos os professores, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Ao European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) em Grenoble (França) e Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil).

Meu Muito Obrigado.



## LEMBRETES

Se procurar bem, você acaba encontrando  
não a explicação (duvidosa) da vida,  
mas a poesia (inexplicável) da vida.

Carlos Drummond de Andrade



## RESUMO

Esta tese relata a preparação e caracterização de novos anfifílicos do tipo rod-coil funcionalizados com (oligo-e polissacarídeos) por reações do tipo cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, entre espécies funcionalizadas por um grupamento azida, de um lado, e um alcino terminal do outro catalisadas por cobre. Os anfifílicos foram sintetizados e caracterizados a partir de diferentes partes hidrofóbicas conjugados com o polímero poli(óxido etileno) PEO como braço espaçador hidrofílico e os (oligo-e polissacarídeos) 2-propargil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose (GlcNAc) e propargil  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosose (Lac). A caracterização dos anfifílicos sintetizados foram quanto à estrutura química e composição através de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS e ESI-MS) e alta resolução (HRMS). Após a dissolução em água, os anfifílicos auto-associam em micelas com um diâmetro médio de ( $2R_H \sim 10$  nm). Espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamentos de raios-X a baixos ângulos (SAXS) foram utilizados para investigar a estrutura e dinâmica desses anfifílicos sacarídicos. A presença de epítomos de carboidratos na superfície das micelas determinada para a segmentação da lectina também foram demonstrados por DLS. Interações específicas dos resíduos GlcNAc e Lac com as lectinas da aglutinina de germe de trigo (WGA) e aglutinina do amendoim (PNA), respectivamente, revela o potencial das aplicações, de tais anfifílicos derivados de carboidratos como sistemas de vetorização simples e específica do local para entrega da droga.

**Palavras-chave:** Anfifílicos do tipo rod-coil; Oligo-e Polissacarídeos.



## ABSTRACT

This thesis reports the preparation and characterization of new rod-coil amphiphiles functionalized with oligo- and polysaccharides through Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reactions between species functionalized by an azide group on one side and an terminal alkyne on the other catalyzed by copper. The amphiphiles were synthesized and characterized based on different hydrophobic parts conjugated with the polymer poly(ethylene oxide) PEO with a hydrophilic spacer arm and the oligo- and polysaccharides 2-propargyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (GlcNAc) and propargyl  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranose (Lac). The amphiphiles synthesized were characterized in terms of their chemical structure and composition through nuclear magnetic resonance (NMR), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS and ESI-MS) and high resolution mass spectroscopy (HRMS). After the dissolution in water, the amphiphiles self-associate in highly regular micelles with an average diameter of  $2R_H \sim 10$  nm. Dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and small angle x-ray scattering (SAXS) were used in order to investigate the structure and dynamics of these saccharide amphiphiles. The presence of carbohydrate epitopes on the surface of the micelles and their bioavailability for the segmentation of lectin were also demonstrated by DLS. Specific interactions of GlcNAc and Lac residues with lectins from wheat germ agglutinin (WGA) and peanut agglutinin (PNA), respectively, reveal the potential applications of such amphiphilic derivatives of carbohydrates as vectorizing systems, both simple and specific to a drug delivery site.

**Keywords:** rod-coil amphiphiles, oligo- and polysaccharides.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da quitosana.....	46
Figura 2.	Estrutura química do ácido hialurônico.....	46
Figura 3.	Ilustra a estrutura química de <b>(A)</b> os principais polímeros sintéticos biodegradáveis e <b>(B)</b> polímeros sintéticos não degradáveis, utilizados como material de base para a preparação de nanopartículas poliméricas.....	48
Figura 4.	Exemplos de derivados de surfactantes glicosídicos <b>(a)</b> alquil glicosídeo e <b>(b)</b> alcanoato de sorbitol.....	50
Figura 5.	Exemplos de derivados de anfifílicos com ramnose.....	50
Figura 6.	Exemplo de surfactantes gêmeos, <b>(a)</b> catiônicos <b>(b)</b> não iônico e <b>(c)</b> aniônico.....	51
Figura 7.	Exemplos de anfifílicos do tipo rod-coil.....	52
Figura 8.	Formação de micelas em meio aquoso.....	53
Figura 9.	Representação do modelo de Stigter de estrutura micelar, forças de atração e repulsão, para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso.....	54
Figura 10.	Representação da estrutura molecular de <b>1-3</b> e esquema de representação de vesículas, esferas e micelas cilíndricas.....	58
Figura 11.	Funcionalização da nanopartícula por ligação covalente.....	59
Figura 12.	Ilustra as cicloadições 1,4 e 1,3-dipolar catalisada por diferente sais de metais.....	60
Figura 13.	Exemplos de estruturas que podem ser utilizadas como sondas biológicas tipos de ligantes que podem ser utilizados para funcionalização das nanopartículas: <b>(a)</b> N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), <b>(b)</b> manose, <b>(c)</b> ácido fólico e <b>(d)</b> biotina.	62
Figura 14.	Papel de glicoconjugados localizados na superfície da célula. Representação esquemática de exemplos de interações entre lectina-carboidrato.....	64
Figura 15.	Estrutura cristalina da lectina WGA em alta resolução complexada com carboidrato 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopirranose (GlcNAc).....	66

Figura 16.	Estrutura cristalina da lectina PNA em alta resolução complexada com carboidrato $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosose (Lac).....	67
Figura 17.	Ilustra auto-associação de nanoestruturas bioativas...	69
Figura 18.	Representação esquemática da interação das nanopartículas revestidas por unidades do monossacarídeo manose com receptores pili do tipo 1 encontrada na bactéria Escherichia Coli.....	70
Figura 19.	Representação esquemática dos dois principais métodos de preparação de micelas de copolímeros em bloco.....	74
Figura 20.	Representação esquemática das morfologias que podem ser obtidas pelas cadeias dos copolímeros em bloco PB-b-PEO, $N_{PB}$ e $W_{PEO}$ são o grau de polimerização e a fração da massa hidrofílica do PEO, respectivamente, onde B vesículas ou bicamadas C cilindros S esferas.....	76
Figura 21.	Representação esquemática de micelas do tipo “crew-cut” (A) e do tipo “sunflower” (B).....	77
Figura 22.	Diferentes morfologias para micelas de (A) PS168-b-PAA59, (B) PS490-b-PAA87, (C) PS500-b-PAA58, (D) PS390-b-PAA41, (E) PS420-b-PAA26, (F) PS420-b-PAA21.....	77
Figura 23.	Variação do espectro de fluorescência do pireno com a polaridade do solvente (A) e (B) diagrama mostrando os diferentes níveis de energia e as transições ocorridas na molécula de pireno após a excitação.....	80
Figura 24.	Geometria de espalhamento em um experimento de espalhamento de luz. A subtração vetorial de $k_e$ (feixe espalhado) e $k_i$ (feixe transmitido) é igual ao vetor de espalhamento, ( $q$ ). Na figura, $k_i$ representa o feixe incidente.....	81
Figura 25.	Ilustração da diferença entre $R_g$ (linha cheia) e $R_H$ (linha pontilhada) para um novelo polimérico randômico em solução.....	84
Figura 26.	Fotografia digital do equipamento comercial ALV utilizado nas medidas de espalhamento de luz.....	90
Figura 27.	Ilustra exemplos de ensaios de Hemaglutinação em presença de lectina em solução tampão.....	92

Figura 28.	Espectro de massa MALDI-TOF do C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac...	121
Figura 29.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C(DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto 4φPEGO <sub>900</sub> Lac.....	122
Figura 30.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C(DMSO-d <sub>6</sub> ) do composto C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac.....	122
Figura 31.	Perfis da razão I <sub>1</sub> /I <sub>3</sub> dos espectros de fluorescência do pireno medidas em função da concentração de C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> e C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac.....	127
Figura 32.	Perfis da razão I <sub>1</sub> /I <sub>3</sub> dos espectros de fluorescência do pireno medidas em função da concentração de C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac e C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> Lac.....	128
Figura 33.	Relação entre <i>cmc</i> (mg/mL) e a série de anfifílicos, (□) Azida, (●) GlcNac e (○) Lac em água a 25 °C....	130
Figura 34.	Relação entre ΔG <sup>mic</sup> e carbonos da série hidrofóbica dos anfifílicos, (○) Azida, (□) GlcNac e (●) Lac em água a 25 °C.....	132
Figura 35.	Espectro de emissão de fluorescência em função da concentração do anfifílico 4φPEG <sub>900</sub> GlcNac (13) (—) e 4φPEG <sub>900</sub> GlcNac (—) em água a 25 °C, com excitação em 320 nm.....	134
Figura 36.	(a) Função de autocorrelação C(q,t) adquiridas no ângulo de espalhamento θ = 90° e a respectiva distribuição do tempo de relaxação A(t), para uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> a 25 °C.....	136
Figura 37.	Funções de autocorrelação C(q,t) obtidas nos ângulos 50 (○), 90 (●) e 130° (□), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação A(t) a 90°, para soluções aquosas dos anfifílicos (a) 0,5 mg/mL C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac e (b) 0,5 mg/mL C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac em água a 25 °C.....	137
Figura 38.	Diâmetro hidrodinâmico (2R <sub>H</sub> ) em função da concentração dos anfifílicos C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac (○) e C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac (●) em água a 25 °C.....	138
Figura 39.	Imagens obtidas por MET dos auto-conjuntos, visualizadas após coloração negativa para os anfifílicos: (a) C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac e (b) C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac.....	139

- Figura 40. **(a)** Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}N_3$  a  $25^\circ C$  e **(b)** Imagem obtida por MET da auto-associação do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}N_3$  em água, visualizada após coloração negativa..... 142
- Figura 41. Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para solução aquosa 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{12}PEG_{900}Lac$  a  $25^\circ C$ ..... 143
- Figura 42. Distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$  obtida através do tratamento matemático utilizando-se o algoritmo CONTIN, para uma solução aquosa do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  0,5 mg/mL a  $25^\circ C$ ..... 144
- Figura 43. Imagens obtida por MET das auto-associações dos anfifílicos **(a)**  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  e **(b)**  $C_{12}PEO_{900}Lac$  em água, visualizadas após coloração negativa..... 144
- Figura 44. **(a)** Função de autocorrelação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução aquosa do anfifílico  $C_{10}PEO_{900}N_3$ , 0,5 mg/mL a  $25^\circ C$  e **(b)** Imagem obtida por MET da auto-associação do anfifílico  $C_{10}PEG_{900}N_3$  em água, visualizada após coloração negativa..... 146
- Figura 45. **(a)** Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para solução aquosa do anfifílico 0,5 mg/mL  $C_{10}PEG_{900}GlcNAc$  e **(b)** Imagem obtida por MET da auto-associação do anfifílico  $C_{10}PEG_{900}GLcNAc$  em água, visualizadas após coloração negativa..... 147
- Figura 46. **(a)** Típica função de autocorrelação  $C(q,t)$  adquiridas no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico  $4\phi PEG_{900}N_3$  em água a  $25^\circ C$ . **(b)** Imagens obtidas por MET da auto-associação do anfifílico

	4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> N <sub>3</sub> em água.....	150
Figura 47.	Funções de autocorrelação C(q,t) obtidas nos ângulos 50 (○), 90 (●) e 130° (□), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação A(t) a 90°, para soluções aquosas dos anfifílicos <b>(a)</b> 0,5 mg/mL 4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> GLcNac e <b>(b)</b> 0,5 mg/L 4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> Lac, em água a 25 °C.....	151
Figura 48.	Diâmetro Hidrodinâmico (2R <sub>H</sub> ) em função da concentração dos anfifílicos 4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> GLcNac (○) e 4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> Lac (●), medido em água a 25 °C.....	152
Figura 49.	Imagens obtidas por MET das auto-associações dos anfifílicos <b>(a)</b> 4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> GLcNac e <b>(b)</b> 4 $\phi$ PEG <sub>900</sub> Lac em água. As estruturas foram visualizadas após a coloração negativa. Barra de escala é de 50 nm.....	152
Figura 50.	Funções de autocorrelação C(q,t) obtidas nos ângulos 50 (○), 90 (●) e 130° (□), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação A(t) a 90°, para soluções aquosas dos anfifílicos <b>(a)</b> 0,4 mg/mL 4 $\phi$ PEO <sub>600</sub> N <sub>3</sub> e <b>(b)</b> 0,5 mg/mL 4 $\phi$ PEO <sub>600</sub> GlcNac a 25 °C.....	154
Figura 51.	Análise de Guinier dos resultados obtidos do anfifílico 4 $\phi$ PEO <sub>600</sub> N <sub>3</sub> .....	155
Figura 52.	Imagens obtidas por MET das auto-associações dos anfifílicos <b>(a)</b> 4 $\phi$ PEO <sub>600</sub> N <sub>3</sub> e <b>(b)</b> 4 $\phi$ PEO <sub>600</sub> GlcNac em água a 25 °C.....	156
Figura 53.	Representação gráfica da interpretação do fator forma micelar de acordo com o modelo para micelas que apresentam um núcleo esférico. O modelo considera um núcleo denso de raio R <sub>c</sub> e cadeias Gaussianas com raio de giro R <sub>G</sub> (cadeia) fixadas ao núcleo.....	160
Figura 54.	Perfis de SAXS para as amostras C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac (a), C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac (b), C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNac (c) e C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> Lac (d), dissolvidos em água a 25 °C com concentração igual a 40 mg/mL. A linha sólida vermelha ilustra o melhor ajuste obtido para os pontos experimentais usando-se o modelo para micelas de anfifílicos que contém um núcleo esférico.....	162

- Figura 55. Esquema para interpretação do fator forma micelar de acordo com o modelo para micelas que apresentam um núcleo esférico. O modelo considera um núcleo denso de raio  $R_c$  e cadeias Gaussianas com raio de giro  $R_G$  (cadeia) fixadas ao núcleo..... 164
- Figura 56. Perfis de SAXS para  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (6) (superior);  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (meio) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (parte inferior), dissolvidos em água a 25 °C com concentração igual a 40 mg/mL. A linha sólida vermelha ilustra o melhor ajuste obtido para os pontos experimentais usando-se o modelo para micelas de anfifílicos que contém um núcleo esférico..... 166
- Figura 57. (a) Teste de Hemaglutinação em presença da lectina WGA 1,0 mg/mL e (b) 0,5 mg/mL  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  em solução tampão fosfato salino PBS, 10 mM, pH 7,2, sobre uma microplaca de titulação..... 170
- Figura 58. Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $\text{C}_{18}\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  em solução tampão fosfato salino PBS, 10 mM, pH 7,2, a 37 °C, na ausência ( $\circ$ ) e na presença de proteína ( $\bullet$ ), (a) WGA (6  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/mL) e (b) PNA (4  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/mL)..... 172
- Figura 59. Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $\text{C}_{18}\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  em solução tampão fosfato salino PBS, 10 mM, pH 7,2, a 37 °C, na ausência ( $\circ$ ) e na presença de proteína ( $\bullet$ ), WGA (2  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/L)..... 173
- Figura 60. Função de correlação temporal adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  em solução tampão PBS, 10 mM, pH 7,2, a 37 °C, na ausência ( $\circ$ ) e na presença de proteína ( $\bullet$ ), (a) WGA (4  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/mL) e (b) PNA (4  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/mL)..... 174

Figura 61. Respectivas distribuições dos tempos de relaxação,  $A(t)$  a  $90^\circ$ , a partir das funções de autocorrelação  $C(q,t)$  para soluções de  $1,0 \text{ mg/mL}$  de  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  em solução tampão fosfato salino PBS,  $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência ( $\circ$ ) e na presença de proteína ( $\bullet$ ), **(a)** PNA ( $4 \mu\text{L}$ ,  $1,0 \text{ mg/mL}$ ), **(b)** WGA ( $2 \mu\text{L}$ ,  $1,0 \text{ mg/mL}$ ) e **(c)** solução da lectina WGA em solução tampão PBS,  $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,2$ , a  $25^\circ\text{C}$ ..... 176



## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1. Rota sintética utilizada na preparação dos anfifílicos do tipo roid coil;  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (7)..... 96
- Esquema 2. Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfifílicos do tipo roid coil;  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GLcNAc}$  (13)..... 102
- Esquema 3. Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfifílicos  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (16) e  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (17)..... 107
- Esquema 4. Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfifílicos  $\text{C}_{12}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (19) e  $\text{C}_{12}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (20) ..... 110
- Esquema 5. Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfifílicos  $\text{C}_{10}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (22) e  $\text{C}_{10}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (23)..... 113
- Esquema 6. Síntese do monossacarídeo 2-propargil 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose (GlcNAc).. 116



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estruturas tridimensionais das lectinas.....	65
Tabela 2.	Valores de $\rho$ para partículas com topologias típicas.	85
Tabela 3.	Parâmetros físico-químicos e tipo de espalhamento de luz.....	86
Tabela 4.	Valores de <i>cmc</i> encontrados a partir das razões das intensidades das bandas $I_1$ e $I_3$ , fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ) e energia livre de Gibbs do processo de micelização ( $\Delta G^{\text{mic}}$ ), a 25° C.....	130
Tabela 5.	Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula ( $2R_H$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ), parâmetro de empacotamento ( $P$ ), $N_{\text{agg}}$ teórico e morfologia dos anfifílicos $C_{18}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$ , $C_{18}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$ e $C_{18}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$ .....	140
Tabela 6.	Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula ( $2R_H$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ) e morfologia dos anfifílicos $C_{12}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$ , $C_{12}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$ e $C_{12}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$ .....	145
Tabela 7.	Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula ( $2R_H$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ), parâmetro de empacotamento ( $P$ ), $N_{\text{agg}}$ teórico e morfologia dos anfifílicos $C_{10}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$ , $C_{10}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$ e $C_{10}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$ .....	148
Tabela 8.	Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula, morfologia dos anfifílicos $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$ , $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$ e $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$ .....	153
Tabela 9.	Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula e morfologia dos anfifílicos $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$ e (b) $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GlcNAc}$ .....	157
Tabela 10.	Propriedades físico-químicas de espalhamento dos nano-objetos determinados por medidas de SAXS, usando o modelo de Pedersen e Gerstenberg de micelas que apresentamum núcleo esférico para diferentes amostras.....	164

Tabela 11. Parâmetros usados para a determinação de  $\beta_{\text{núcleo}}$ ..... 167

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\rho$	Parâmetro sensitivo à forma
(PPH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Pd	tetrakis(trifenilfosfina)-paládio(0)
A <sub>2</sub>	Interações interpartículas
BBB	Barreira hemato-encefálica
Cac	Concentração de agregação crítica
CBO	Chemistry and biotechnology of oligosaccharides
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CERMAV	Centro de Pesquisa em Macromoléculas Vegetais
CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Ag	Trifluorometanosulfonato de prata
<i>Cmc</i>	Concentração micelar crítica
Con(A)	Concanavalina A
Cu	Cobre
D	Coefficiente de difusão translacional
D	Dubleto
DCC	N,N'-díciclohexilcarbodiimida
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. Col	Escherichia coli
ESI-MS	Electrospray ionization-mass spectrometry
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
FCT	Função de correlação temporal
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GlcNAc	2-propargil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopirranose
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
HRMS	Espectometria de massas de alta resolução
Hz	Hertz
<i>I(q)</i>	Intensidade espalhada
INF- $\beta$	Interferon-beta
INF- $\gamma$	Interferon-gama
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>k<sub>B</sub></i>	Constante de Boltzmann

KDa	Quilodalton
$k_e$	Feixe espalhado
$k_i$	Feixe incidente
$k_t$	Feixe transmitido
L	Espessura da coroa micelar
Lac	Propargil $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosose
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia
M	Multiplete
M	Molaridade
$m/z$	Razão massa carga
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight - Mass Spectroscopy
MBS	m-Maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster
MEOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mm	Milimolar
$M_{w,mi}$	Massa molar micelar
$n_0$	Índice de refração do solvente onde a amostra esta submergida
$N_{agg}$	Número de agregação
$NaN_3$	Azida de sódio
nm	Nanômetro
$N_{PB}$	Grau de polimerização poli(1,2-butadieno)
NSF	National Science Foundation
OEGs	Oligo (etileno glicóis) (OEGs)
PAA	Poli(ácido acrílico)
PB- <i>b</i> -PEO	Poli(1,2-butadieno- <i>b</i> -poli(óxido etileno))
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PCL- <i>b</i> -PAA	Poli(caprolactona)- <i>b</i> -poli(ácido acrílico)
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PEO	Poli(óxido etileno)
PEO- <i>b</i> -PCL	Poli(óxido de etileno)- <i>b</i> -poli(-caprolactona)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido láctico)
PNA	Aglutinina do amendoim
PS- <i>b</i> -PAA	Poliestireno- <i>b</i> -poli(ácido acrílico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
PVP	Poli(vinil pirrolidona)

Py	Pireno
Q	Vetor de espalhamento
QELS	Espalhamento de luz quase elástico
$R_c$	Raio do núcleo
$R_g$	Raio de giro
$R_H$	Raio hidrodinâmico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN $^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
S	Singlete
SAXS	Espalhamentos de raios-X a baixos ângulos
SDoD	Dodecanoato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SRE	Sistema reticuloendotelial
TAM	Tamoxifen
$T_g$	Temperatura de transição vítrea
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsilano
TsCl	<i>p</i> -Toluenosulfonila
W	Comprimento da casca
WGA	Aglutinina de germe de trigo
$W_{\text{PEO}}$	Fração da massa hidrofílica poli(óxido etileno)
$\Gamma$	Taxa de relaxação
$\delta$	Deslocamento químico
$\phi$	Fração volume hidrofóbico
$\beta_{\text{coroa}}$	Excesso de comprimento de espalhamento do bloco formador da coroa
$\beta_{\text{núcleo}}$	Excesso de comprimento de espalhamento do bloco formador do núcleo
Composto (1)	PEO <sub>900</sub> -mono tosila
Composto (2)	2-(4'bromobifenil-4-iloxil)-PEO <sub>900</sub>
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> OH	1-ol-PEO <sub>600</sub> -(4'-tetrafenil)
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> Ts	1-tosila-PEO <sub>900</sub> -(4'-tetrafenil)
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	1-azida-PEO <sub>900</sub> -(4'-tetrafenil)
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> GlcNAc	<i>N</i> -acetil- $\beta$ -D-glucosamina-(4'-tetrafenil)PEO <sub>900</sub> conjugado
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> Lac	$\beta$ -Lactosil-(4'-tetrafenil)PEO <sub>900</sub> conjugado
Composto (8)	PEO <sub>600</sub> -mono tosila
Composto (9)	2-(4'bromobifenil-4-iloxil)-PEO <sub>600</sub>
4 $\phi$ PEO <sub>600</sub> OH	1-ol-PEO <sub>600</sub> -(4'-tetrafenil)

4φPEO <sub>600</sub> Ts	1-tosila-PEO <sub>600</sub> -(4'-tetrafenil)
4φPEO <sub>600</sub> N <sub>3</sub>	1-azida(4'-tetrafenil)PEO <sub>600</sub>
4φPEO <sub>900</sub> GlcNAc	<i>N</i> -acetil-β-D-glucosamina-(4'-tetrafenil)PEO <sub>600</sub> conjugado
PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	PEO <sub>900</sub> -mono azida
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	Estearato-PEO <sub>900</sub> -Azida
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc	<i>N</i> -acetil-β-D-glucosamina-PEO <sub>900</sub> -Estearato conjugado
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac	β-Lactosil-PEO <sub>900</sub> -Estearato conjugado
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	Dodecanoato-PEO <sub>900</sub> -Azida
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc	<i>N</i> -acetil-β-D-glucosamina-PEO <sub>900</sub> -Dodecanoato conjugado
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> Lac	β-Lactosil-PEO <sub>900</sub> -Dodecanoato conjugado
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	Dodecanoato-PEO <sub>900</sub> -Azida
C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc	<i>N</i> -acetil-β-D-glucosamina-PEO <sub>900</sub> -Decanoato conjugado
C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> Lac	β-Lactosil-PEO <sub>900</sub> -Decanoato conjugado
Composto (24)	3,4,6-triacetato-2-acetamido-2-desoxi-β-D- glucopiranoside
Composto (25)	2-propargil 2-acetamido-2-Desoxi-β-D- glicopiranosose

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	37
<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	37
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	41
<b>OBJETIVOS.....</b>	41
2.1 Objetivos Gerais.....	41
2.2 Objetivos Específicos.....	41
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	43
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	43
3.1 Nanotecnologia e a nanociência.....	43
3.2 Um breve relato sobre nanopartículas.....	44
3.3 Polímeros naturais modificados.....	46
3.4 Polímeros biodegradáveis.....	47
3.5 Polímeros sintéticos.....	47
3.6 Anfífilicos.....	48
3.7 Auto-associação de moléculas anfífilicas em meio aquoso....	52
3.7.1 Processo de micelização.....	52
3.7.2 Estabilidade.....	55
3.7.3 Interface externa da micela.....	55
3.7.4 O interior da micela.....	57
3.8 Funcionalização da superfície da nanopartícula.....	58
3.9 Funcionalização da superfície de macromoléculas com sondas específicas.....	61
3.10 Lectinas.....	63
3.10.1 Lectina da aglutinina de germe de trigo (WGA).....	65
3.10.2 Lectina da aglutinina do amendoim (PNA).....	66
3.11 Interação de anfífilicos funcionalizados por (oligo-e polissacarídeos) com lectinas.....	67
3.12 Nanopartículas direcionadas a sítios específicos.....	70
3.13 Técnicas de preparação de nanopartículas.....	74
3.14 Morfologia.....	75
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	79
<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS.....</b>	79
4.1 Fluorescência.....	79
4.2 Espalhamento de luz.....	80
4.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	83
4.4 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	86
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	89
<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	89
5.1 Preparação das nanopartículas.....	89
5.2 Método fluorimétrico.....	89

5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	90
5.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	90
5.5 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).....	91
5.6 Ensaio de Inibição da Hemaglutinação (HIA).....	91
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>93</b>
<b>SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO.....</b>	<b>93</b>
6.1 Reagentes.....	93
6.2 Técnicas e instrumentação.....	93
6.3 Síntese dos anfifílicos.....	95
6.4 Resultados e discussão.....	117
6.5 Considerações finais.....	123
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>125</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
7.1 Determinação da <i>cmc</i> .....	125
7.2 Emissão de fluorescência do pireno dos anfifílicos constituídos de ácidos carboxílicos como parte hidrofóbica.....	126
7.3 Emissão de fluorescência dos anfifílicos do tipo rod-coil com parte hidrofóbica constituída de poliaromáticos.....	133
7.4 Morfologia das nanopartículas acessadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	135
7.5 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> , C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc e C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac.....	135
7.6 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> , C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc e C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> Lac.....	141
7.7 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> , C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc e C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> Lac.....	145
7.8 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos 4φPEG <sub>900</sub> N <sub>3</sub> , 4φPEG <sub>900</sub> GlcNAc e 4φPEG <sub>900</sub> Lac.....	148
7.9 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos 4φPEG <sub>600</sub> N <sub>3</sub> e 4φPEG <sub>600</sub> GlcNAc.....	153
<b>CAPÍTULO 8.....</b>	<b>159</b>
<b>ESTRUTURA INTERNA DAS MICELAS FORMADAS POR NOVOS ANFIFÍLICOS TIPO ROD-COIL ACESSADA POR SAXS.....</b>	<b>159</b>
8.1 Medidas de SAXS.....	159
<b>CAPÍTULO 9.....</b>	<b>169</b>
<b>INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DAS NANOPARTÍCULAS COM AS LECTINAS WGA E PNA.....</b>	<b>169</b>
9.1 Ensaio de Inibição da Hemaglutinação (HIA).....	169

9.2	Interações das nanopartículas com as lectinas WGA e PNA acessadas por DLS formadas a partir dos anfifílicos C <sub>18</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc e C <sub>18</sub> PEG <sub>900</sub> Lac.....	171
9.3	Interações das nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos 4φPEG <sub>900</sub> GlcNAc e 4φPEG <sub>900</sub> Lac com as lectinas WGA e PNA acessadas por DLS.....	174
	<b>CAPÍTULO 10</b> .....	177
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	177
	<b>CAPÍTULO 11</b> .....	179
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	179
	<b>ANEXOS</b> .....	199



## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os resultados apresentados nesta tese foram obtidos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e no Centro de Pesquisa em Macromoléculas Vegetais (CERMAV), Université Joseph Fourier em Grenoble - França.

Nos últimos anos tem sido observado um grande crescimento no estudo de sistemas coloidais (*soft matter*) como dentre outros setores devido à crescente demanda por vários setores industriais, sobretudo aos associados ao desenvolvimento de nanomateriais ou materiais com controle morfológico na escala nanométrica.

Cada vez mais, o conceito de nanociência e tecnologia chama a atenção do público em geral através da mídia eletrônica e escrita. Mais de 30 milhões de dólares foram disponibilizados pela National Science Foundation (NSF), em 2005, somente para a criação de programas para informar o público sobre nanotecnologia, e abordar as questões sociais relacionadas.<sup>1</sup>

Dados recentes levantados pela União Européia, são suficientes para justificar a alta prioridade com que a nanotecnologia vem sendo tratada pelos países desenvolvidos e por aqueles em desenvolvimento acelerado, como a China e a Coréia do Sul. Atualmente, o investimento global situa-se na faixa de US\$ 4 bilhões por ano, apenas em nível governamental, distribuindo-se de forma equilibrada entre os quatro blocos: Japão, Estados Unidos, União Européia e o conjunto formado pelos demais países. Esse investimento, que vem crescendo, é alimentado pela expectativa de que, em 10 anos, a nanotecnologia deverá movimentar mais de US\$ 1 trilhão na economia mundial.<sup>2</sup>

Finalmente, é importante salientar que a nanotecnologia é uma área de prospecção aberta que oferece inúmeras oportunidades a serem aproveitadas e exploradas por países como o Brasil. Neste contexto, é necessário que novas oportunidades tecnológicas sejam rapidamente identificadas, consolidadas e avance na construção de um campo sólido de conhecimento.

No Brasil, os investimentos ainda são modestos. No entanto, já foram feitos avanços importantes na estruturação de quatro redes nacionais além de várias sub-redes temáticas, mobilizando mais de 300 pesquisadores e 600 pós-graduandos em todo o país como um Plano Nacional de Nanotecnologia, na modernização da lei de patentes e política de incentivos, bem como na articulação de novas redes e

parcerias com o setor empresarial e pesquisa visando parcerias internacionais.

Hoje o grande interesse da comunidade científica é desenvolver cada vez mais a nanociência com o intuito e a promessa de manipular a matéria átomo por átomo, molécula por molécula de criar dispositivos com desempenhos e funcionalidades superiores aos fornecidos pela atual tecnologia.

As aplicações são muito amplas, indo desde a indústria eletrônica, onde os agregados nanometricamente espaçados são utilizados para desenvolver circuitos e dispositivos também na escala nanométrica até a indústria médico-farmacêutica onde o desenvolvimento e aprimoramento desses sistemas permitem uma liberação controlada de fármacos e nutrientes, como também para fins de controle reológicos em indústrias de cosméticos e tintas.

A micela polimérica preparada a partir de anfífilos do tipo rod-coil tem sido importante, pois possibilita a preparação de partículas com diferentes morfologias do tipo esferas, cilindros ou vesículas, com tamanhos controláveis, tanto em escala micro-(látex), como nanométrica (micelas, vesículas, etc).<sup>3</sup>

Estas estruturas são tipicamente formadas por um núcleo, constituído pelos blocos solvofóbicos, e por uma coroa, formadas pelas cadeias solvofílicas. Os agregados micelares são estabilizados em solução pelas interações dos segmentos solúveis com o solvente.<sup>4</sup> Uma vez que a maioria dos sistemas coloidais encontra-se estruturada normalmente em escala nanométrica (menor do que 100 nm) ou submicrométrica (entre 100 e 1000 nm), a caracterização dos mesmos pode ser realizada por meio das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espalhamento de luz estático (SLS) e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Da mesma forma, os processos dinâmicos podem ser acessados por medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS).<sup>5</sup>

As nanopartículas a base de polímeros sintéticos hidrofóbicos são freqüentemente preparadas na presença de solventes orgânicos. No entanto, os aspectos ambientais e, por conseqüência, as normas internacionais impõem a eliminação destes solventes orgânicos e sua substituição pela água, com vistas a sua aplicação em áreas como a medicina e a cosmetologia. Confrontadas com a aplicação destas normas, as indústrias devem considerar, com urgência, a substituição de certos polímeros tradicionais hidrofóbicos, utilizados nas formulações, por polímeros naturais hidrossolúveis tais como (oligo-e

polissacarídeos), com o intuito de se alcançar um sistema transportador ideal e universal.

O desenvolvimento e a preparação de nanopartículas a partir de moléculas naturais como os (oligo-e polissacarídeos) constituem, atualmente, um desafio tanto no meio acadêmico como industrial.

Até o momento, ainda são poucos os sistemas que utilizam polímeros naturais no desenvolvimento de nanopartículas. Podem-se citar as nanopartículas de ciclodextrinas anfifílicas, os látex obtidos por polimerização, a encapsulação em cápsulas de polissacarídeos, e o revestimento de dendrímeros por oligossacarídeos.

Neste sentido, o potencial dessas nanoestruturas provenientes de estruturas funcionalizadas por (oligo-e polissacarídeos), vem sendo constantemente explorado, em vista de desenvolver diferentes nanoestruturas que possam alcançar e se adaptarem ao meio biológico mimetizando os efeitos colaterais significativos.

A funcionalização da superfície das partículas com unidades de (oligo-e polissacarídeos) é um dos caminhos viáveis para o transporte de fármacos à alvos de interesse como também a incorporação dos mais variados nutrientes e essências.

Com a finalidade de aprofundar a temática discutida acima, esta tese trata principalmente a preparação e caracterização de novos anfifílicos do tipo rod-coil com diferentes partes hidrofóbicas e a utilização do polímero poli(óxido etileno) (PEO) como braço espaçador hidrofílico funcionalizados ou não por carboidratos visando a obtenção de estruturas organizadas em solventes aquosos e avaliar estrutura a dinâmica destes sistemas coloidais na ausência e na presença de lectinas específicas.



## CAPÍTULO 2

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo a preparação e caracterização de novos anfifílicos inéditos, para obtenção de nanopartículas que servirão como suporte para a ligação de (oligo-e polissacarídeos), através do uso de reações de “*click chemistry*” do tipo cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre espécies funcionalizadas por um grupamento azida, de um lado, e um alcino terminal do outro.

### 2.2 Objetivos Específicos

Síntezar novos anfifílicos do tipo rod-coil com parte hidrofóbica constituída de quatro anéis aromáticos e tendo como braço espaçador hidrofílico o polímero poli(óxido etileno) PEO, funcionalizados em sua extremidade com o monossacarídeo 2-propargil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose (GlcNAc) e o dissacarídeo propargil  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosose (Lac).

Síntezar novos anfifílicos do tipo rod-coil com parte hidrofóbica constituída de diferentes ácidos carboxílicos e o polímero PEO como braço espaçador hidrofílico funcionalizados com monossacarídeo GlcNAc e o dissacarídeo Lac.

Caracterizar os anfifílicos sintetizados como os intermediários sintéticos quanto à estrutura química e composição através de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (FTIR), espectrometria de massa (MALDI-TOF-MS e ESI-MS) e alta resolução (HRMS).

Determinar a concentração micelar crítica por espectroscopia de fluorescência.

Preparar e caracterizar nanopartículas (micelas) a partir dos anfifílicos sintetizados visando uma boa distribuição de tamanho.

Analisar a morfologia das nanopartículas obtidas, através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), propriedades dinâmicas de auto-agregação, entre outras, por DLS, SLS e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS).

Avaliar a capacidade das diferentes formulações das nanopartículas que servirão como suporte para a ligação de (oligo-e polissacarídeos), por meio de interações específicas com lectinas.



## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Nanotecnologia e a nanociência

A nanotecnologia e a nanociência são consideradas, atualmente, como um dos mais fascinantes avanços nas áreas de conhecimento e constituem um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todos os países industrializados.<sup>1</sup>

Muitos consideram o ponto inicial da nanotecnologia, a palestra proferida em 1959, por Richard Feynman - prêmio Nobel de Física em 1965 - no qual ele sugeriu que um dia seria possível manipular átomos individualmente, uma idéia revolucionária para a época.<sup>2</sup> O visunatismo de Feynman, contudo, somente se tornou realidade nos anos 80 com o desenvolvimento dos chamados microscópios de varredura por sonda. Esses microscópios mapeiam objetos de dimensões nanométricas por meio de uma agulha muito fina (sonda), construindo uma imagem com resolução de escala atômica. Tal acessório tornou possível manipular individualmente nada menos do que um átomo, a menor unidade possível de um elemento químico.

A nanotecnologia já encontra aplicações praticamente em todos os setores industriais e de serviços. Estas podem ser em grande escala como os nanocompositos poliméricos, produzidos a partir de *commodities* como os termoplásticos e as argilas, ao lado de produtos fabricados em quantidades reduzidas, mas com valor agregado elevado e criados para as tecnologias de informação e de telecomunicações. Estima-se que, de 2010 a 2015, o mercado mundial para materiais, produtos e processos baseados em nanotecnologia será de um trilhão de dólares.<sup>3</sup>

Nano é o prefixo usado na notação científica para expressar um bilionésimo ( $10^{-9}$ ). Um nanômetro (nm), por exemplo, equivale a  $10^{-9}$  m, ou seja, um bilionésimo de metro. Nessa escala de tamanho, um minúsculo vírus, invisível a olho nu, se apresenta como uma incrível entidade com cerca de 200 nm. Apesar da dimensão ínfima, ele camufla, na realidade, uma complexa máquina molecular aparelhada com todos os dispositivos para invadir as células de organismos superiores e utilizá-las em sua reprodução, proporcionando um exemplo típico de tecnologia nanométrica colocada em prática pela natureza.<sup>4</sup>

### 3.2 Um breve relato sobre nanopartículas

Do ponto de vista tecnológico, as nanopartículas podem ser trabalhadas quimicamente através da modificação de suas superfícies com moléculas específicas ou polímeros, o que ampliaria enormemente suas aplicações. Por exemplo, nanopartículas podem ser aproveitadas em sensoriamento químico ou biológico, bastando modificá-las com espécies que reconhecem outros grupos complementares, como no caso da interação antígeno-anticorpo, que ocorre no sistema imune.<sup>4</sup>

As nanopartículas poliméricas são portadores em escala nanométrica (com diâmetro menor que 1µm) preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos e tem sido objecto de numerosos estudos por mais de 20 anos e evoluíram desde então. Esta definição não leva em conta as alterações morfológicas e estruturais de organização do polímero.

A característica da superfície da nanopartícula tem um impacto crucial nas interações com o seu ambiente biológico. Na última década, vêm se intensificando o interesse no desenvolvimento de polímeros e de copolímeros em bloco com características anfifílicas (no qual açúcares, peptídeos, ácido fólico, anticorpos e fármacos podem ser ligados ou associados de alguma forma ao polímero) permitindo a utilização das nanopartículas como sistemas transportadores dirigindo para alvos específicos e como ferramentas de diagnósticos.<sup>5-7</sup>

As nanopartículas apresentam vantagens frente às microesferas porque podem ser administradas por via intravenosa. Além disso, as nanopartículas podem ser administradas por várias vias, liberar fármacos hidrofílicos, hidrofóbicos, proteínas, vacinas, moléculas biológicas e ser formuladas para alcançar alvos específicos, como sistema linfático, cérebro, pulmão, fígado ou ainda permanecer por longos períodos na circulação sistêmica, proteção de fármacos sensíveis a degradação enzimática ou metabólica. Entre as características mais importantes das nanopartículas estão, o tamanho, a eficiência de encapsulação e as características de liberação.<sup>8-10</sup>

Dependendo da aplicação das nanopartículas, é importante levar em consideração vários fatores como a correta escolha do bloco formador da interface externa da micela e do bloco que vai constituir a parte interna da micela e sua estabilidade. O material utilizado para produzir os sistemas coloidais, devera atender diferentes necessidades fisiológicas e biológicas. Entre esses requisitos, biocompatibilidade é de importância crucial. Além disso, a bioerosão ou biodegradação deve ser considerado se desejado ou não. O prefixo bio é usado desde a erosão ou

degradação que ocorre em um ambiente biológico, ou por processos biocatalíticos (fungos, enzimas, etc) ou por processos químicos ou processos radiculares (hidrólise ou oxidação).

Deve ser observado, que não só o próprio polímero utilizado para a formulação farmacêutica, mas também os produtos de degradação (metabólitos) devem ser atóxicos, biocompatíveis e quimicamente inertes. Polímeros biodegradáveis sintéticos são normalmente degradados por hidrólise química. A degradação de polímeros naturais, provenientes de fontes animais ou vegetais, por outro lado geralmente requer enzimas para ocorrer a hidrólise. Três grupos de polímeros podem ser distinguir, ou seja, polímeros naturais “biopolímeros”, polímeros sintéticos que são degradáveis por processos biológicos ou químicos no corpo humano e polímeros sintéticos não-degradáveis.

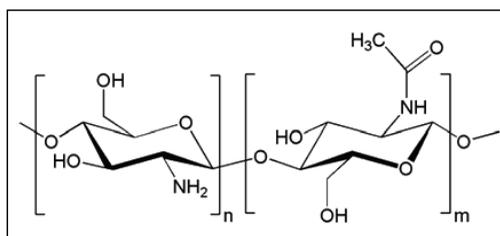
O investimento em pesquisas na área de nanotecnologia está voltado principalmente para o desenvolvimento e a preparação de nanopartículas a partir de moléculas naturais e o desenvolvimento de novas moléculas supramoleculares que possam apresentar propriedades bioquímicas e biológicas. Neste aspecto, o potencial de muitas nanoestruturas vem sendo constantemente explorado, para alcançar com precisão e exatidão as células cancerosas sem danificar o tecido a sua volta ou provocar efeitos colaterais significativos.<sup>11, 12</sup>

Em geral moléculas naturais, (oligo-e polissacarídeos) ao lado de poli (peptídeos) são os grupos mais importantes pois apresentam propriedades de interesse que estão ausentes nos polímeros sintéticos. A presença de carga ao longo de sua estrutura e o aspecto intrínseco e semi-rígido, a biocompatibilidade e biodegradabilidade conferem aos mesmos propriedades originais bastante diferentes daquelas dos polímeros de síntese.

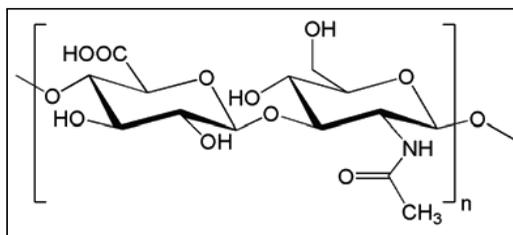
Até o momento, ainda são poucos os sistemas que utilizam ambas as moléculas naturais no desenvolvimento de nanopartículas. Podem-se citar as nanopartículas de ciclodextrinas anfifílicas, os látex obtidos por polimerização, a encapsulação em cápsulas de polissacarídeos, e o revestimento de dendrímeros por oligossacarídeos.<sup>13</sup> Devido ao tamanho, composição e estabilidade estes sistemas apresentam poucas aplicações em áreas importantes como, por exemplo, a medicina e a cosmetologia.

Outros polissacarídeos biocompatíveis e biodegradáveis como, por exemplo, o colágeno, a celulose e a quitosana são muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos.<sup>14</sup> Um exemplo é a aplicação de quitosana enxertada com poli(ácido acrílico), formando um copolímero, na confecção de nanoesferas para estudar a liberação

controlada em função do tempo, utilizando-se eosina, um corante solúvel em água, como marcador.<sup>15, 16</sup> A Figura 1 ilustra a estrutura da quitosana o que pode ser definido como um copolímero de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicose.<sup>17</sup> O ácido hialurônico é outro biopolímero constituído por unidades dissacarídicas repetidas contendo *N*-acetil-D-glucosamina e D-ácido glucorônico (Figura 2), bastante utilizado no desenvolvimento de formulações para reduzir o aparecimento de rugas mediante a hidratação e a promoção da elasticidade da pele, perdida com o avanço da idade.



**Figura 1.** Estrutura química da quitosana.



**Figura 2.** Estrutura química do ácido hialurônico.

### 3.3 Polímeros naturais modificados

Um problema encontrado em polímeros naturais é que eles frequentemente levam um maior tempo para degradar. Isto pode ser resolvido adicionando-se grupos polares as cadeias, que por serem mais labéis podem diminuir o tempo de degradação.

Exemplos destas modificações podem ser a reticulação de gelatina utilizando-se formaldeído, da quitosana utilizando-se glutaraldeído e transformação de celulose em acetato de celulose.

Modificações enzimáticas também são utilizadas, como a modificação de quitosana por tirosinase.<sup>15, 16</sup>

### 3.4 Polímeros biodegradáveis

A aplicação de materiais poliméricos nos diversos campos da ciência como engenharia de tecidos, implantes de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, proporcionaram o desenvolvimento de matrizes poliméricas biodegradáveis ou biocompatíveis e degradáveis, isto é, degradadas *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo.<sup>15, 16</sup>

Os polímeros empregados nessas preparações são macromoléculas biodegradáveis que apresentam várias unidades monoméricas iguais (homopolímeros) ou diferentes entre si (copolímeros), podendo ser iônicos (polieletrólitos) ou não iônicos (neutros). Atualmente diversos polímeros biologicamente degradáveis estão disponíveis.<sup>15</sup>

### 3.5 Polímeros sintéticos

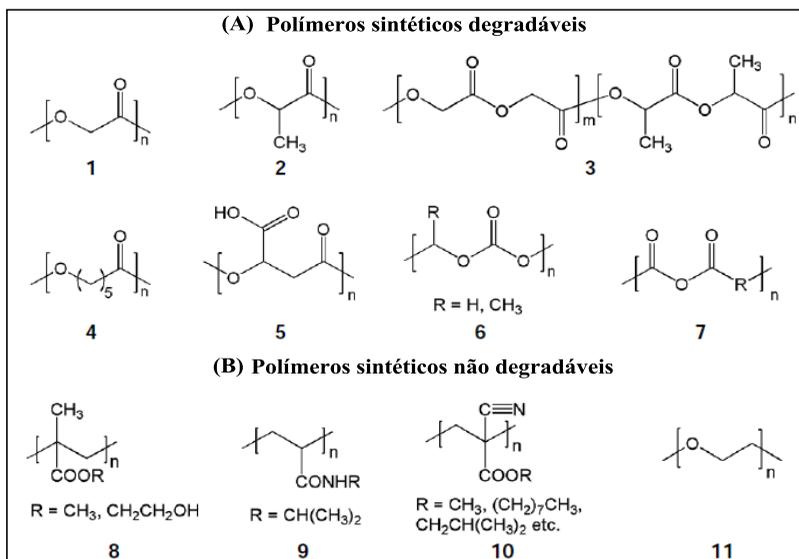
São também largamente utilizados, como, por exemplo, poli(etileno), poli(álcool vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(óxido de etileno), poliésteres e tem no poli(ácido glicólico) o polímero alifático linear mais simples. O monômero é sintetizado a partir da dimerização do ácido glicólico ou através da polimerização por abertura de anel esse último leva a materiais de alta massa molar, com aproximadamente 1-3% do monômero residual. Outro exemplo de um copolímero em bloco bastante utilizado é poli(caprolactona)-*b*-poli(ácido acrílico) (PCL-*b*-PAA) descrito na literatura por Hong e colaboradores que descrevem a abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona, na presença do catalisador octoato de estanho e o álcool isopropílico como iniciador sob condições de refluxo.<sup>18</sup>

Existem estudos de nanopartículas estabilizadas por polímeros naturais modificados, sintéticos e nanopartículas lipídicas sólidas estabilizadas estericamente com unidades de PEO, anfifílicas glicosídicas, também denominadas de furtivas, que são preparadas a partir de produtos biocompatíveis, como o ácido esteárico conjugado com o PEO 660 (estearato/PEO) tais como solutol HS15 Gelucir 50/13.<sup>19, 20</sup>

Em termos de inovação, um dos maiores desafios para a ciência atual é desenvolver nanopartículas para área médica que transportem o

fármaco até o alvo específico, liberando a quantidade exata de fármaco necessário.<sup>11, 12, 21</sup>

A Figura 3 apresenta a estrutura química dos polímeros sintéticos principais utilizados como blocos formadores para a preparação de nanopartículas.



**Figura 3.** Ilustra a estrutura química de (A) os principais polímeros sintéticos biodegradáveis: utilizados como material de base para a preparação de nanopartículas poliméricas; (1) (ácido glicólico), (2) poli(ácido láctico), (3) poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), (4) poli( $\epsilon$ -caprolactona), (5) (ácido málico), (6) poli(carbonato de etileno) ( $R = H$ ), poli(carbonato de propileno) ( $R = CH_3$ ), (7) poli(anidrido) e (B) alguns polímeros sintéticos não degradáveis: (8) (metacrilato de metila) ( $R = CH_3$ ), poli(metacrilato de hidroxietila) ( $R = CH_2CH_2OH$ ), (9) poli(N-isopropilacrilamida), (10) poli(alquil cianoacrilato), (11) poli(óxido de etileno).

### 3.6 Anfífilicos

Anfífilicos é uma interessante classe de compostos amplamente estudada devido a grande aplicabilidade industrial e científica. Os anfífilicos desempenham funções em muitos processos industriais, desde os mais simples, como lavagem de materiais até os mais sofisticados

como em microeletrônica. Na área científica são muito utilizados como catalisadores de reações químicas (catálise micelar) entre várias outras aplicações. Tal desenvoltura deve-se à capacidade de modificações das propriedades físico-químicas que promovem quando em solução.

Os anfifílicos são classificados conforme a natureza do grupo hidrofílico em:

- a) Catiônicos: Possuem a parte hidrofílica da molécula constituída por um átomo ou grupo carregado positivamente.
- b) Aniônicos: Apresentam na parte hidrofílica da molécula um átomo ou grupo carregado negativamente.
- c) Zwitteriônicos: A classe mais conhecida possui grupamentos com características ácidas ou básicas e passam a ter o comportamento aniônico ou catiônico dependendo do pH do meio.
- d) Não-iônicos: Caracterizam-se por ter uma estrutura polar que interage fortemente com a água, principalmente por ligações de hidrogênio.

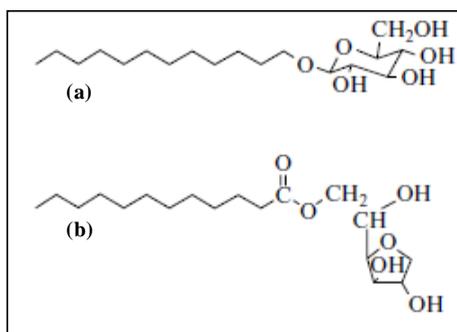
As moléculas supramoleculares mais amplamente investigadas, incluem copolímeros em bloco, anfifílicos glicosídicos, anfifílicos gêmeos, anfifílicos do tipo rod-coil, peptídeos e seus derivados, essas moléculas são agentes de superfície ativa, têm infinitas aplicações em diversas áreas, como na de cosméticos, eletrônica, controle de poluição, formação de materiais avançados e na incorporação e liberação de medicamentos.<sup>22-25</sup> Na área médica, as micelas podem ser utilizadas em rota parenteral para fármacos com pouca solubilidade em água e/ou tóxicos, ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e estratégias para diagnóstico de imagem.<sup>22, 26-28</sup>

Entre os vários tipos de blocos de construção supramolecular, há uma classe de moléculas conhecidas como rod-coil, moléculas que em sua estrutura possuem duas partes bastantes distintas uma parte rígida como um bastão com característica hidrofóbica (apolar) que tem afinidade com gorduras e outra flexível como uma bobina apresentando características hidrofílicas (polar) que tem afinidade com a água. As moléculas tipo rod-coil oferecem amplas oportunidades para construir uma variedade bem definida de nanoestruturas com diferentes morfologias quando dissolvidos em solventes seletivos (solvente bom para um bloco e pobre para o outro).<sup>29-31</sup>

Como consequência destas características, algumas destas substâncias atuam como agentes emulsificantes, dispersantes e/ou solubilizantes.

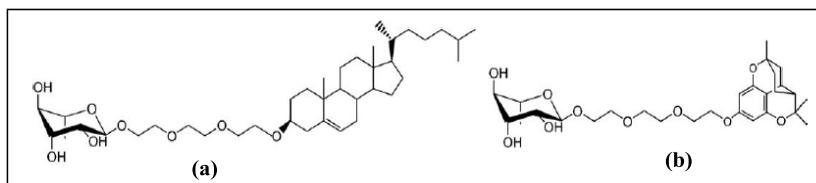
Assim, agregados formados por anfifílicos do tipo rod-coil tais como micelas, vesículas e monocamadas são amplamente estudados porque possuem interfaces anisotrópicas que separam uma região aquosa, portanto hidrofílica, de uma região hidrofóbica cujas características são tipicamente de um óleo. O aspecto relevante destas interfaces é de que podem controlar propriedades físicas e induzir mudanças de reatividade química e biológica. Estes sistemas têm sido usados com frequência para mimetizar reações químico-biológicas uma vez que, essencialmente *in vivo*, as reações ocorrem em interfaces, e eles constituem sistemas menos complexos do que membranas biológicas.<sup>32</sup>

Na literatura os anfifílicos glicosídicos derivados de mono e polissacarídeos são bastante explorados. A Figura 4, ilustra dois tipos desses anfifílicos diferenciando-os dos rod-coil da Figura 7, por não apresentarem um braço espaçador hidrofílico.<sup>33</sup>



**Figura 4.** Exemplos de derivados de surfactantes glicosídicos (a) alquil glicosídeo e (b) alcanoato de sorbitol.

A Figura 5 ilustra outros dois tipos de anfifílicos decorados com o desoxiaçúcar ramnose utilizando como braço espaçador trietilenoglicol e com diferentes partes hidrofóbicas de acordo com Barragan-Montero e colaboradores.<sup>34</sup>

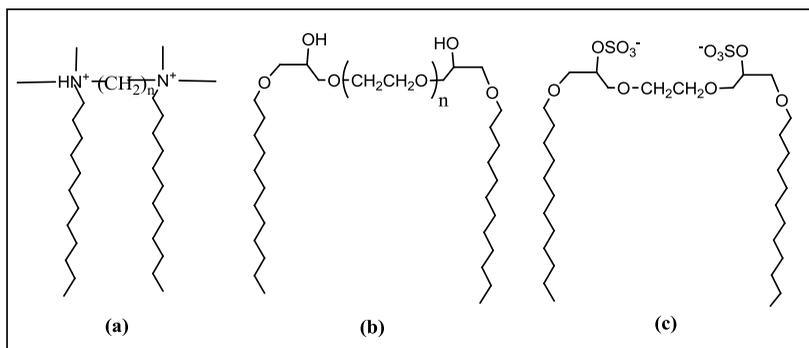


**Figura 5.** Exemplos de derivados de anfifílicos com ramnose.<sup>34</sup>

Recentemente, outra classe de anfifílicos, definidos como "gêmeos", têm despertado a atenção da comunidade científica. Essa nova classe é formada por dois monômeros idênticos de um anfifílico, ligados entre si através de um grupo (espaçador).<sup>35, 36</sup> O grupo espaçador pode ser rígido ou flexível, hidrofílico ou hidrofóbico, possuindo tipicamente 2-8 átomos. A apresentação esquemática dos tensoativos gêmeos é mostrada na Figura 6.<sup>37</sup>

Ao comparar com os respectivos anfifílicos monoméricos, os gêmeos apresentam propriedades e desempenho superiores em alguns aspectos, como baixos valores de concentração micelar crítica (*cmc*), e da temperatura Kraft, maior superfície ativa e alta capacidade de solubilização, melhor tolerância ao íon mono ou divalente e diferem muito na morfologia dos agregados formados em solução.<sup>36, 37</sup>

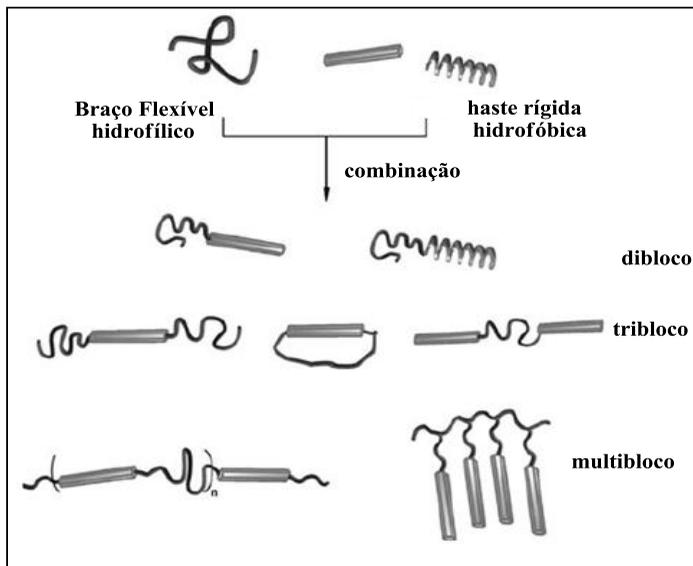
O desempenho superior e a utilização para desenvolver nanoestruturas variadas para aplicação biomédica têm motivado esforços dentre os pesquisadores na busca de novas estruturas de anfifílicos gêmeos ou desenvolvimento de anfifílicos funcionalizados na extremidade hidrofílica utilizando um braço espaçador flexível biocompatível e bio-eliminável ligados covalentemente entre as partes distintas da molécula.<sup>33</sup>



**Figura 6.** Exemplo de anfifílicos gêmeos, (a) catiônicos, (b) não iônico e (c) aniônico.

As moléculas do tipo rod-coil decoradas com carboidratos podem ser vistas como análogos dos surfactantes gêmeos e glicosídicos convencionais diferenciando-se dos mesmos porque entre a parte hidrofóbica e o carboidrato tem um braço espaçador hidrofílico flexível permitindo uma maior mobilidade e resultando em diferentes estruturas nanométricas.<sup>27, 30, 31, 34, 38, 39</sup>

A Figura 7 ilustra exemplos de anfifílicos do tipo rod-coil. As combinações permitem aos cientistas criarem moléculas sob medida, ou seja, com composição, arquitetura e funcionalidades bem definidas, que vêm despertando grande interesse na área química. Estas macromoléculas são geralmente sintetizadas por reações de *click chemistry*, polimerizações iônicas, por abertura de anéis ou por condensação, devido à natureza da terminação da cadeia polimérica.<sup>30, 31, 40-43</sup>



**Figura 7.** Exemplos típicos de anfifílicos rod-coil.<sup>44</sup>

### 3.7 Auto-associação de moléculas anfifílicas em meio aquoso

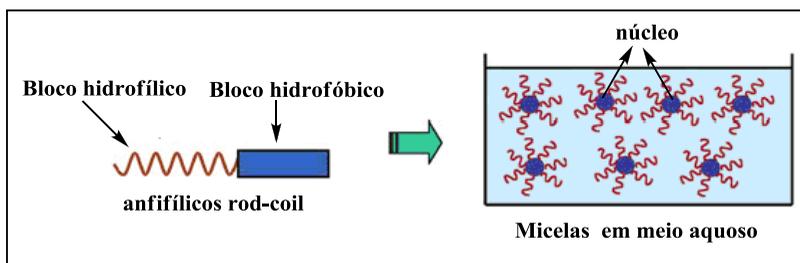
#### 3.7.1 Processo de micelização

As moléculas de copolímeros em bloco, anfifílicos glicosídicos, anfifílicos gêmeos, anfifílicos do tipo rod-coil, peptídeos e seus derivados, quando dissolvidos em um solvente seletivo para um dos segmentos, tem a capacidade de auto-associarem espontaneamente em morfologias nano-organizadas tais como micelas, vesículas, bicamadas, agregados lamelares, nanofitas, nanotubos e torróides, sendo potencialmente úteis na condução de drogas ou atuando como modelos biológicos.<sup>21, 23, 24, 45-50</sup>

O início dessa auto-organização é definida como *cmc*, assim, que pode ser definida como a concentração máxima na qual o monômero é solúvel. A partir, da *cmc* os monômeros rearranjam-se espontaneamente de tal forma que adquirem uma conformação termodinâmica estável e solúvel.

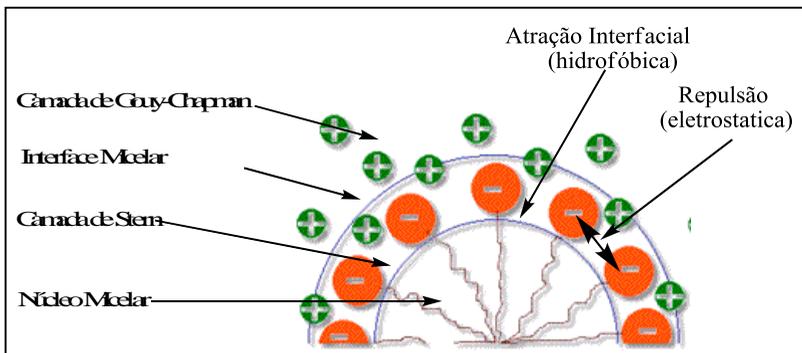
No processo de micelização em água, o bloco hidrofílico é orientado para a fase contínua e forma o revestimento, ou coroa micelar enquanto que a parte hidrofóbica, protegida do meio externo, forma o núcleo Figura 8.<sup>25, 51</sup> O núcleo hidrofóbico da micela serve como um micro ambiente ideal para a encapsulação e liberação de fármacos, ou princípios ativos de caráter hidrofóbico, enquanto que a coroa micelar serve como uma interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo.<sup>52</sup>

O aspecto relevante destas interfaces é de que elas podem controlar propriedades físicas e induzir mudanças de reatividade química e biológica.<sup>53</sup>



**Figura 8.** Formação de micelas em meio aquoso.

Existem duas forças principais contrárias e responsáveis pela formação das micelas, uma força de atração que tende a unir as moléculas e uma força de repulsão que limita o número de moléculas que podem se associar, (ver Figura 9). Em copolímeros estas tendências estão associadas com os diferentes blocos na molécula. Para um polímero não carregado são principalmente as interações das unidades monoméricas com o solvente que determinam se elas serão ou não atraídas umas pelas outras.<sup>54</sup>



**Figura 9.** Representação do modelo de Stigter de estrutura micelar, forças de atração e repulsão, para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso.<sup>55</sup>

A afinidade ou qualidade do solvente pode influenciar o processo de micelização dos anfifílicos. Em geral, quando a qualidade do solvente diminui, a solubilidade das micelas também diminui, resultando em uma conseqüente diminuição nos valores de *cmc* e um aumento no número de agregação das micelas ( $N_{agg}$ ).<sup>25</sup>

As micelas formadas por copolímeros em bloco e anfifílicos do tipo rod-coil são mais estáveis termodinamicamente em comparação às micelas de anfifílicos normais, pois possuem uma estreita faixa de distribuição de tamanho, em escala nanométrica ( $< 100$  nm), possibilitando a sua utilização em injeções intravenosas. Possuem também uma *cmc* menor e menor taxa de dissociação, permitindo a retenção de substâncias incorporadas por um maior período.<sup>51, 56, 57</sup>

Estes sistemas apresentam, portanto, a capacidade de solubilizar, estabilizar e liberar substâncias que possuam baixa solubilidade em água e/ou substâncias com elevada toxicidade de maior ou menor complexidade estrutural. A possibilidade de variações na massa molar total e composição dos blocos fornecem copolímeros em bloco com uma ampla faixa de balanço hidrofílico-lipofílico que é limitado no caso nas micelas de surfactantes.<sup>29</sup>

### 3.7.2 Estabilidade

A formação das micelas ocorre quando os agregados moleculares em solução estão acima da *cmc*. Nesta concentração os segmentos do bloco hidrofóbico começam a se associar para minimizar o contato com as moléculas de água, conduzindo a formação de estruturas vesiculares ou do tipo núcleo-coroa. A *cmc* de micelas poliméricas é tipicamente da ordem de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, enquanto que a *cmc* dos surfactantes é da ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, indicando maior estabilidade termodinâmica.<sup>58</sup>

As propriedades mais utilizadas para determinação da *cmc* são: fluorescência, condutividade iônica, tensão superficial, espalhamento de luz, pressão osmótica e solubilidade.<sup>59, 60</sup>

Quando ocorre a auto-associação dos anfifílicos, ocorre um decréscimo da energia livre do sistema devido à remoção dos fragmentos hidrofóbicos do meio aquoso em função da formação da micela, com isso há também um ganho de entropia.<sup>61, 62</sup> Uma micela é relativamente estável para se dissociar em cadeias simples em meio aquoso se a concentração total do anfifílico está acima da *cmc*. Desta maneira é de extrema importância conhecer a *cmc* de um anfifílico.

A *cmc* de um anfifílico é dependente de muitos fatores, como a natureza e o comprimento do bloco formador do núcleo e a presença de solubilizantes hidrofóbicos. Porém as características do bloco formador do núcleo apresentam um efeito mais relevante sobre este parâmetro, de modo que quanto maior o bloco hidrofóbico, menor o valor de *cmc* em água. Se o bloco formador da coroa é mantido constante, um aumento na massa molar do bloco formador do núcleo causa um decréscimo na *cmc*. Mas, se o bloco formador do núcleo for mantido constante, um aumento no comprimento do bloco hidrofílico causa um aumento na *cmc*.<sup>52</sup> Em respeito à estabilidade, existem evidências de que a incorporação de compostos hidrofóbicos como fármacos nas micelas pode melhorar a estabilidade da mesma.<sup>52</sup>

### 3.7.3 Interface externa da micela

As propriedades do segmento formador da interface da micela são responsáveis principalmente pela biodistribuição da micela, pelos parâmetros farmacocinéticos, biocompatibilidade, estabilidade e proteção estérica, especificidade e adsorção da superfície por proteínas plasmáticas. Já os principais parâmetros físicos de importante influência são: a densidade da superfície das cadeias hidrofílicas, que aumentam

com o aumento do número de agregação, a carga, a hidrofiliçidade e o comprimento do bloco.<sup>52, 62, 63</sup>

O PEO é um polímero neutro, hidrofílico e flexível que é amplamente utilizado para modificação da superfície das nanopartículas a fim de reduzir as interações indesejáveis com o meio biológico. É um dos polímeros mais utilizados como braço espaçador hidrofílico de anfífilos do tipo rod-coil dando a essas moléculas uma enorme flexibilidade.

Este polímero é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e têm sido amplamente utilizado na medicina, indústria farmacêutica e engenharia biomédica.<sup>64</sup> Nas aplicações biomédicas, é particularmente útil em sistemas de distribuição de drogas, por exemplo, derivatizante de drogas, peptídeos, proteínas ou para melhorar a solubilidade em água.<sup>65</sup> As propriedades em que os tornam úteis e atraentes o para uso em tais aplicações, inclui (i) solubilidade em ambientes orgânicos, bem como aquosos, (ii) baixa toxicidade, (iii) baixa imunogenicidade, (iv) a estabilidade química e (v) de baixo custo.<sup>66</sup> Seu alto grau de hidratação e grande contração de volume induzem às forças repulsivas que contribuem para a estabilização de uma superfície revestida por PEO. A flexibilidade das cadeias de PEO é particularmente elevada em comparação com outros polímeros hidrofílicos, devido à rotação fácil das ligações éter e na ausência de quaisquer substituintes volumosos sobre a estrutura do polímero. Os mecanismos de interação entre proteínas e PEO foi primeiramente proposto por Vermette e colaboradores.<sup>67</sup> A estratégia mais comum adotada para aumentar o tempo de circulação no sangue de sistemas coloidais carregadores de fármacos no sistema reticuloendotelial (SRE) é o recobrimento da superfície da nanopartículas com PEO, induzindo um efeito repulsivo estérico para adsorção de proteínas.<sup>56, 68-70</sup>

Outros polímeros também empregados como segmentos formadores do revestimento da micela incluem o polímero poli(vinil pirrolidona) (PVP), que é bastante utilizado por ser altamente biocompatível para uso em várias formulações, poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(ácido acrílico) (PAA).<sup>52, 63</sup>

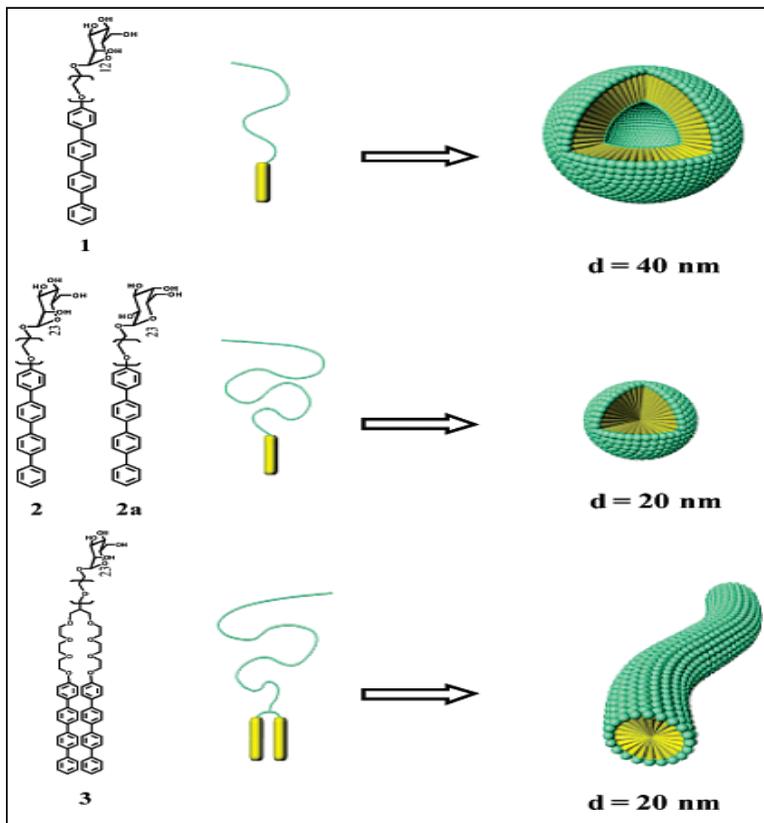
### 3.7.4 O interior da micela

A escolha do bloco formador do interior da micela (núcleo) é determinante para propriedades das micelas poliméricas, como estabilidade, capacidade de encapsulação, e perfil de liberação do fármaco.<sup>51</sup>

A maioria dos anfifílicos aplicados para propostas de liberação de fármacos contém poliésteres e derivados de poli(amino ácidos) como segmento hidrofóbico. Poli(ácido láctico) (PLA), poli(ε-caprolactona) (PCL) e poli(ácido glicólico) (PGA) são todos poliésteres biocompatíveis e biodegradáveis aprovados pela FDA para aplicações biomédicas em seres humanos.<sup>57</sup>

Recentemente, Lee e colaboradores relataram a auto-associação espontânea de nano-objetos de tamanhos e morfologias diferentes de uma série de anfifílicos do tipo rod-coil funcionalizados com carboidratos constituído do polímero PEO como braço espaçador hidrofílico e poliaromáticos como parte hidrofóbica.<sup>71-73</sup> Esses nano-objetos foram obtidos em água e mostraram dependência da arquitetura molecular, assim como da fração volumétrica de cada componente, e a biodisponibilidade da funcionalização por unidades de carboidratos foram confirmados por receptores de *Escherichia coli* (E. Coli).<sup>71, 73</sup>

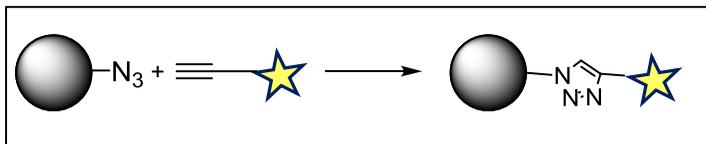
A Figura 10, mostra exemplos dos sistemas, nanopartículas/monossacarídeo que se organizam em água na forma de micelas esféricas sólidas vesículas e cilindros. O sistema é composto de uma parte hidrofílica formada a partir do polímero PEO e o monossacarídeo manose e uma parte hidrofóbica correspondente a 4 anéis aromáticos.<sup>73</sup>



**Figura 10.** Representação da estrutura molecular de **1-3** e esquema de representação de vesículas, esferas e micelas cilíndricas.<sup>73</sup>

### 3.8 Funcionalização da superfície da nanopartícula

A característica da superfície da nanopartícula tem um impacto crucial nas interações com o seu ambiente biológico. Na última década, vêm se intensificando o interesse no desenvolvimento de polímeros e copolímeros em bloco com características anfifílicas (no qual açúcares, peptídeos, ácido fólico, anticorpos e fármacos podem ser ligados ou associados de alguma forma ao polímero), permitindo a utilização como ferramentas de diagnósticos e sistemas transportadores para alvos específicos.<sup>74-76</sup>



**Figura 11.** Funcionalização da nanopartícula por ligação covalente.

A funcionalização dos copolímeros em bloco e anfífilicos rod-coil é realizada por vários tipos de interações ou reações. A busca inteligente da funcionalização de anfífilicos e copolímeros para ancorar com eficiência sondas capazes de mimetizar sistemas biológicos e dar sítios de reconhecimentos celulares, através de ligações covalentes, tem sido intensificado.

Os desafios para uma funcionalização inteligente levaram ao desenvolvimento de “ligações químicas”, mais seletivas no acoplamento covalente de grupos funcionais sob leve condições aquosa.<sup>77</sup> Até agora, poucos métodos têm sido aplicados em acoplamento químico de biomoléculas em nanopartículas. Entre eles, o acoplamento de amino-ácido é um dos mais aplicados universalmente. Como exemplo, o ácido fólico, que possui um grupo ácido carboxílico, tem sido conjugado com nanopartículas revestidas em sua extremidade por grupos  $\text{NH}_2$ . Tais nanopartículas têm sido preparadas por polimerização em situ por comonômeros funcionalizados com aminas ou para síntese de copolímeros anfífilicos que servem como surfactantes e modificadores de superfície em uma técnica de nanoprecipitação.<sup>78</sup> O ácido fólico foi, então, conjugado na superfície da nanopartícula com sucesso, usando  $\text{N,N}'$ -diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Além disso, a introdução de grupos tiois à superfície das nanopartículas abre possibilidade de conjugação do ligante. Especialmente em reações de conjugação entre tiois maleimidas (acoplamentos tiol-maleimida), devido à sua seletividade e reatividade em condições brandas, têm recebido crescente interesse. A conjugação do anticorpo ou proteína é geralmente realizada utilizando ligações cruzadas com o  $m$ -maleimidobenzoil- $N$ -hidroxisuccinimida éster (MBS) que oferece dois sítios de ligação um grupo amino primário (presente em anticorpos, medicamentos e peptídeos específicos) e uma função tiol.<sup>79</sup> Tais reações de acoplamento tem sido quantitativas em condições fisiológicas.<sup>80-82</sup>

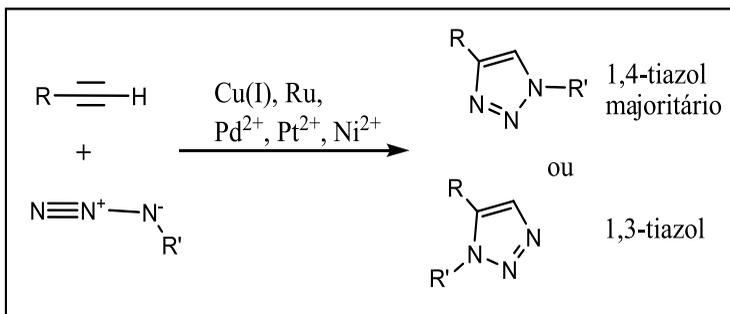
A busca por ligações mais eficientes e com rendimentos quantitativos satisfatórios no ancoramento de moléculas biotivas cresceu com as reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre espécies

funcionalizadas por um grupamento azida, de um lado, e um alcino terminal do outro catalisadas por cobre. A reação básica, que hoje é conhecida por “*click chemistry*” é uma variante da reação de cicloadição 1,3-dipolar Huisgen entre a ligação C-C tripla e ligações triplas C-N, e alquil-/aril-/azidas (ver Figura 12).

A reação de ciclo adição é quando, a partir de duas moléculas insaturadas, obtém-se um composto cíclico. Na formação do ciclo duas novas ligações  $\sigma$  são formadas através de duas ligações  $\pi$ . dipolar [4+2]. Nesta reação um dipolo, um octeto 1,3-dipolar, reage com um dipolarófilo, um sistema com múltiplas ligações.

A reação de *click chemistry* azida/alcino é uma recente redescoberta que cumpre muitas exigências para a afixação de ligantes em polímeros pós-processos de modificação, que incluem frequentemente rendimentos quantitativos, uma alta tolerância a grupos funcionais, uma insensibilidade dessa reação aos solventes, independentemente de sua natureza próticos, apróticos, polar ou não-polar. Estas reações estão dentro de uma série de reações chamado clique, que é definido por um ganho de entalpia termodinâmica de pelo menos 20 kcal/mol, levando a reações caracterizadas por altos rendimentos, condições de reação simples, tempos de reação rápida e alta seletividade. Entre as muitas reações testadas, o processo de cicloadição 1,3-dipolar emergiu como um método de escolha para o efeito os requisitos de ligação de duas moléculas em processo rápido e eficiente.

A ampla aplicação da reação como uma reação do tipo *click chemistry* se deu após a descoberta central de que o processo Huisgen é puramente térmico pode ser extremamente acelerada pela adição de várias espécies de metais (Ru, Ni, Pt, Pd), mas principalmente por espécies Cu(I), dentro do sistema de reação.<sup>83</sup>



**Figura 12.** Ilustra as cicloadições 1,4 e 1,3-dipolar catalisada por diferente sais de metais.

A escolha da técnica apropriada para a modificação da superfície das nanopartículas e biomoléculas é, portanto, crucial. Deve-se notar que as análises de reconhecimento biológico são no entanto, necessário para testar a biodisponibilidade das moléculas.

### **3.9 Funcionalização da superfície de macromoléculas com sondas específicas**

O primeiro grupo é composto de macromoléculas bioativas (tais como polissacarídeos, oligopeptídeos), que não interagem especificamente com os tecidos. Entre eles, polissacarídeos são de grande interesse, especialmente para conferir as nanopartículas propriedades bioadesivas e mucoadesivas.<sup>84, 85</sup> Um exemplo, pode-se citar as nanopartículas revestidas por dextrana que apresentaram um tempo de permanência prolongada no sangue, devido tanto a sua dimensão, como também das propriedades de revestimento de sua camada. Além disso, este tipo de nanopartículas decoradas por dextrana permite a segmentação dos tecidos específicos, como os linfócitos ou tumores cerebrais.<sup>6</sup>

O revestimento de nanopartículas por quitosana apresenta um grande interesse, nas propriedades cumulativas como mucoadesão e aumento de permeabilidade, sem qualquer dano à membrana irreversível. Além disso, as nanopartículas recobertas por quitosana também interagem com ácidos nucleicos (oligonucleotídeos de DNA).<sup>85</sup>

A combinação de nanopartículas poliméricas solúveis funcionalizadas com ácido hialurônico possibilitam a fabricação de um sistema de transporte eficaz para a preparação de uma série de colírios, com o tempo prolongando de residência ocular.<sup>86, 87</sup>

Finalmente, considerando a grande variedade de polissacarídeos na natureza, pode-se imaginar a preparação de superfície de nanopartículas de engenharia, apresentando uma superfície específica, adaptada para o efeito de segmentação.

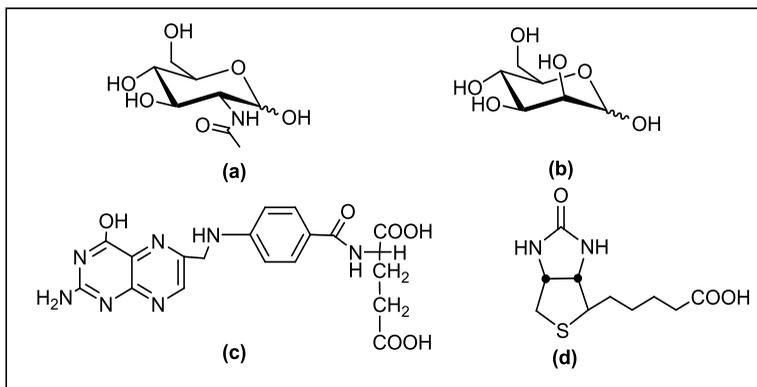
Para aumentar a captura rápida das nanopartículas pelo sistema reticuloendotelial (SRE) e obter um aumento considerável na circulação sanguínea, pesquisadores optaram por revestir nanopartículas com PEO, mas também por dextrana e heparina.<sup>66, 74, 88, 89</sup>

O desenvolvimento de nanoestruturas organizadas a base de carboidratos nos últimos anos tem intensificado interesses biomiméticos ou da preservação ambiental e valorização dos recursos naturais. As dificuldades associadas à modificação química de oligo-e polissacarídeos em termos de solubilidade e seletividade têm facilitado o

uso generalizado de monossacarídeos e dissacarídeos, refletindo apenas parcialmente o potencial dos polissacarídeos. Dessa forma, são muitas as possibilidades dos oligossacarídeos anfífilos poderem gerar estruturas organizadas à escala nanométrica.

Um dos maiores desafios é definir o vetor ideal das moléculas ou ligantes para o transporte específico das nanopartículas ao tecido-alvo. A estratégia depende da capacidade da segmentação das sondas se ligarem especificamente a receptores da superfície celular e assim as nanopartículas atingiriam especificamente as células alvo. Com a finalidade de superar as dificuldades de modificações e solubilidade faz-se o uso de uma variedade de ligantes específicos, tais como mono-ou oligossacarídeos, biotina ou ácido fólico, que são amplamente utilizados e ancorados aos anfífilos através de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações covalentes. A Figura 13 ilustra uma variedade de ligantes específicos que são geralmente utilizados como sondas bioativas para a funcionalização da superfície das nanopartículas.

Entre eles, mono ou oligossacarídeos são de especial interesse. De fato, na superfície celular, carboidratos, carboidratos de glicoproteínas e glicolípídeos funcionam como sítios de reconhecimento entre células ou células e microorganismos.<sup>90, 91</sup>



**Figura 13.** Exemplos de estruturas que podem ser utilizadas como sondas biológicas tipos de ligantes que podem ser utilizados para funcionalização das nanopartículas: **(a)** N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), **(b)** manose, **(c)** ácido fólico e **(d)** biotina.

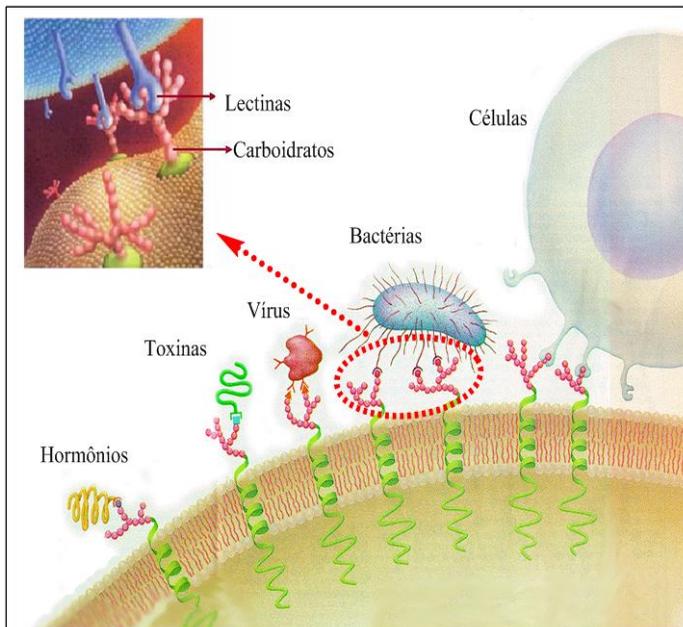
### 3.10 Lectinas

As lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas multivalentes que se ligam especificamente e reconhecem complexos de açúcar ligados a proteínas, lipídios e anfífilos funcionalizados.<sup>92-95</sup> Existem muitas famílias diferentes de lectinas com estruturas diversas e especificidades. Embora originalmente isoladas de fontes vegetais, são encontradas em diferentes formas de vida, como animais, bactérias e vírus.<sup>96</sup> Devido à abundância e sua facilidade relativa de purificação as lectinas tem sido amplamente caracterizadas e utilizadas em diferentes áreas da biologia, bioquímica e farmacêutica.

Apesar de sua abundância em muitas plantas, as lectinas extraídas de plantas não possuem sua verdadeira função fisiológica claramente definida. Entre algumas funções propostas para essas lectinas estão: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição do crescimento de fungos ou atividade inseticida.<sup>97, 98</sup>

Atualmente as lectinas têm atraído o interesse dos pesquisadores de diversas áreas, em função da particularidade de se ligarem especificamente a carboidratos e agirem como mediadores de reconhecimento celular numa variedade de sistemas.<sup>99</sup> Cada molécula de lectina contém normalmente, dois ou mais sítios de reconhecimento, ou seja, são di-ou polivalentes. Portanto, quando reagem com as células, por exemplo, eritrócitos, estes não só combinam com os açúcares em suas superfícies, mas também promovem o *cross-linking* das células e sua precipitação posterior, um fenômeno que se refere com aglutinação das células. Um grande atributo é hemaglutinação, que é usada rotineiramente para a detecção e caracterização de funções biológicas. Desde então as lectinas encontraram cada vez mais aplicações nas separações e caracterizações de glicoproteínas e glicopeptídeos, no acompanhamento de mudanças na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos na diferenciação de células cancerígenas e na marcação de células sanguíneas e bactérias, entre outras.<sup>100</sup>

Atualmente o grande interesse é planejar moléculas que possam se auto-associarem em diferentes morfologias para encapsular medicamentos em sistemas nano e microparticulados contendo lectinas para tratamento de doenças infecciosas que acometem grande parte da população mundial, tais como neoplasia maligna, tuberculose e viroses.



**Figura 14.** Papel de glicoconjugados localizados na superfície da célula. Representação esquemática de exemplos de interações entre lectina-carboidrato.

Há uma grande variedade de lectinas que possuem uma elevada diversidade estrutural. O número de estruturas cristalinas de lectinas sempre está crescendo, hoje no CERMAV, há disponível um banco de dados com estrutura tridimensional de cerca de 770 lectinas, (o banco de dados das lectinas está disponível em <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines>).<sup>101</sup>

O banco de lectinas é composto por 48 famílias estruturais diferentes, portanto, incluindo, 6 de origem vegetal, 10 de origem bacteriana, 18 de origem animal, 5 famílias de vírus, 8 de origem de fungos e uma família de algas, ver Tabela 1.<sup>101</sup>

**Tabela 1.** Estruturas tridimensionais das lectinas.

Origem	Exemplos de lectinas	de Nativa	Complexado	Total	
Plantas	Concanavalina (ConA)	A	106	201	307
Bactérias	Toxina da cólera		37	79	116
Animais	Helix pomatia agglutinin		80	152	232
Vírus	Hemaglutinina de vírus Capsídeo do rotavírus		43	25	68
Cogumelos	Lectinas cogumelos	de	17	23	40
Algas	Griffithsi		2	7	9
<b>Total</b>			<b>285</b>	<b>487</b>	<b>772</b>

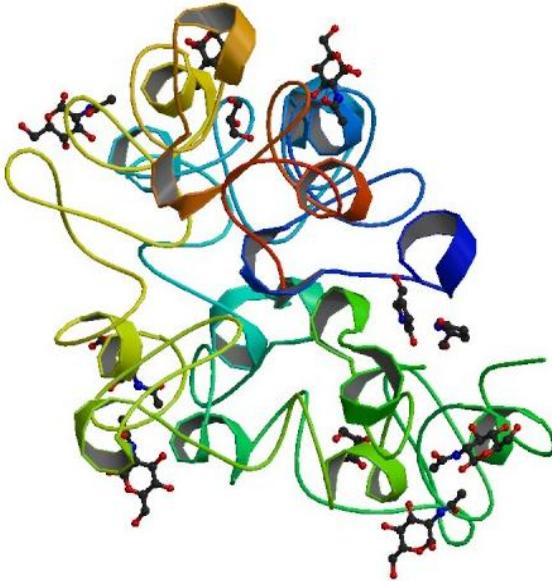
### 3.10.1 Lectina da aglutinina de germe de trigo (WGA)

A aglutinina de germe de trigo (WGA) foi caracterizada em 1974, como uma molécula de massa molecular igual a 17 quilodalton (kDa) e coeficiente de sedimentação 2,1S, em solução ácida, porém como um dímero de 35 kDa, em pH neutro.<sup>102</sup> A WGA possui afinidade com resíduos de N-acetil-glucosamina, existindo dois sítios de ligação por molécula, mais também possui alta afinidade a di e trisacarídeos  $\beta$ -1,4 ligados. Além destes, possui afinidade aos resíduos de ácido siálico.<sup>103, 104, 105</sup>

De acordo com Green e colaboradores a lectina WGA, em condições apropriadas como baixas doses e na presença de células mononucleares, estimula *in vitro* a síntese e a secreção de imunoglobulinas por linfócitos B.<sup>105</sup>

Ito e colaboradores estudaram vinte e duas lectinas em relação a sua habilidade de produzirem interferon, em cultura de células esplênicas de camundongos. Os autores observaram que entre as lectinas com especificidade para os resíduos de D-manose, D-glucose ou GlcNAc, algumas com maior atividade mitogênica como Con A induzem a produção de INF- $\gamma$  (interferon-gama), enquanto que WGA induz a síntese de INF- $\beta$  (interferon-beta). WGA também induz a produção de interferon na circulação após injeção intraperitoneal em camundongos.<sup>106</sup>

As estruturas cristalinas de alta resolução das lectinas WGA e aglutinina do amendoim (PNA) são representadas abaixo (Figuras 15 e 16).



**Figura 15.** Estrutura cristalina da lectina WGA em alta resolução complexada com carboidrato 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose (GlcNAc).<sup>104,105</sup>

### 3.10.2 Lectina da aglutinina do amendoim (PNA)

A PNA é uma lectina não glicosiladas homotetramérica, caracterizada como uma molécula de massa molecular igual a 110 kDa que tem uma alta especificidade com galactose e lactose e um especificidade menor com outros carboidratos.<sup>107</sup>



**Figura 16.** Estrutura cristalina da lectina PNA em alta resolução complexada com carboidrato  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosose (Lac). As bolas representam os contra-íons manganês e cálcio.<sup>104,105</sup>

### 3.11 Interação de anfífilos funcionalizados por (oligo-e polissacarídeos) com lectinas

Nas últimas décadas, ocorreu uma mudança do foco de estudo de auto-associações e interações entre surfactantes iônicos e polímeros, por anfífilos ou copolímeros em bloco, funcionalizados com (oligo-e polissacarídeos), oligopeptídeos, ou sondas bioativas visando à preparação e obtenção de partículas em solventes aquosos com diferentes morfologias, com intuito de estudar estes sistemas coloidais na ausência e na presença de lectinas específicas.<sup>108, 109</sup>

Os mecanismos de reconhecimento são essencialmente baseados em interações específicas entre os carboidratos e proteínas solúveis. A rede de comunicação baseada em interações carboidratos-proteínas é crucial em uma variedade de importantes fenômenos biológicos como crescimento celular, inflamação, câncer e infecções virais e bacterianas. Aproveitando-se dessas interações específicas entre lectina-carboidrato, numerosos glicomiméticos têm sido desenvolvidos, com fins de diagnósticos e terapêutica.<sup>73, 93-95, 110</sup>

Em particular, a entrega de um fármaco mediada por carboidrato permite alvejar células que possuem glicoreceptores em sua membrana

plasmática. Esse tipo de direcionamento de princípios ativos é considerado como um dos caminhos mais promissores no direcionamento específico celular. Na verdade, as membranas de lectinas de alguns tipos de células são capazes de internalizar seus ligantes e, conseqüentemente, os glicoconjugados que são reconhecidos por estas lectinas que podem ser utilizadas como transportadores eficientes de nutrientes e princípios ativos.<sup>110, 111</sup>

Embora as propriedades de superfície de glicosídeos anfífilos já tenham sido extensivamente estudadas, poucos estudos mencionam o uso da parte sacarídica para a segmentação de receptores específicos. Lee e colaboradores foram capazes de demonstrar que as estruturas de anfífilos funcionalizadas com manose auto-associam em diferentes morfologias e interagem com a lectina ConA e com receptores pili do tipo 1 encontrada na bactéria *Escherichia Coli*, ou também chamado de manose-sensitivo, porque adere a receptores de manose.<sup>71-73</sup>

A síntese e caracterização de carboidratos glicoconjugados com inserções de cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicos foi descrita por Thomas e colaboradores que demonstrou a auto-associação espontânea desses surfactantes em vesículas a qual serviu de modelo para investigar as interações proteína-carboidrato e agregação desses surfactantes.<sup>112</sup>

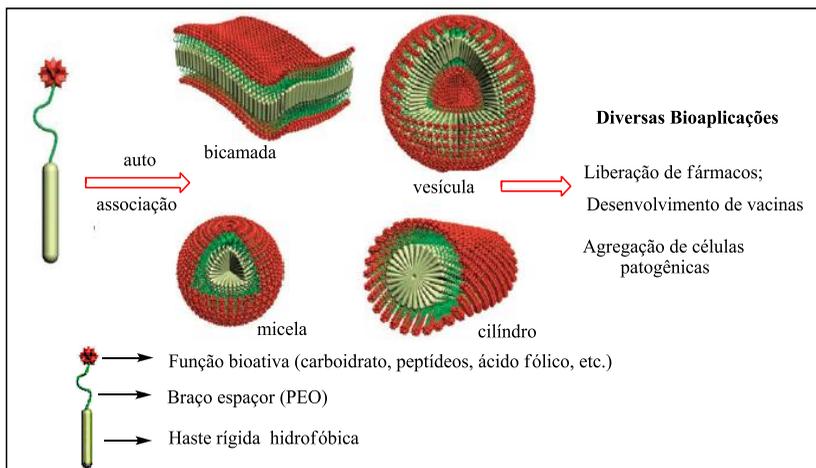
De acordo com Rieger e colaboradores uma série de copolímeros em bloco do tipo poli(óxido de etileno)-*b*-poli(-caprolactona) PEO-*b*-PCL foram sintetizados e funcionalizados com o carboidrato manose, e estudaram a auto-associação e interação específica dessas nanopartículas com lectina BclA produzida pela bactéria *E. Coli.*, através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e Cryo-MET.<sup>113, 114</sup>

As nanopartículas a base de metais têm atraído recentemente interesse para atuarem como novos materiais e trazerem novas aplicações em sistemas biológicos, principalmente as funcionalizadas por carboidratos que podem ser reconhecidos por proteínas específicas e podem facilmente ser detectadas, porque exibem uma cor intensa na região do visível.<sup>115, 116</sup>

Lin e colaboradores desenvolveram nanopartículas de ouro funcionalizadas com o carboidrato manose e estudaram a ligação seletiva dessas nanopartículas com a enterobactéria *E. Coli.* pili do tipo 1 por imagens de MET.<sup>117</sup>

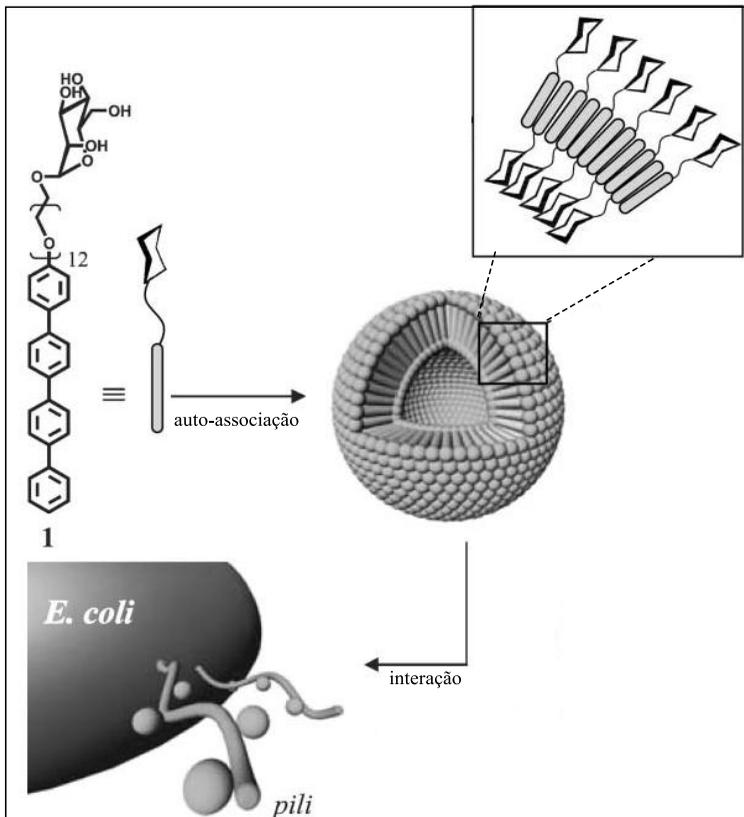
Desta maneira, várias estruturas oligossacarídicas são estudadas em função das propriedades das nanopartículas. Estruturas manosiladas, galactosiladas ou ramnosiladas têm sido usadas como uma forma de vetorizar as partículas em receptores específicos nos pulmões, fígado ou células da epiderme, liberando controladamente os fármacos

encapsulados e nutrientes.<sup>34, 73, 118-120</sup> A Figura 17 ilustra estruturas que podem associarem em diferentes morfologias, dependendo de sua fração hidrofóbica e da metodologia de preparação.



**Figura 17.** Ilustra auto-associação de nanoestruturas bioativas.<sup>31</sup>

A Figura 18, ilustra a formação de nanopartículas do tipo vesiculares recobertas no seu exterior por unidades do carboidrato manose e também um reservatório interno recoberto por unidades do mesmo carboidrato, possibilitando assim a incorporação de fármacos hidrofílicos, proteínas, vacinas e moléculas para liberação em alvos específicos, tais como o sistema linfático, cérebro, quando essas nanopartículas interagem especificamente com a enterobactéria *E. Coli. pili* do tipo 1.<sup>71</sup>



**Figura 18.** Representação esquemática da interação das nanopartículas revestidas por unidades do monossacarídeo manose com receptores pili do tipo 1 encontrada na bactéria *Escherichia Coli*.<sup>71</sup>

### 3.12 Nanopartículas direcionadas a sítios específicos

A possibilidade de direcionar nanopartículas carregadas com fármacos ou nutrientes diretamente ao alvo específico e somente nesta região liberar a quantidade exata de nutriente ou medicamento necessário, tem sido um dos maiores desafios para os cientistas da área médica. Um sistema micelar polimérico ideal retêm o fármaco encapsulado no fluxo sanguíneo, e o libera preferencialmente em um relativo curto espaço de tempo, somente após alcançar o local de ação.<sup>51, 69</sup>

Muitas abordagens são empregadas tanto na produção, transporte das nanopartículas, estabilidade física como nas interações em meio aquoso entre os grupamentos hidrofóbicos do polímero como os do fármaco que geralmente são hidrofóbicos.

Como o intuito principal é a área biomédica, vários trabalhos na literatura têm destacado a importância do aprimoramento de novos sistemas em que moléculas ativas, podem ser incorporadas e liberadas por nanopartículas micelares de copolímeros.

Dessa forma, cada vez mais é importante aprimorar e sintetizar novos copolímeros, caracterizá-los e estudar mais a fundo as forças que governam as interações entre os copolímeros e os fármacos em solução.

O tamanho das partículas é uma das propriedades que influencia o tempo de circulação e distribuição do fármaco nos órgãos, assim como seu mecanismo de entrada nas células e a cinética e extensão de absorção celular.<sup>52</sup> Devido ao seu tamanho inferior a 100 nm as micelas de copolímeros em bloco podem passar através dos capilares dos tecidos tumorais permitindo a orientação seletiva passiva dos agentes antitumorais.<sup>11</sup>

Dois mecanismos podem ser descritos para o direcionamento das micelas em regiões específicas, o direcionamento passivo e o ativo. O direcionamento passivo envolve a acumulação de agentes quimioterápicos em tumores sólidos como resultado do aumento da permeabilidade vascular dos tecidos tumorais, comparado aos tecidos normais. E o direcionamento ativo envolve a modificação da cadeia final da parte hidrofílica do copolímero com ligantes que são seletivamente reconhecidos por receptores das superfícies das células de interesse.<sup>11, 69</sup>

Os tumores cerebrais continuam a ser um problema de saúde mundial. Em recentes meta-análises, embora a quimioterapia mostrou um benefício de sobrevivência para os pacientes glioma de alto grau, os resultados ainda são modestos.<sup>121, 122</sup> Para ser eficaz, um agente quimioterápico deve ser exposto às células do tumor cerebral em concentrações que podem superar a resistência e mecanismos intrínsecos. No entanto, isso é difícil para a maioria das drogas, devido a barreira hemato-encefálica (BBB), que é formada por um rede de células endoteliais e capilares hermeticamente fechadas no cérebro. Estima-se que menos de 1% dos compostos de circulação, são capazes de chegar a vascularização de um tumor no sistema nervoso central (SNC) através de uma administração sistêmica.<sup>123</sup> Neste sentido vem se aprimorando modificações de lipossomas que possam chegar a tais funções do neuroeixo.

Du e colaboradores desenvolveram nanopartículas constituídas de PEO, incorporados pelo fármaco tamoxifen (TAM) e outras com o fármaco cloridrato de topotecano e recobertas através da bioadesão da lectina WGA. Os estudos demonstraram a não degradação das nanopartículas em grandes quantidades de pepsina, tripsina, pancreatina e elastase e apresentaram longa circulação e estabilidade, além disso foram eficazes em superar a BBB e entregar o fármaco.<sup>124</sup>

Licciardi e colaboradores sintetizaram micelas de copolímeros em bloco funcionalizados com ácido fólico e avaliaram a solubilização de dois fármacos hidrofóbicos anti-câncer.<sup>125</sup> Os estudos mostraram um considerável potencial destes nanocarreadores tumor-seletivos na liberação dos fármacos.<sup>125</sup> Os mesmos autores investigaram também copolímeros biocompatíveis funcionalizados com ácido fólico para aplicações na terapia do gene, baseados nas estratégias de direcionamento celular.<sup>126</sup>

O mecanismo de liberação do conteúdo de fármaco da micela exclusivamente a um alvo específico somente será efetivo quando a liberação prematura do fármaco do interior das micelas é minimizada antes de se atingir o alvo. O segredo para se prolongar o tempo de circulação da micela polimérica no fluxo sanguíneo é reduzir a taxa de reconhecimento não específico e a captura pelo SRE. Para isto, a estratégia tem sido a alteração da composição da superfície da nanopartícula, tornando-a mais hidrofílica, para reduzir a adsorção de proteínas plasmáticas e evitar a sua rápida eliminação pelo SRE.<sup>11, 51, 56</sup>

Alguns exemplos de sistemas poliméricos que tem sido utilizados incluem polissacarídeos, poli(acrilamidas), poli(vinil álcool), poli(n-vinil-2-pirrolidona), poli(etileno glicol), poli(etileno imina) copolímeros contendo PEO. A funcionalização das micelas com oligo (peptídeos) é também de interesse, não somente para o desenvolvimento de sistemas de liberação direcionada, mas porque pode também ser usada para estudar o efeito de cargas sobre o comportamento farmacocinético das micelas. Estas unidades podem ser ligadas nas superfícies das partículas por meio de interações eletrostáticas ou por meio de ligações químicas.<sup>69, 127</sup>

As nanopartículas micelares podem, portanto, apresentar sítios de reconhecimento celular na sua superfície, encapsular substâncias ativas hidrofóbicas (fármacos, aromas, essências e partículas magnéticas) e responder a estímulos externos.<sup>57</sup>

A aplicação das micelas poliméricas como sistemas carreadores de fármacos, teve início com os trabalhos do grupo liderado por Ringsdorf em 1984.<sup>128</sup> Partindo de um copolímero de poli(óxido

etileno)-b-poli(L-lisina), fixaram covalentemente o fármaco ciclofosfamida sobre o bloco de L-lisina, conduzindo a formação de micelas com um núcleo hidrofóbico de lisina modificada, circundada por PEO.<sup>51, 129</sup>

Kataoka e colaboradores começaram a publicar trabalhos relacionados ao tema no início dos anos 90.<sup>56</sup> Seus trabalhos recentes ilustram os avanços nesta área.<sup>56,72</sup> De acordo com estes pesquisadores, três sistemas têm sido considerados para o uso de micelas de copolímeros em bloco em processos de liberação de fármacos: micelas formando conjugados de copolímero e fármaco, onde este é ligado covalentemente a uma das seqüências do copolímero; fármacos não covalentemente incorporados às micelas; e os complexos polieletrólitos formados entre polinucleotídeos e copolímeros em bloco catiônicos.

Várias combinações entre blocos hidrofílicos e hidrofóbicos conduzem a uma gama de possibilidades para a área de liberação de fármacos, com trabalhos cada vez mais elaborados. Recentemente Schmidt e colaboradores investigaram a formação de nanopartículas de poliestireno-b-poli(2-fosfatetil metacrilato-stat-hidroxietyl metacrilato) (PS-b-P(PEMA-stat-HEMA)) biofuncionalizadas com Annexin-A5, que são proteínas hidrofílicas que se ligam a fosfolipídeos carregados negativamente.<sup>21</sup> Este tipo de interação é associado *in vivo* com uma variedade de processos em membrana extracelular. O trabalho mostra a síntese, manipulação e propriedades das nanopartículas com potencial aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Xie e colaboradores prepararam novos anfifílicos conjugados com Paclitaxel e os estudos de liberação *in vitro* mostraram que a taxa de liberação depende dos valores de pH. Os resultados demonstraram que o fármaco pode ser liberado das nanopartículas sem apresentar citotoxicidade, e que o processo de liberação é mais favorecido em menores valores de pH (4-5) do que em condições neutras (pH 7.4).<sup>130</sup>

O grupo de pesquisa liderado por Nakatsubo concentrou esforços na síntese de copolímeros em bloco com derivados de celulose.<sup>131, 132</sup> Liu e Zhang sintetizaram novos copolímeros em bloco baseados em dextrana (um polissacarídeo de ocorrência natural) e poli( $\epsilon$ -caprolactona).<sup>133</sup>

Recentemente Gaucher e colaboradores sintetizaram a partir do PEO funcionalizado com grupamentos aminos e hidróxidos, alguns copolímeros dibloco e multiblocos e introduziram através de incorporação física os fármacos Paclitaxel e Doxorubicin no interior das micelas, por método de diálise e microemulsão óleo em água (o/w),

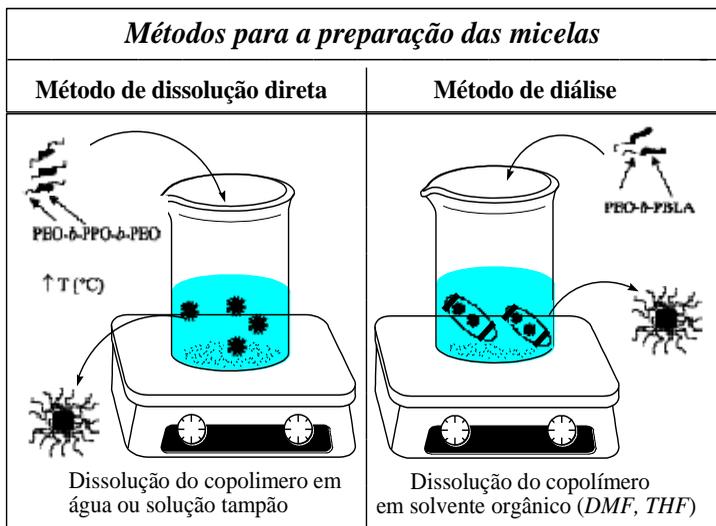
com finalidade de acompanhar a estabilidade micelar, através da força iônica.<sup>80</sup>

### 3.13 Técnicas de preparação de nanopartículas

Nas últimas décadas, várias técnicas foram desenvolvidas para preparar sistemas de micro e nanopartículas poliméricas.

As partículas poliméricas podem ser preparadas por métodos físicos tais como separação de fases, evaporação do solvente e secagem em aspersão (*spray drying*) que tem sido extensivamente estudada. Os métodos químicos incluem emulsão, suspensão, precipitação, dispersão polimerização interfacial, suspensão-policondensação ou poliadicação e miniemulsão.<sup>134, 135</sup>

A escolha do método depende principalmente da solubilidade do copolímero em água, porém, convencionalmente, as partículas são preparadas principalmente por dois métodos: o de dissolução direta e o método de diálise (Figura 19).<sup>52, 136</sup>



**Figura 19.** Representação esquemática dos dois principais métodos de preparação de micelas de copolímeros em bloco.<sup>52</sup>

O método de dissolução direta envolve a adição do copolímero em meio aquoso a uma concentração acima da *cmc*, e algumas vezes

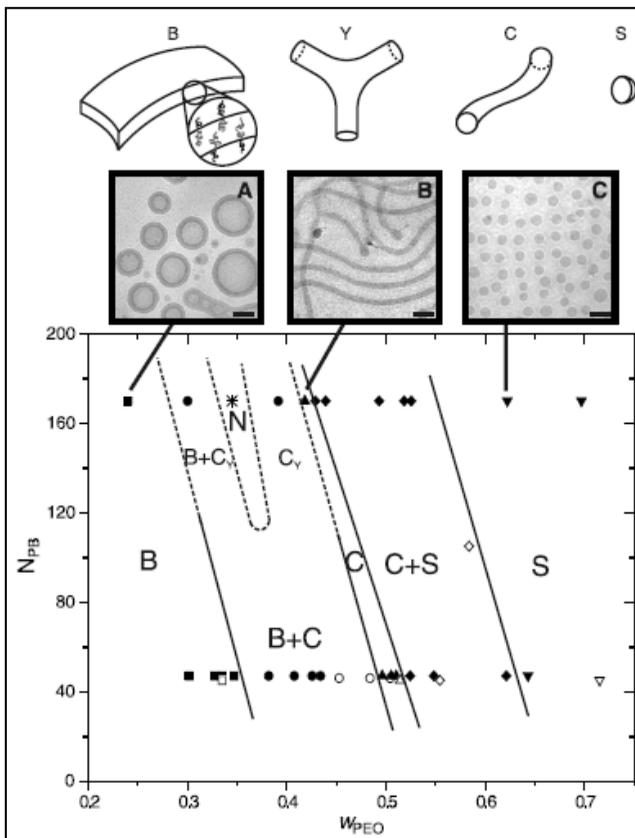
esta mistura é aquecida para garantir a micelização. Este método é escolhido para copolímeros que são solúveis em água.<sup>24, 137</sup>

O método de diálise é utilizado quando o copolímero não é solúvel em água. Neste caso o copolímero é primeiramente dissolvido em um solvente orgânico comum miscível em água, como tetrahidrofurano (THF) ou dimetilformamida (DMF). Durante o processo de diálise a micelização é induzida pela evaporação do solvente orgânico. O tamanho e distribuição de tamanho, bem como outras propriedades vão depender do tipo de solvente utilizado.

### 3.14 Morfologia

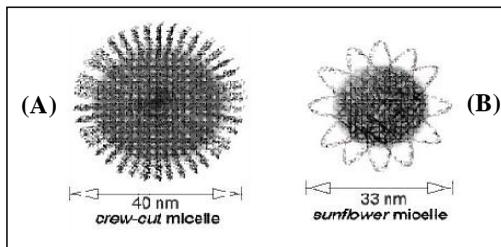
Através de um diagrama de fases é possível prever qual a morfologia que o copolímero ou anfifílicos do tipo rod-coil adotam, quando dissolvido em um solvente bom termodinamicamente para os diferentes blocos, e depositado na forma de filme ultrafino sobre a superfície de um substrato (Figura 20). As diferentes morfologias são dependentes de fatores importantes como massa molar, fração em volume dos diferentes blocos, adição de aditivos, bem como da sua incompatibilidade e também pelo método de preparação.<sup>138</sup> Entre as diferentes morfologias podemos encontrar esferas, cilindros, vesículas e lamelas em junções em y.

A variedade dessas morfologias tem sido caracterizada principalmente pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz. Esta diversidade pode ser alcançada devido às diferentes frações em volume dos segmentos hidrofílico e hidrofóbico e também pelo método de preparação.



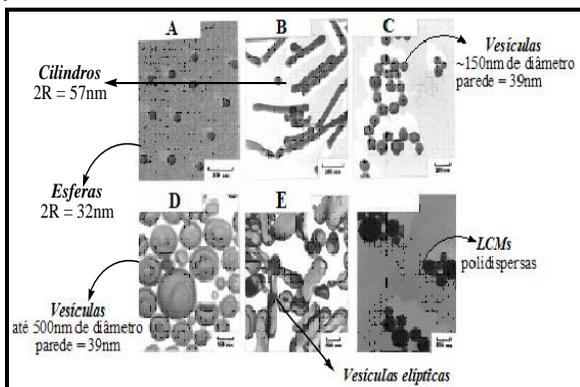
**Figura 20.** Representação esquemática das morfologias que podem ser obtidas pelas cadeias dos copolímeros em bloco poli(1,2-butadieno-*b*-poli(óxido etileno)) PB-*b*-PEO,  $N_{PB}$  e  $W_{PEO}$  são o grau de polimerização e a fração da massa hidrofílica do PEO, respectivamente, onde B vesículas ou bicamadas, C cilindros e S esferas.<sup>139</sup>

Micelas do tipo estrela são esféricas, com pequenos núcleos e grande revestimento, e formam-se quando o comprimento do bloco solúvel é consideravelmente maior do que o bloco insolúvel. Já as micelas do tipo “*crew-cut*” são estruturas com grandes núcleos e revestimentos curtos, formados por copolímeros assimétricos com blocos insolúveis relativamente longos (Figura 21).<sup>49, 140-142</sup>



**Figura 21.** Representação esquemática de micelas do tipo “*crew-cut*” (A) e do tipo “*sunflower*” (B).

A Figura 22 ilustra exemplos de diferentes morfologias obtidas de micelas do tipo “*crew-cut*” formadas pelo copolímero dibloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) PS-*b*-PAA com diferentes composições. Estas morfologias consistem em esferas (A), cilindros (B), vesículas (C), vesículas com diâmetros até 500 nm (D) e vesículas com morfologia elíptica (E) e LCMs polidispersas (F).<sup>143</sup> As diversas variações na morfologia podem ser explicadas por um efeito de balanço de forças envolvendo o grau de estiramento dos segmentos que formam o núcleo, da energia interfacial entre o núcleo das micelas e o solvente e das interações entre os segmentos que compõem a casca da micela.<sup>142, 144</sup> Este balanço de forças determina também parâmetros estruturais como tamanho da partícula, dimensões do núcleo e número de agregação.<sup>52</sup>



**Figura 22.** Diferentes morfologias para micelas de (A) PS<sub>168</sub>-*b*-PAA<sub>59</sub>, (B) PS<sub>490</sub>-*b*-PAA<sub>87</sub>, (C) PS<sub>500</sub>-*b*-PAA<sub>58</sub>, (D) PS<sub>390</sub>-*b*-PAA<sub>41</sub>, (E) PS<sub>420</sub>-*b*-PAA<sub>26</sub>, (F) PS<sub>420</sub>-*b*-PAA<sub>21</sub>.<sup>143</sup>

As várias morfologias podem ser usadas para diferentes aplicações em liberação de fármacos, uma vez que estas diferenças tem influência direta sobre a capacidade de encapsulação e a cinética de liberação. Por exemplo, as micelas do tipo bastão podem ser usadas para a preparação de formulação aerossol, uma vez que facilitam o acesso a diferentes partes do pulmão. Vesículas podem ser projetadas para conter compostos hidrofílicos, assim como uma combinação entre vesículas e micelas pode ser designada para a liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.<sup>52</sup>

Por este motivo torna-se de extrema importância conhecer as características morfológicas dos sistemas estudados. A morfologia micelar pode ser ajustada por vários parâmetros como temperatura, concentração solvente seletivo, co-solvente, método de solubilização composição do copolímero uso de aditivos, contra-íon (polieletrólito) e a arquitetura das cadeias poliméricas.

## CAPÍTULO 4

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS

#### 4.1 Fluorescência

Estudos fotoquímicos de anfifílicos, copolímeros e interação entre polímeros e surfactantes requerem a presença de um grupo ou molécula luminiscente, isto é, um grupo fluorescente ou fosforescente. Isto pode ser feito, em geral, de duas maneiras: (i) adição de um grupo fluorescente (sonda) à solução ou (ii) marcação dos anfifílicos pela adição de um grupo fluorescente covalentemente ligado a molécula a ser estudado.

A fluorescência é um processo relaxativo emissivo muito rápido, a partir de moléculas no estado excitado. O tempo de vida relativamente curto ( $< 10^{-5}$  s) de uma molécula no estado excitado singlete decorre do pareamento de spins favorável à sua desativação para o estado singlete fundamental.

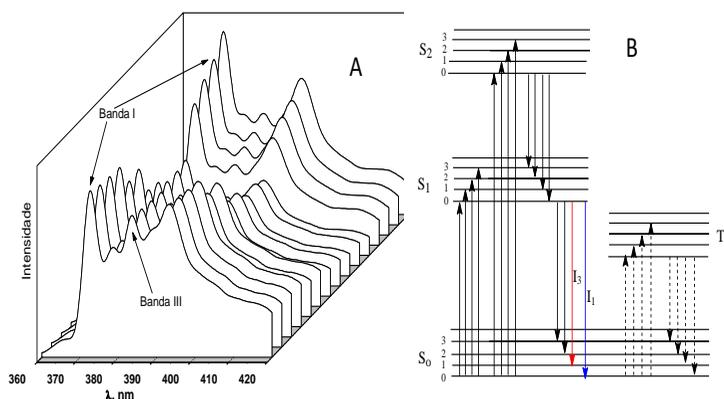
A técnica tem sido amplamente utilizada nas diversas áreas da química, bioquímica e medicina, trazendo numerosas contribuições em análise de proteínas, membranas, ácidos nucléicos e complexos macromoleculares. As sondas fluorescentes podem ser usadas para determinar: (i) *cmc* de copolímeros, surfactantes, (ii) a concentração de agregação crítica (*cac*) de complexos polímero-surfactante; (iii) o número de agregação *n* de surfactantes, copolímeros e complexos polímero-surfactante e (iv) o microambiente (polaridade e microviscosidade) dentro dos complexos.

O pireno (Py), é a sonda fluorescente mais usada. A particularidade é que o espectro de emissão exibe bandas de vibração finas cujas intensidades relativas são sensíveis à polaridade do meio. Enumerando as bandas de vibração de 1 a 5, que são observadas na temperatura ambiente, a banda  $I_3$  em 384,0 nm, que corresponde a transição  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=1}$ , mostra pouca sensibilidade aos solventes, enquanto que a banda  $I_1$  em 372,8 nm,  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=0}$ , muda a intensidade em função do solvente, aumentando em solventes polares.<sup>145</sup> A Figura 23 mostra a variação do espectro de fluorescência do pireno e os diferentes níveis de energia e as transições ocorridas após a excitação da molécula de pireno.

Através da técnica de espectroscopia de fluorescência é possível acompanhar a transferência de moléculas de pireno (e derivados) do solvente (polar) para o interior das micelas (apolar) durante o processo

de micelização dos copolímeros anfifílicos em meio aquoso, através das mudanças do meio. A razão das intensidades entre o primeiro e o terceiro pico ( $I_1/I_3$ ), é sensível às mudanças de polaridade do meio.<sup>146</sup> Deste modo, esta propriedade pode ser utilizada para avaliar a micropolaridade de microambientes de agregados micelares. Valores extremos desta escala de polaridade compreendem 1,84 para a água e de 0,6 para o hexano. Conforme o surfactante, a razão  $I_1/I_3$  varia entre 0,8 e 1,4.<sup>145</sup>

O uso da fotoquímica no estudo de polímeros, copolímeros e anfifílicos, já foi descrito em vários *reviews* na literatura.<sup>146-149</sup>



**Figura 23.** Variação do espectro de fluorescência do pireno com a polaridade do solvente (A) e (B) diagrama mostrando os diferentes níveis de energia e as transições ocorridas na molécula de pireno após a excitação.

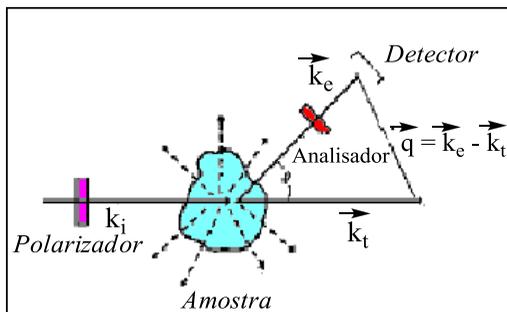
## 4.2 Espalhamento de luz

A absorção não é a única maneira que as moléculas podem interagir com a radiação eletromagnética. Se o comprimento de onda da radiação for muito maior do que qualquer banda de absorção da molécula, o fenômeno do espalhamento de luz pode vir a ocorrer. As moléculas são polarizáveis, isto é, a distribuição de seus elétrons pode ser modificada frente a aproximação de um campo elétrico. A forma clássica da radiação é uma oscilação senoidal no campo eletromagnético. Isto pode produzir uma oscilação nos elétrons de uma molécula. Tais oscilações fariam a molécula atuar como uma pequena

antena, dispersando parte da energia em direções não necessariamente iguais à radiação incidente. Esta é a base do fenômeno de espalhamento de luz (LS).

O espalhamento de luz é um fenômeno que relaciona várias técnicas experimentais e tem sido vastamente utilizado na análise de inúmeros sistemas nos últimos anos.<sup>150</sup> Em razão do avanço do desenvolvimento, o espalhamento de luz estabeleceu-se como uma importante ferramenta no que se refere ao estudo da dinâmica e da estrutura de macromoléculas, sobretudo para sistemas poliméricos.

No espalhamento de luz ocorre a incidência de um feixe de luz monocromático sobre uma amostra e a onda eletromagnética original é espalhada para todas as direções. Um meio perfeitamente homogêneo não é capaz de espalhar luz, isto seria uma situação ideal. No caso de um meio não homogêneo, a luz é espalhada em todas as direções. A intensidade do espalhamento depende, basicamente, do tamanho e morfologia da partícula.<sup>151</sup> Nestes experimentos, a amostra a ser estudada está em uma pequena célula de vidro que está submersa em uma cuba, também de vidro, e preenchida com um solvente de índice de refração semelhante ao do vidro (decalina,  $n_0 = 1,469$  ou tolueno,  $n_0 = 1,497$ ).<sup>151</sup> Com isso minimiza, eventuais reflexões decorrentes da célula e do porta-amostra. Um feixe de luz, normalmente uma fonte de laser de He-Ne, com potência entre 15 e 100 mW incide sobre a amostra e a pequena intensidade de luz refletida é detectada por um detector tipo fotomultiplicador, colocado horizontalmente a um ângulo de espalhamento  $q$  em relação ao feixe de radiação incidente esse detector. A Figura 24 mostra a geometria básica de um experimento de luz convencional.



**Figura 24.** Geometria de espalhamento em um experimento de espalhamento de luz. A subtração vetorial de  $k_e$  (feixe espalhado) e  $k_t$  (feixe transmitido) é igual ao vetor de espalhamento, ( $q$ ). Na Figura,  $k_i$  representa o feixe incidente.<sup>152</sup>

Obtém-se o vetor de espalhamento por intermédio dos vetores envolvidos no fenômeno de espalhamento e o ângulo de espalhamento  $\theta$ .

A radiação incidente apresenta um vetor de onda  $k_i$  paralelo à direção de disseminação, com amplitude de  $2\pi/\lambda$ .

A frequência do vetor de onda da luz espalhada  $k_e$  é idêntico ou muito similar à da radiação incidente. Essa radiação espalhada equivale ao que se tem prudência por espalhamento Rayleigh, desde que a dimensão da partícula sob análise seja bem menor do que  $\lambda$ . Uma vez determinando os vetores  $k_e$  e  $k_i$ , pode-se determinar o parâmetro conhecido como vetor de espalhamento  $|q|$  cujo módulo denominaremos simplesmente  $q$ . Observa-se inserido na Figura 24 que o valor de  $q$  é derivado de uma dada geometria, o qual é simplesmente a diferença vetorial entre  $K_e$  e  $K_i$ , não esquecendo de considerar o valor de  $\theta$  e o índice de refração do solvente onde a amostra esta submergida ( $n_0$ ), uma vez que ocorre uma alteração do comprimento de onda da luz incidência confrontado com o valor no ar.

Defini-se o módulo do vetor de espalhamento pela equação 1:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \text{sen} \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (1)$$

e permite a observação dos objetos, que para nosso caso são anfífilos ou nanopartículas micelares.

Quão menor a amplitude do valor de  $q$  (menor ângulo de observação), maior é a magnitude da estrutura observada. A técnica de espalhamento pode-se manifestar que funciona como um microscópio ao contrário, pois  $q$  possui extensão inversamente proporcional a dimensão da partícula em observação.<sup>151</sup>

Através de medidas da intensidade e direção da luz espalhada, diferentes informações podem ser obtidas.<sup>153</sup> Através da técnica de espalhamento de luz estático (SLS) é possível acompanhar processos que envolvam mudanças de massa molar, conformação e tamanho das partículas e as interações de diferentes partículas entre si e entre moléculas de solvente, além de processos químicos e físicos em função do tempo ou temperatura, tais como transições e separações de fase e cinética de reações de polimerização.<sup>154</sup> A intensidade de luz espalhada é medida em diversos ângulos e para diversas concentrações.

### 4.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) e também designado na literatura com o nome de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento de luz quase elástico (QELS) é capaz de mensurar as flutuações na intensidade de luz espalhada, as quais originam-se de modificações locais do índice de refração da solução, como um resultado da difusão rotacional, difusão translacional e/ou relaxações internas das cadeias poliméricas.

Basicamente, a flutuação medida do sinal da luz espalhada é autocorrelacionada no tempo através de uma função de correlação temporal (FCT). A técnica é eficaz para se detectar flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e densidade na amostra (causas do movimento Browniano). Desta função, é possível obter a taxa de relaxação ( $\Gamma$ ), a qual pode ser relacionada ao coeficiente de difusão translacional ( $D$ ).<sup>155</sup>

O valor de  $\Gamma$  pode ser obtido através da análise de uma função de correlação temporal. O coeficiente de difusão  $D$  é o coeficiente angular de um gráfico da frequência de relaxação  $\Gamma$  ( $\Gamma = \tau^{-1}$ ) em função de  $q^2$ , obtido pela equação 2:

$$\frac{\Gamma}{q^2} \Big|_{q \rightarrow 0} = D_{\text{app}} \quad (2)$$

A extrapolação dos valores de  $D$  obtidos para diferentes concentrações, quando a concentração tende a zero, fornece o coeficiente de difusão à diluição infinita,  $D_0$ .

Um importante parâmetro que pode ser acessado por intermédio de  $D_0$  é o raio hidrodinâmico,  $R_h$ , da macromolécula em solução, aplicando-se a relação de Stokes-Einstein e desde que se conheça a viscosidade do solvente,  $\eta_0$ , e a temperatura  $T$  na qual é realizada a medida. Assim,  $D_0$  pode ser obtido através da equação 3:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta\Gamma} q^2 = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

Na equação 3,  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ).<sup>156</sup>

Quanto ao raio de giro ( $R_g$ ), foi calculada a partir dos valor de  $I(q)$  da intensidade espalhada usando a aproximação da lei de Guinier como segue descrito pela equação 4.<sup>157</sup>

$$\ln I = \ln I_0 - \frac{1}{3}q^2 R_g^2 \quad (4)$$

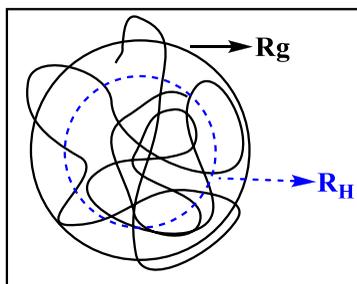
Onde  $I$  é a intensidade de espalhamento e  $I_0$  é a intensidade de espalhamento em  $q = 0$ .

$$\ln I = \ln I_0 - \frac{1}{2}q^2 R_c^2 \quad (5)$$

Atravé da equações 5, obtêm-se o raio da secção transversal ( $R_c$ ), respectivamente. Este parâmetro é obtido a partir da inclinação da reta no gráfico de Guinier. Seguindo este mesmo raciocínio,  $R_g$  e  $R_c$  serão um resultado de  $(-R_g^2/3)$  e  $(-R_c^2/2)$ , respectivamente.<sup>158</sup>

Em sistemas monodispersos e objetos esféricos, a medida de  $D$  somente no ângulo de observação de  $90^\circ$  fornece valores de  $R_H$  bastante confiáveis. Para amostras polidispersas, faz-se necessário o monitoramento das funções de correlação em diferentes ângulos, e o coeficiente de difusão é obtido através da inclinação de  $\Gamma$  vs  $q^2$ .

A ilustração da Figura 25 tenta elucidar as diferenças entre  $R_g$  e  $R_H$  para um novelo polimérico em solução. A linha pontilhada representa a dimensão  $R_H$  e a linha cheia a dimensão  $R_g$ .<sup>151</sup>



**Figura 25.** Ilustração da diferença entre  $R_g$  (linha cheia) e  $R_H$  (linha pontilhada) para um novelo polimérico randômico em solução.<sup>151</sup>

É importante salientar o real significado físico do valor de  $R_H$ . Este equivale a um valor imaginário do raio de uma esfera rígida que difunde com a mesma velocidade que a partícula em estudo. Entretanto,

muitas nanopartículas não são esféricas e estão solvatadas, portanto, o valor de  $R_H$  mensurado reflete um tamanho aproximado da nanopartícula considerando em conta a sua solvatação ou hidratação. A amplitude do tamanho geométrico de uma mesma partícula, que pode ser acessado por outras técnicas tais como microscópicas é, devido a este fato, geralmente um pouco menor que o seu valor de  $R_H$ .

A morfologia da nanopartícula espalhante pode ser prevista combinando-se os resultados de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), SLS e DLS por meio do cálculo do parâmetro sensível à forma ( $\rho$ ), através da equação 6.<sup>151</sup>

$$\rho = \frac{R_g}{R_H} \quad (6)$$

O valor deste parâmetro adimensional leva a uma importante indicação da topologia da nanopartícula espalhante, especialmente para partículas pequenas (com dimensão entre 10-100 nm). A Tabela 2 ilustra os valores de  $\rho$  mensurados teoricamente para as topologias mais frequentemente encontradas.

**Tabela 2.** Valores de  $\rho$  para partículas com topologias típicas.<sup>151, 159</sup>

<b>Estutura</b>	<b><math>\rho</math></b>
Esfera rígida homogênea	0,77
Esfera oca	1,0
<b>Novelo linear monodisperso</b>	
Condição $\theta$	1,50
Bom solvente	1,78
<b>Novelo linear polidisperso</b>	
Condição $\theta$	1,73
Bom solvente	2,05
Micro gel	0,3 – 0,5
Bastão rígido	> 2,0

Através de medidas de DLS, também chamado de QELS, com luz polarizada e despolarizada medem-se flutuações no tempo da intensidade de luz espalhada, causadas pelos movimentos Brownianos das partículas em solução.

Para micelas formadas, por exemplo, por copolímeros em bloco, anfífilos a Tabela 3 correlaciona os parâmetros físico-químicos que podem ser determinados.

**Tabela 3.** Parâmetros físico-químicos e tipo de espalhamento de luz.

<b>Parâmetros Físico-Químicos</b>	<b>Tipo de espalhamento de luz: Estático (SLS) ou Dinâmico (DLS)</b>
Massa molar micelar ( $M_{w,mic}$ )	SLS
Número de agregação ( $N_{agg}$ )	SLS
Raio de giração ( $R_g$ )	SLS
Interações interpartículas ( $A_2$ )	SLS
Raio hidrodinâmico ( $R_H$ )	DLS
Comprimento da casca ( $W$ )	SLS + DLS
Raio do núcleo ( $R_c$ )	SLS + DLS
Compactação do núcleo ( $V_{monomer}$ )	SLS + DLS

A função de correlação da intensidade dispersada foi analisada por meio do método cumulativo e da análise de CONTIN para fornecer o coeficiente de difusão efetivo e o tamanho de partícula correspondente.<sup>160</sup> Normalmente a faixa granulométrica possível de ser analisada por esta técnica é de 5 nm a 5  $\mu$ m.

#### 4.4 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de SAXS podem fornecer valiosas informações sobre a estrutura de macromoléculas, tais como  $R_g$ , tamanho de persistência, forma e tamanho do objeto espalhador.<sup>161, 162</sup> A técnica de SAXS é utilizada para investigar detalhes estruturais de sistemas com comprimentos de correlação na região entre 0,5 e 50 nm. Considerando-se SAXS e SLS, algumas diferenças fundamentais devem ser tornar explícito: a) a radiação eletromagnética difere na amplitude do comprimento de onda (a luz visível apresenta comprimento de onda

entre 370-700 nm enquanto que feixes de raios-X têm comprimento de onda variando entre 0,01 e 0,2 nm); b) a geometria de espalhamento é diferente (enquanto que em SLS convencional acessa-se ângulos de espalhamento na região entre  $20^\circ$  e  $150^\circ$ , os ângulos acessados nos experimentos de SAXS estão geralmente na região entre  $0,5^\circ$  e  $4^\circ$ ) e c) o espalhamento de luz propriamente dito está relacionado com diferenças no índice de refração de uma determinada matriz líquida e a amostra analisada, enquanto que a intensidade de espalhamento de raios-X está relacionada com a diferença na densidade eletrônica entre diferentes partes de um sistema em estudo. <sup>151, 161, 162</sup>



## CAPÍTULO 5

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 5.1 Preparação das nanopartículas

As suspensões das nanopartículas (soluções aquosas micelares -  $C_p$  de 0,10 e 1,30 mg/mL) foram preparadas por dissolução direta dos diferentes anfifílicos sintetizados em água Milli-Q ou em solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$ ) e agitados por 24 horas a 25 °C. As soluções foram filtradas com filtros com porosidade de 0,45  $\mu m$  da (Milli-Pore), a fim de remover a poeira e grandes agregados não micelares.

#### 5.2 Método fluorimétrico

As medidas de fluorescência do estado estacionário do pireno foram executadas em água Milli-Q, a 25,0 °C. Uma solução de pireno  $\approx 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> era preparada em água Milli-Q a partir de uma solução estoque  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> de pireno (Aldrich 99%) em etanol. Para certificar-se de que os dados experimentais eram determinados em uma situação de equilíbrio do sistema, todas as soluções estoques dos anfifílicos foram preparadas rotineiramente com agitação magnética suave por 12 horas. Este procedimento minimiza os erros na intensidade da emissão que ocorre em metodologias alternativas.

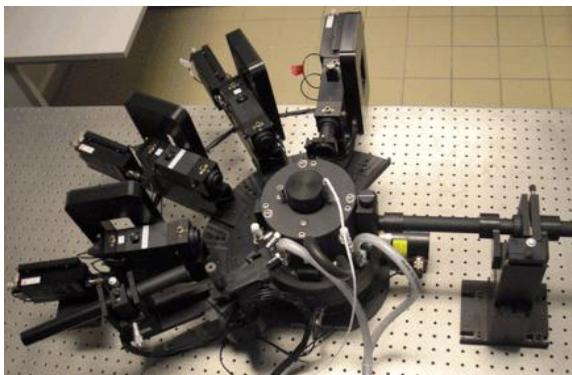
Os espectros de fluorescência do estado estacionário do pireno foram determinados em um espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B equipado com uma cela de quartzo de 10 mm termostatizada a 25,0 °C sob agitação magnética. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas em 336 nm e os espectros de emissão foram corridos de 360 a 500 nm. Tipicamente, os espectros de fluorescência foram realizados após a adição de volumes conhecidos da solução estoque dos anfifílicos. Para cada leitura, a concentração era corrigida devido a diluição ocorrida na cela que previamente continha 1,5 mL de água Milli-Q contendo pireno. A razão  $I_1/I_3$  foi estimada analisando a relação da intensidade máxima do pico em 372,8 nm ( $I_1$ ) e 384,0 nm ( $I_3$ ).

### 5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens MET foram feitas em colaboração com o CERMAV (Grenoble, França). O tamanho e a estrutura da morfologia dos anfílicos foram gravados em filmes Kodak SO163 utilizando um microscópio eletrônico (Philips CM200, Eindhoven) operando em 80 kV. Os negativos foram digitalizados usando uma câmera CCD Kodak Mega plus. Para preparar as amostras MET, 4  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de micelas formadas foi espalhado sobre uma grade de cobre revestido com fino filme de carbono que foram previamente tratadas com UV/ozônio para tornar a superfície hidrofílica. Excesso de solução micelar foi delicadamente removida com papel absorvente. As amostras foram então marcadas negativamente pela adição de uma gota de aproximadamente 4  $\mu\text{L}$  de acetato de uranila 2%, e o excesso de solução foi novamente removido antes da secagem em condições ambiente.

### 5.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Medidas de DLS foram realizadas a temperatura ambiente ( $25,0 \pm 0,1$  °C), para as soluções dos anfílicos em um fotogoniômetro ALV-5000/ALV equipado com um laser de He-Ne com potência igual a 22 mW e ( $\lambda = 632,8$  nm) como fonte de luz. O correlador utilizado foi um ALV e fotodiodos operando no modo de pseudo correlação cruzada. As medidas foram realizadas na região angular de 40° até 140°. Uma fotografia do equipamento utilizado é mostrada na Figura 26.



**Figura 26.** Fotografia digital do equipamento comercial ALV utilizado nas medidas de espalhamento de luz.

## 5.5 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas no European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) em Grenoble-França na Linha de luz D2AM-BM02 e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil).

As amostras analisadas por SAXS foram preparadas pela dissolução direta dos anfifílicos em água e agitados por 24 horas estabilizados a 25 °C. Em seguida as soluções foram colocadas em capilares borossilicato (~ 2 mm de diâmetro) e selados. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 1,608Å, foi selecionado duas distância distintas da amostra ao detector para obtenção de intensidade de espalhamento com valores de  $q$  situados entre 0,15 a 3,0 nm<sup>-1</sup>.

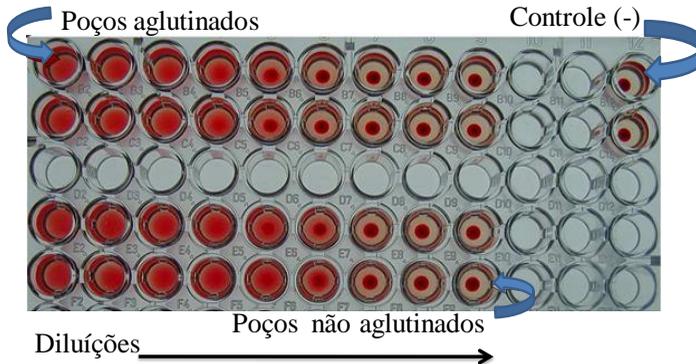
O feixe colimado cruzou as amostras e se espalhou para uma iluminação indireta detector CCD (Princeton Instruments). Em todos os casos, as imagens 2D foram considerados isotrópicos e foram corrigidos, tendo em conta o ruído do detector de escuro e normalizado pela transmissão da amostra. A  $I(q)$  vs curvas  $q$  resultante da integração de 360° azimutham da 2D-padrões foram ainda corrigidos pela subtração do espalhamento do solvente puro (água).  $I(q)$  vs perfil de espalhamento  $q$  das nanopartículas foram montados usando o modelo de copolímero micela esférica desenvolvido por Pedersen e Gerstenberg.<sup>163</sup> Os procedimentos de montagem e outras análises foram realizadas utilizando o software SASfit, que faz uso da abordagem de mínimos quadrados de montagem para minimizar o qui-quadrado ( $\chi^2$ ) parâmetro. O software SASfit foi desenvolvido por J. Kohlbrecher e está disponível on-line.<sup>164</sup>

## 5.6 Ensaios de Inibição da Hemaglutinação (HIA)

Os ensaios de Inibição da Hemaglutinação das lectina WGA e PNA foram realizados em microplacas de titulação utilizando eritrócitos provinientes do sangue de coelho. Os experimentos foram realizados em triplicata de duas diluições em série colocando em cada poço da microplaca 25  $\mu$ L de solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>), em seguida foram colocados ao primeiro poço 25  $\mu$ L (1 mg/mL) das lectina e, posteriormente, uma série de diluições duplas foram produzidas até o vigésimo quarto poço. Em seguida foram adicionados a cada poço 25  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos a 2% provinientes do sangue de coelho em um solução salina

150 mM de NaCl e foram adicionados, misturados e incubados a 37 °C por 30 minutos. Lendo a atividade hemaglutinante.

O anfifílico (6) conjugado com GlcNAc, dissolvidos em uma solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>) concentração final 0,5 mg/mL foram colocados 25 µL aos primeiros poços e posteriormente uma série de diluições duplas foram produzidas até o décimo segundo poço contendo nesses poços 25 µL da mesma solução tampão. Em seguida foram adicionados a cada poço 25 µL da suspensão de eritrócitos a 2% em um solução salina 150 mM de NaCl, misturados e incubados a 37 °C por 30 minutos. Lendo a atividade hemaglutinante.



**Figura 27.** Ilustra exemplos de ensaios de Hemaglutinação em presença de lectina em solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>) sobre uma microplaca de titulação.

## CAPÍTULO 6

### SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

Este capítulo descreve a instrumentação, reagentes específicos utilizados na síntese e caracterização de novos anfifílicos do tipo rod-coil como blocos de construção para biomateriais.

#### 6.1 Reagentes

Poli(óxido de etileno) PEO sigma, Mn = 898 g/mol e (Mw = 590 g/mol), ácido octodecanóico (C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> Sigma, 99%), ácido dodecanóico (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> Sigma, 99%), ácido decanóico (C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> Sigma, 99%), carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Sigma, ≥ 99,5%), iodeto de potássio (KI Sigma, 99%), trifluorometanosulfonato de prata (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Ag Sigma, 99%), propargil álcool (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O Aldrich, 99%), sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub> Sigma, ≥ 99,5%), 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ol (BrC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH Aldrich 97%), 4-bifenil ácido borônico (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BO<sub>2</sub> Aldrich, 99%), tetrakis(trifenilfosfina)-paládio(0) ((PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Pd Sigma, 99%), trietilamina (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N, Et<sub>3</sub>N, Sigma-Aldrich 99,5%), óxido de prata (Ag<sub>2</sub>O Fluka, 98%), *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida (C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>, DCC, Fluka, 98%), 4-Dimetilaminopiridina (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>, DMAP, Aldrich, 98%), cloreto de *p*-Toluenosulfonil (99%, CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>Cl, TsCl), azida de sódio (NaN<sub>3</sub>, 99%), Ascorbato de sódio (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 99%), 2-acetilamino-2-deoxi-D-glucose (GlcNAc) (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>, 99%) e sulfato de cobre CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O foram adquiridos da Acros e utilizados sem purificação prévia. As lectinas WGA e PNA foram adquiridas do Laboratório EY, INC.

#### 6.2 Técnicas e instrumentação

A pureza dos compostos sintetizados foram caracterizados por espectrometria de Infravermelho para os compostos sólidos foram obtidos em pastilha de KBr e para os compostos líquidos em filme, em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FTIR RXI com sistema de registro computadorizado, na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. A determinação da massa molar foi realizado por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS e ESI-MS) obtidos nos aparelhos MALDI-TOF (AutoFlex I Bruker) e CL-ESI/APCI-ITD (Agilent 1100 e Esquire 3000<sup>+</sup> Bruker Daltonics) as análises de alta resolução foram realizadas em espectrômetro

ZABSpec-Tof Micromass no Centro Regional de Medidas Físicas do Oeste da Universidade de Rennes 1, França.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em aparelhos de RMN modelo Bruker AC 300 operando a 300 e 75 MHz, e um espectrômetro Bruker DRX400 operando em 400 e 100 MHz, respectivamente, usando TMS como padrão interno. Os deslocamentos químicos são expressos em parte por milhão ( $\delta$ ) em relação ao TMS, sendo as constantes de acoplamento ( $J$ ) apresentadas em Hertz (Hz). Utilizando os seguintes solventes dimetilsulfóxido DMSO- $d_6$ , MEOD e clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) foram comprados da SDS (Vitry, França).

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CDD), utilizando sílica gel F254 Merck como adsorvente e para a purificação dos compostos através de colunas cromatográficas, utilizou-se sílica gel 60 Merck.

Todos os solventes e reagentes empregados nas sínteses, caracterizações e purificações foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Merck, Fluka) e utilizados sem prévia purificação e a detecção foi conseguida por exposição a vapores de iodo ou pela carbonização com solução de ácido sulfúrico 3:45:45  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : $\text{MeOH}$ : $\text{H}_2\text{O}$ .

A síntese do carboidrato 2-propargil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose (GlcNAc) foi realizado como descrito anteriormente na literatura com exceção do dissacarídeo propargil  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosose (Lac), preparado e gentilmente fornecido pelo pesquisador Sébastien Fort, integrante e líder da equipe Chemistry and Biotechnology of Oligosaccharides (CBO) do CERMAV.<sup>168, 169</sup>

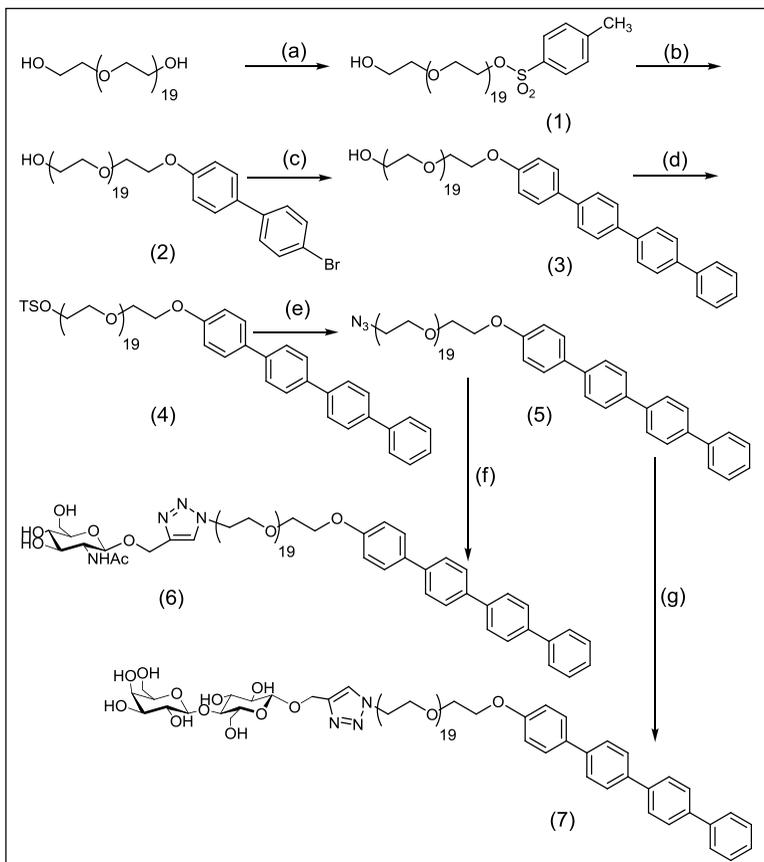
A escolha do monossacarídeo GlcNAc e do dissacarídeo Lac para a síntese dos diferentes anfifílicos, está associada a possibilidade das partículas funcionalizadas serem reconhecidas por receptores específicos e assim abrir uma maior possibilidade das aplicações, de tais anfifílicos como sistemas de vetorização simples e específica do local para entrega da droga, formulações de vacinas e dentre outras aplicações.<sup>107, 108</sup> O dissacarídeo Lac, foi escolhido também devido a possibilidade de obter mudanças estruturais do dissacarídeo através de uma usina celular na qual obtem estruturas de oligossacarídeos bem definidas com bons rendimentos que não podem ser obtidos por outros métodos um resultado da habilidade do CERMAV e desenvolvida por Eric Samain e B. Priem. Onde pode-se obter oligossacarídeos com estruturas bem definidas.<sup>170</sup>

A coloboração com CERMAV, unidade de pesquisa do CNRS, se deu por competências em físico-química (R. Borsali), em Glico-química (S. Fort).

### **6.3 Síntese dos anfifílicos**

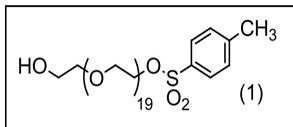
A estratégia da síntese dos novos anfifílicos funcionalizados com o monossacarídeo GlcNAc e o dissacarídeo Lac, consiste na utilização do polímero flexível PEO, como braço espaçor hidrofílico conectado a diferentes partes hidrofóbicas, através de reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre espécies funcionalizadas por um grupamento azida, de um lado, e um alcino terminal do outro.

A preparação dos diferentes anfifílicos são apresentados por cinco esquemas, na qual cada um ilustra a estratégia e reagentes escolhidos para cada etapa da rota sintética.



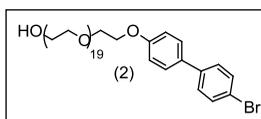
**Esquema 1.** Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfifílicos do tipo rod-coil  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (7): **a)** TsCl,  $\text{Ag}_2\text{O}$ , KI,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; **b)** 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ol,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; **c)** 4-bifenil ácido borônico,  $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , THF; **d)** TsCl,  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; **e)**  $\text{NaN}_3$ , DMF; **f)**  $\text{CuSO}_4$ , ascorbato de sódio, 2-propargil 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicopiranosose (GlcNAc),  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ ; **g)**  $\text{CuSO}_4$ , ascorbato de sódio, propargil β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosose (Lac),  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ .

### Síntese do composto (1)



Uma solução contendo 250 mL de cloreto de metileno anidro e PEO (Mw = 898g; 8,0 g, 8,91 mmol) foi resfriado e mantido a 0 °C, sob agitação mecânica até sua completa dissolução. Em seguida foram adicionados Ag<sub>2</sub>O (3,1 g, 13,36 mmol) e iodeto de potássio (0,5915 g, 3,56 mmol), em seguida foi acrescentado ao meio reacional *p*-toluenossulfonila (TsCl) (1,78 g, 9,35 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, utilizando cloreto de metileno/metanol (9/1 v/v) e foi considerada completa após 2 horas. A mistura reacional foi então, cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, o filtrado obtido foi evaporado sob pressão reduzida, resultando um óleo viscoso. O óleo resultante foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v) como eluente, fornecendo 5,16 g, (55%) de um óleo viscoso incolor. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 7,78 (d, 2H Ar, *J* = 8,5 Hz, Ar); 7,31 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, Ar); 4,12 (t, 2H, *J* = 4,4 Hz, CH<sub>2</sub>OTs); 3,71–3,55 (m, ~ 78H, CH<sub>2</sub>O); 2,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 144,8; 133,0; 129,8; 128,0; 72,5; 70,7; 70,5; 70,3; 69,2; 68,6; 61,7; 21,6. Anal. Calcd. para C<sub>47</sub>H<sub>88</sub>O<sub>23</sub>S: razão massa carga (*m/z*) 1052,62; MALDI-TOF-MS *m/z* 1075,66 [M+Na]<sup>+</sup>.

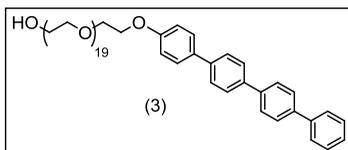
### Síntese do composto (2)



Em um balão de 250 mL, protegido por um tubo secante de cloreto de cálcio, foram colocados o composto (1) (5,0 g, 4,74 mmol), 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ol (1,18 g, 4,4 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,27 g, 23,7 mmol) e dissolvidos em 125 mL de acetonitrila anidra sob agitação. A mistura foi refluxada por 32 horas, a reação foi acompanhada por CCD, utilizando cloreto de metileno/metanol (9/1 v/v). A solução resultante foi vertida em água e extraída com cloreto de metileno (3 x 35 mL). A solução de cloreto de metileno foi lavada com água (2 x 25 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (15/1 v/v) fornecendo 2,785 g, (52%) de um óleo viscoso. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 7,49–7,34 (m, 6H, Ar); 6,93 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, *o*-ArBr); 4,12 (t, 2H, *J* = 4,7 Hz, ArO); 3,83 (t,

2H,  $J = 4,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,70-3,53 (m,  $\sim 78\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 158,55$ ; 139,6; 132,49; 131,66; 128,16; 127,80; 120,66; 114,97; 72,47; 70,76; 70,45; 70,22; 69,62; 67,45; 61,58. Anal. Calcd. para  $\text{C}_{52}\text{H}_{89}\text{BrO}_{21}$ :  $m/z$  1128,58; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1153,50  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  1169,44  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

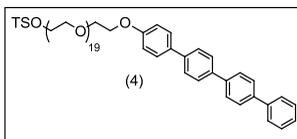
### Síntese do composto (3)



Em um balão de 250 mL, protegido por um tubo secante de cloreto de cálcio, contendo 2,6 g, (2,3 mmol) do composto (2) e 4-bifenil ácido borônico (0,456 g, 2,3 mmol) foram dissolvidos em 80 mL de THF

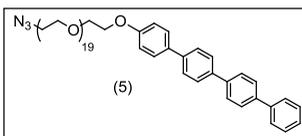
desgaseificados sob agitação mecânica, em seguida foram adicionados simultaneamente 55 mL de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 M) desgaseificados e tetrakis(trifenilfosfina)-paládio(0) (16,5 mg, 0,0135 mmol). A mistura foi mantida sob atmosfera inerte e refluxada por 60 horas com agitação constante, a reação foi acompanhada por CCD, utilizando cloreto de metileno/metanol (9/1 v/v). A solução resultante foi resfriada à temperatura ambiente, vertida em água e extraída com cloreto de metileno (3 x 35 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (16/1 v/v) fornecendo (1,385 g; 50%). RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 7,69$ -7,27 (m, 15H, Ar); 7,0 (d, 2H,  $J = 8,8$  Hz, Ar); 4,17 (t, 2H,  $J = 4,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ -Ar); 3,87 (t, 2H,  $J = 4,6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,71-3,55 (m,  $\sim 78\text{H}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 158,47$ ; 140,7; 140,1; 139,8; 139,6; 138,90; 133,3; 131,8; 128,8; 128,3; 128,0; 127,9; 127,5; 127,3; 127,00; 115,0; 72,5; 70,8; 70,6; 70,3; 69,7; 67,5; 61,7. Anal. Calcd. para  $\text{C}_{64}\text{H}_{98}\text{O}_{21}$ :  $m/z$  1202,73; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1225,43  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  1241,37  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

### Síntese do composto (4)



O composto (3) (1,3 g, 1,08 mmol) e trietilamina (1,38 g, 10 mmol) foram dissolvidos em 25 mL de cloreto de metileno anidro. Rapidamente foram adicionados 1,9 g TsCl (10 mmol). Após a adição, a mistura foi deixada sob agitação mecânica por 18 horas a temperatura ambiente a reação foi acompanhada por CCD, utilizando cloreto de metileno/metanol (9/1 v/v). A mistura reacional foi diluída com 25 mL de cloreto de metileno e lavada sucessivamente com soluções diluídas de HCl, depois com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 20 mL) e por fim a fase orgânica resultante foi lavada com água (2 x 15mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (15/1 v/v) fornecendo 1,276 g, (87%) do produto. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 7,90 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, Ar); 7,78-7,3 (m, ~ 17H, Ar); 6,98 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar); 4,13 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>O-Ar); 3,87 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>OTS); 3,72-3,55 (m, ~78H, CH<sub>2</sub>O); 2,42(s, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 158,5; 146,7; 141,8; 140,7; 140,1; 139,8; 139,7; 133,3; 131,8; 130,2; 129,8; 128,8; 128,3; 128,0; 127,5; 127,3; 127,1; 115,0; 70,9; 70,7; 70,6; 69,2; 68,7; 67,6; 21,6. Anal. Calcd. para C<sub>71</sub>H<sub>104</sub>O<sub>23</sub>S: *m/z* 1356,74; MALDI-TOF-MS *m/z* 1379,67 [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 1395,60 [M+K]<sup>+</sup>.

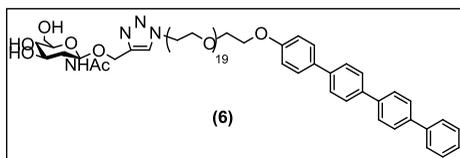
### Síntese do composto (5)



Uma solução contendo o composto (4) (1,27 g, 0,936 mmol) e 25 mL DMF anidro foi mantida sob agitação mecânica até sua completa dissolução. Em seguida foi adicionado NaN<sub>3</sub>, (0,183 g, 2,81 mmol). A mistura foi aquecida a 60 °C em banho de óleo durante 18 horas e, após foi cuidadosamente filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v) como eluente, fornecendo 0,977 g, (85%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 7,68-7,36 (m, 15H, Ar-*H*); 6,99 (d, 2H, *J* = 9,3 Hz, Ar); 4,14 (t, 2H, *J* = 4,9 Hz, CH<sub>2</sub>O-Ar); 3,85 (t, 2H, *J* = 4,9 Hz, -CH<sub>2</sub>O); 3,61-3,54 (m, ~ 78H, CH<sub>2</sub>O); 3,36 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 158,5$ ; 140,7; 140,1; 139,8; 139,6; 138,9; 133,3; 131,7; 128,8; 128,4; 128,3; 128,0; 127,5; 127,3; 127,03; 115,0; 72,4; 70,8; 70,6; 70,0; 69,7; 68,7; 67,5; 50,7. IV (Filme,  $v_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) pico de absorção da 2100  $\text{cm}^{-1}$ . Anal. Calcd. para  $\text{C}_{64}\text{H}_{97}\text{N}_3\text{O}_{20}$ :  $m/z$  1227,74, MALDI-TOF-MS  $m/z$  1250,51;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1266,48,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  e ESI  $m/z$  1250,8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

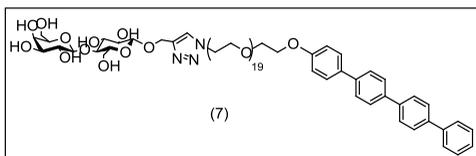
### Síntese do composto (6)



O derivado anfifílico (6) (400 g, 0,325 mmol) e GlcNAc (0,109 g, 0,42 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solventes contendo

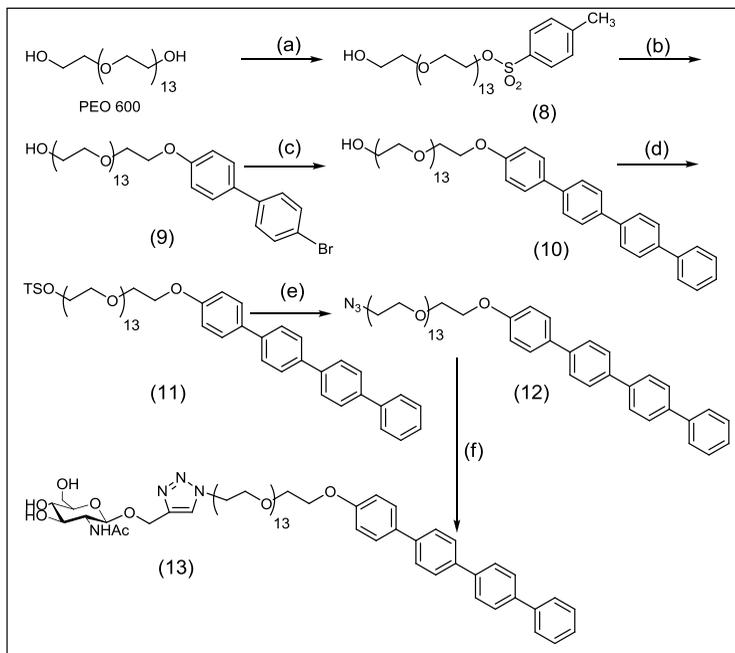
THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida “clique” foi realizado em uma solução THF/ $\text{H}_2\text{O}$  contendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (51,7 mg, 0,325 mmol) e ascorbato de sódio (70,7 mg, 0,357 mmol). A mistura foi aquecida a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio e a reação foi considerada após análise completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, a mistura foi cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida.  $\text{CHCl}_3$  foi usado para dissolver a fase orgânica, os precipitados foram filtrados. O filtrado obtido foi evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo 0,290 g, (60%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , ppm):  $\delta = 7,96$  (s, 1H, anel triazol); 7,81-7,38 (m, (16H) 15H, Ar e 1H, NH); 7,06 (d, 2H,  $J = 8,8$  Hz, Ar); 4,97-4,39 (m, 8H); 4,15 (t, 2H,  $J = 4,18$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O-Ar}$ ); 3,8 (t, 2H,  $J = 4,8$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,60-3,50 (m,  $\sim 78$  H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 1,77 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , ppm):  $\delta = 168,95$ ; 158,23; 143,57; 139,54; 139,03; 138,82; 138,55; 137,70; 131,92; 131,59; 128,89; 127,56; 127,44; 127,12; 126,88; 126,56; 126,47; 124,23; 114,97; 100,21; 77,04; 74,25; 71,61; 70,71; 69,91; 69,74; 69,57; 68,92; 68,67; 67,85; 67,24; 61,27; 61,15; 55,30; 49,31; 23,01. IV (Filme,  $v_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): Confirma o desaparecimento do pico de absorção da azida em 2100  $\text{cm}^{-1}$ . Anal. Calcd. para  $\text{C}_{75}\text{H}_{114}\text{N}_4\text{O}_{26}$ :  $m/z$  1486,84; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1509,82  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . HRMS Anal. Calcd. para  $\text{C}_{75}\text{H}_{114}\text{N}_4\text{O}_{26}\text{Na}$ :  $m/z$  1509,7619  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado: 1509,762.

### Síntese do composto (7)



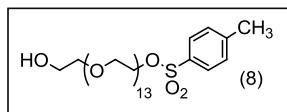
O derivado anfílico (5) (0,410 g, 0,334 mmol) e Lac (0,167 g, 0,44 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solvente de THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). O

conjunto de auto-reação de acoplamento assistida clique foi realizado em uma solução THF/H<sub>2</sub>O contendo CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,0531 g, 0,334 mmol) e ascorbato de sódio (0,0727 g, 0,367 mmol). A mistura foi aquecida a 40°C sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, a mistura reacional foi cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e CHCl<sub>3</sub> foi usado para dissolver a fase orgânica, os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo 0,295 g, (55%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ = 158,35; 143,45; 138,91; 131,61; 131,12; 128,92; 128,14; 127,61; 127,56; 127,12; 126,88; 126,56; 126,47; 125,42; 124,43; 119,94; 114,94; 103,78; 101,77; 80,68; 75,47; 74,91; 73,21; 73,06; 71,58; 70,52; 69,98; 69,91; 69,72; 69,57; 69,50; 68,89; 68,67; 68,09; 67,87; 67,22; 61,59; 60,55; 60,35; 60,18; 49,31. IV (Filme, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): Confirma o desaparecimento do pico de absorção da azida em 2100 cm<sup>-1</sup>. Anal. Calcd. para C<sub>79</sub>H<sub>121</sub>N<sub>3</sub>O<sub>31</sub>: m/z 1607,87; MALDI-TOF-MS m/z 1630,76 [M+Na]<sup>+</sup>.



**Esquema 2.** Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfífilicos do tipo roid-coil  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12),  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GLcNAc}$  (13): **a)** TsCl,  $\text{Ag}_2\text{O}$ , KI,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; **b)** 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ol,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; **c)** 4-bifenil ácido borônico,  $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , THF; **d)** TsCl,  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; **e)**  $\text{NaN}_3$ , DMF; **f)**  $\text{CuSO}_4$ , ascorbato de sódio, 2-propargil 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose (GlcNAc),  $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ .

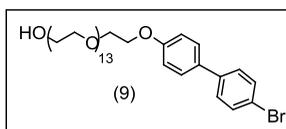
### Síntese do composto (8)



Uma solução contendo 25 mL de cloreto de metileno anidro e PEO ( $M_w = 590$  g/mol, 0,680 g, 1,15 mmol) foi resfriado e mantido a  $0^\circ\text{C}$ , sob agitação mecânica até sua completa dissolução. Em seguida foram adicionados  $\text{Ag}_2\text{O}$  (0,400 g, 1,73 mmol) e iodeto de potássio (0,076 g, 0,46 mmol), em seguida foi acrescentado ao meio reacional TsCl (0,230 g, 1,21 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol e foi considerada completa após 2 horas. A mistura reacional foi então cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, o filtrado obtido

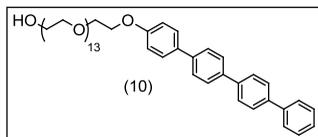
foi então evaporado sob pressão reduzida, resultando óleo viscoso. O óleo resultante foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (20/1 v/v) como eluente, fornecendo 0,497 g, (58%) de um óleo viscoso incolor. RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 7,77$  (d, 2H,  $J = 8,4$  Hz, Ar); 7,29 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz, Ar); 4,14 (t, 2H  $\text{CH}_2\text{OTs}$ ); 3,71–3,56 (m,  $\sim 55$  H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 2,42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 144,75$ ; 133,19; 129,77; 127,93; 72,52; 70,53; 70,30; 69,18; 68,67; 61,70; 21,6. Anal. Calcd. para  $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_{16}\text{S}$ :  $m/z$  744,41; MALDI-TOF-MS  $m/z$  767,09  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e ESI  $m/z$  767,4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### Síntese do composto (9)



Em um balão de 50 mL protegido por um tubo secante de cloreto de cálcio, foram colocados o composto (8) (0,450 g, 0,605 mmol), 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ol (0,1509 g, 0,605 mmol) e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,376 g, 2,72 mmol) foram dissolvidos em 20 mL de acetonitrila anidra sob agitação. A mistura foi refluxada por 30 horas, a reação foi acompanhada por CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol. A solução resultante foi vertida em água e extraída com cloreto de metileno (3 x 15 mL). A solução de cloreto de metileno foi lavada com água (2 x 10 mL). A fase orgânica foi então seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (18/1 v/v) fornecendo 0,260 g, (52%). RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 7,52$ -7,37 (m, 6H, Ar); 6,96 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz, *o*-ArBr); 4,15 (t, 2H,  $J = 4,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ -Ar, *o*-ArO); 3,87 (t, 2H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,54-3,68 (m,  $\sim 52$  H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 158,63$ ; 139,68; 132,59; 131,76; 128,27; 127,91; 120,76; 115,02; 72,55; 70,84; 70,53; 70,30; 69,70; 67,53; 61,70. Anal. Calcd. para:  $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{BrO}_{14}$ :  $m/z$  820,37; MALDI-TOF-MS  $m/z$  843,3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 859,27  $m/z$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  e ESI  $m/z$  843,3 e 845,4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

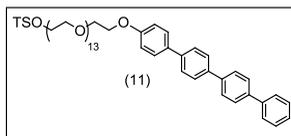
### Síntese do composto (10)



Em um balão de 50 mL, protegido por um tubo secante de cloreto de cálcio, contendo (0,247 g, 0,302 mmol) do composto (9) e 4-bifenil ácido borônico (0,0598 g, 0,302 mmol) foram

dissolvidos em (10 mL) de THF desgaseificados sob agitação mecânica, em seguida foram adicionados simultaneamente (7 mL) de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 M) desgaseificados e tetrakis(trifenilfosfina)-paládio(0) (2,03 mg, 0,00176 mmol). A mistura foi mantida sob atmosfera inerte e refluxada por 60 horas com agitação constante, a reação foi acompanhada por CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol. A solução resultante foi resfriada à temperatura ambiente, vertida em água e extraído com cloreto de metileno (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (20:1 v/v) fornecendo 0,135 g, (50%). RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  = 7,69-7,37 (m, 15H, Ar); 6,96 (d, 2H,  $J$  = 8,8 Hz, Ar); 4,14 (t, 2H,  $J$  = 4,6 Hz,  $\text{CH}_2\text{O-Ar}$ ); 3,85 (t, 2H,  $J$  = 4,6 Hz - $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,71-3,56 (m, ~ 52H, - $\text{CH}_2\text{O}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  = 158,5; 140,7; 140,1; 139,8; 139,6; 138,9; 133,3; 131,8; 128,8; 128,3; 128,0; 127,9; 127,5; 127,3; 127,0; 115,0; 72,6; 70,8; 70,6; 70,3; 69,7; 67,5; 61,7. Anal. Calcd. para  $\text{C}_{50}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$ :  $m/z$  894,52; MALDI-TOF-MS  $m/z$  917,47  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  933,53  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

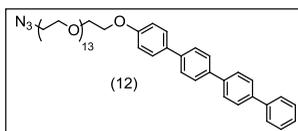
### Síntese do composto (11)



O composto (10) (0,120 g, 0,134 mmol) e trietilamina (0,107 g, 1,34 mmol) foram dissolvidos em 10 mL cloreto de metileno de anidro. Rapidamente foi adicionado uma quantidade  $\text{TsCl}$  (0,250 g, 1,34 mmol), após a adição, a mistura foi deixada sob agitação mecânica por mais 18 horas a temperatura ambiente a reação foi acompanhada por CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol. A mistura reacional foi diluída com 25 mL de cloreto de metileno e lavada sucessivamente com soluções diluídas de  $\text{HCl}$ , depois com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 10 mL) e por fim a fase orgânica resultante foi lavada com água (2 x 10mL), e seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e

evaporada sob pressão reduzida, e o conseqüente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (15/1 v/v) como eluente, fornecendo 0,105 g, (75%). RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 7,91$  (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz, Ar); 7,78-7,25 (m, 17H, Ar); 6,96 (d, 2H,  $J = 8,8$  Hz, Ar); 4,13 (t, 2H,  $J = 4,4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O-Ar}$ ); 3,85 (t, 2H,  $J = 4,9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{OTS}$ ); 3,71-3,55 (m,  $\sim 52\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ); 2,42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 158,5$ ; 146,7; 141,8; 140,7; 140,1; 139,8; 139,7; 133,3; 131,8; 130,2; 129,8; 128,8; 128,3; 128,0; 127,5; 127,3; 127,1; 115,0; 70,9; 70,6; 69,7; 69,2; 68,7; 67,6; 21,8. Anal. Calcd. para  $\text{C}_{57}\text{H}_{76}\text{O}_{16}\text{S}$ :  $m/z$  1048,53; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1071,58  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  1087,47  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

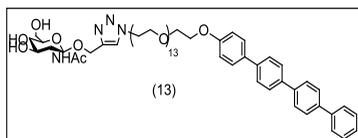
### Síntese do composto (12)



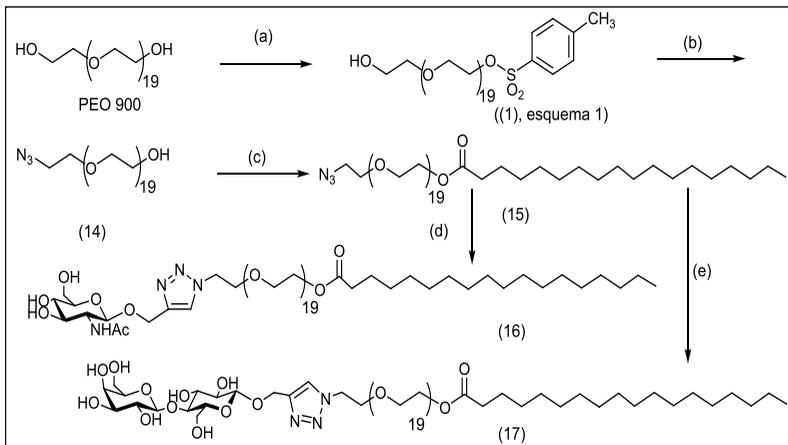
Uma solução contendo o composto (11) (0,090 g, 0,0858 mmol) e 10 mL DMF anidro foi mantida sob agitação mecânica até sua completa dissolução em seguida foi adicionado  $\text{NaN}_3$ , (0,028 g, 0,430 mmol).

A mistura foi aquecida a  $60^\circ\text{C}$  em banho de óleo durante 18 horas e, em seguida foi cuidadosamente filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v) como eluente, fornecendo 0,0626 g, (80%). RMN  $^1\text{H}$ : (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 7,67$ -7,35 (m, 15H, Ar-H); 6,98 (d, 2H,  $J = 9,3$  Hz, Ar); 4,14 (t, 2H,  $J = 4,7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O-Ar}$ ); 3,84 (t, 2H,  $J = 4,9$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,61-3,54 (m,  $\sim 52\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,36 (t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{N}_3$ ,  $J = 5,2$  Hz). RMN  $^{13}\text{C}$ : (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 158,2$ ; 140,5; 139,9; 139,6; 139,5; 138,7; 133,0; 131,7; 128,8; 128,2; 127,9; 127,8; 127,5; 127,3; 127,0; 115,0; 72,6; 70,8; 70,7; 70,5; 70,3; 69,6; 67,2; 50,5. IV (Filme,  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): pico de absorção da  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Anal. Calcd. para  $\text{C}_{50}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{13}$ :  $m/z$  919,52; MALDI-TOF-MS  $m/z$  958,34  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

### Síntese do composto (13)

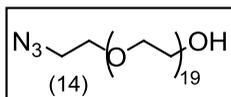


O composto (12) (0,058 g, 0,063 mmol) e (GlcNAc) (0,0229 g, 0,088 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solvente de THF/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida foi realizado em uma solução THF/H<sub>2</sub>O contendo CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,84 mg, 0,053 mmol) e ascorbato de sódio (1,24 mg, 0,063 mmol). A mistura foi aquecida a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, a mistura reacional foi cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida e CHCl<sub>3</sub> foi usado para dissolver a fase orgânica. Os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo 0,0394 g, (53%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 7,96 (s, 1H, anel triazol); 7,80-7,37 (m, (16H) 15H, Ar e 1H, NH); 7,05 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar); 5,0-4,48 (m, 8H); 4,12 (t, 2H, *J* = 4,18 Hz, CH<sub>2</sub>O-Ar); 3,78 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz, -CH<sub>2</sub>O); 3,73-3,48 (m, ~ 52H, -CH<sub>2</sub>); 3,41 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz -CH<sub>2</sub>N); 1,78 (s, 3H CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (100 MHz DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 168,87; 158,08; 143,50; 139,42; 138,71; 138,44; 131,86; 131,37; 128,64; 127,92; 127,39; 127,34; 127,17; 126,89; 126,66; 126,37; 126,24; 123,85; 114,9; 100,09; 76,79; 74,12; 70,70; 67,76; 69,56; 69,40; 68,76; 68,73; 68,48; 67,21; 61,16; 61,06; 55,31; 49,13; 22,69. IV (Filme, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): Confirma o desaparecimento do pico de absorção da azida em 2100 cm<sup>-1</sup>. Anal. Calcd. para C<sub>61</sub>H<sub>86</sub>N<sub>4</sub>O<sub>19</sub> M<sub>Theor</sub> *m/z* 1178,52; MALDI-TOF-MS *m/z* 1201,70 [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 1217,61 [M+K]<sup>+</sup>.



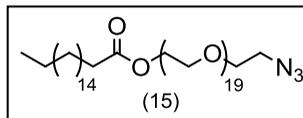
**Esquema 3.** Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfífilicos C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>N<sub>3</sub> (15), C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc (16) e C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (17): **a)** TsCl, Ag<sub>2</sub>O, KI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **b)** NaN<sub>3</sub>, DMF; **c)** DCC, DMAP, ácido octodecanóico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **d)** CuSO<sub>4</sub>, ascorbato de sódio, GlcNAc H<sub>2</sub>O/THF; **e)** CuSO<sub>4</sub>, ascorbato de sódio, Lac, H<sub>2</sub>O/THF.

### Síntese do composto (14)



O composto (1) (2,50 g, 2,4 mmol) e NaN<sub>3</sub>, (0618 g, 9,50 mmol) foram dissolvidos em DMF anidro (25 mL) sob agitação mecânica, e a mistura foi aquecida a 60 °C em banho de óleo durante 18 horas e, em seguida, concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v) como eluente, fornecendo 1,864 g, (85%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 3,71-3,58 (m, ~ 78H, CH<sub>2</sub>O); 3,37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 72,52; 70,58; 70,30; 70,01; 61,68; 50,71. IV (Filme, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): pico de absorção da 2103 cm<sup>-1</sup>. Anal. Calcd. para C<sub>40</sub>H<sub>81</sub>N<sub>3</sub>O<sub>20</sub>: m/z 923,61; MALDI-TOF-MS m/z 946,51 [M+Na]<sup>+</sup>, m/z 962,49 [M+K]<sup>+</sup>.

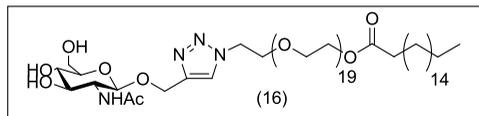
### Síntese do composto (15)



N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,20 g, 1,0 mmol) e 4 dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0244 g, 0,2 mmol) foram adicionados sob agitação mecânica uma solução de ácido

octodecanóico (0,853 g, 3,0 mmol) e PEO<sub>900</sub>N<sub>3</sub> (14) (0,92 g, 1,0 mmol) contendo 30 mL de cloreto de metileno anidro. A reação foi realizada por 48 horas em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. O conteúdo da mistura foi então cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v) como eluente, fornecendo 0,976 g, (82%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz, MeOD, ppm): δ = 4,21 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz); 3,71-3,64 (m, ~ 82 H, CH<sub>2</sub>O); 3,37 (t, 2H, *J* = 4,9 Hz); 2,36-2,26 (m, 2H); 1,62-1,60 (m, 2H); 1,29 (m, 28H); 0,90 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 172,9; 69,9; 69,3; 68,4; 63,1; 50,1; 33,5; 31,4; 30,7; 29,1; 28,9; 28,8; 28,5; 24,5; 22,2; 14,0. IV (Filme, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): pico de absorção da 2100 cm<sup>-1</sup>. MALDI-TOF MS Anal. Calcd para C<sub>58</sub>H<sub>115</sub>N<sub>3</sub>O<sub>21</sub>: *m/z* 1189,80; MALDI-TOF-MS *m/z* 1212,74 [M+Na]<sup>+</sup> e *m/z* 1228,73 [M+K]<sup>+</sup>.

### Síntese do composto (16)

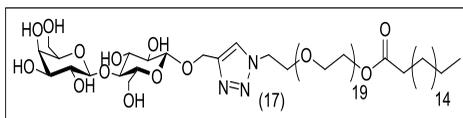


O derivado anfifílico (15) (0,400 g, 0,336 mmol) e (GlcNAc) (0,113 g, 0,437 mmol) foram dissolvidos

em uma mistura de solvente de THF/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida foi realizado em uma solução THF/H<sub>2</sub>O contendo CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (53,4 mg, 0,336 mmol) e ascorbato de sódio (73 mg, 0,369 mmol). A mistura foi aquecida a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, foi cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e CHCl<sub>3</sub> foi usado para dissolver a fase orgânica os

precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo 0,350 g, (72%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 7,92 (s, 1H, anel triazol); 7,49 (d, 1H,  $J$  = 8,6 Hz, NH); 4,80-4,40 (m, 8H); 4,13 (t, 2H,  $J$  = 4,2 Hz); 3,82 (t, 2H,  $J$  = 4,8 Hz) 3,61-3,50 (m, ~ 82H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,15 (2H,  $J$  = 4,8 Hz); 2,28 (t, 2H,  $J$  = 4 Hz); 1,78 (s, 3H); 1,5 (m, 2H); 1,24 (m, 18H); 0,86 (t, 3H,  $J$  = 6,6Hz,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 172,8; 168,9; 143,5; 124,2; 100,2; 77,0; 74,2; 71,6; 70,7; 69,7; 69,6; 69,5; 68,7; 68,3; 67,9; 62,9; 61,2; 61,1; 55,3; 33,4; 31,2; 29,0; 28,8; 28,6; 28,4; 24,4; 23,0; 22,0; 13,9. IV (Filme,  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) Confirma o desaparecimento do pico de absorção da azida em  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Anal. Calcd. para  $\text{C}_{69}\text{H}_{132}\text{N}_4\text{O}_{27}$ :  $m/z$  1448,98; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1471,94  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e HRMS Anal. Calcd para  $\text{C}_{69}\text{H}_{132}\text{N}_4\text{O}_{27}\text{Na}$ :  $m/z$  1471,89767  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado: 1471,8958 e  $\text{C}_{69}\text{H}_{132}\text{N}_4\text{O}_{27}\text{K}$ :  $m/z$  1487,8716  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  encontrado: 1471,8740.

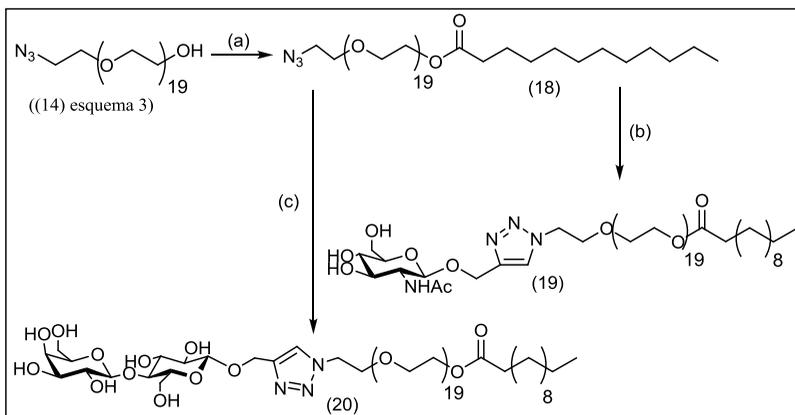
### Síntese do composto (17)



O derivado anfífilico (15) (0,456 g, 0,383 mmol) e o dissacarídeo propargil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosose (Lac) (0,190 g,

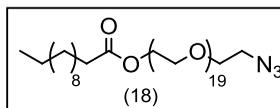
0,5 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solvente de THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida clique foi realizado em uma solução THF/ $\text{H}_2\text{O}$  contendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (61 mg, 0,383 mmol) e ascorbato de sódio (79,2 mg, 0,400 mmol). A mistura foi aquecida a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, foi cuidadosamente filtrada sobre Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e  $\text{CHCl}_3$  foi usado para dissolver a fase orgânica os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo 0,403 g, (67%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 8,03 (s, 1H, anel triazol); 4,91-4,32 (m, 12H); 4,12 (t, 2H,  $J$  = 4,9 Hz); 3,82 (2H,  $J$  = 4,8 Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,58-3,50 (m, ~ 78H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,33 (2H,  $J$  = 4,8 Hz); 2,29-2,27 (m, 2H); 1,5 (m, 2H); 1,24 (m, 28H); 0,86 (t, 3H,  $J$

= 6,6Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 172,68; 143,39; 124,35; 103,72; 101,71; 80,62; 77,06; 75,41; 74,85; 73,18; 73,03; 71,53; 70,48; 69,68; 69,54; 69,46; 68,61; 68,23; 68,03; 67,81; 62,89; 61,53; 60,51; 60,29; 49,25; 33,34; 31,18; 28,90; 28,75; 28,56; 28,29; 24,36; 21,96; 13,83. IV (Filme, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): Confirma o desaparecimento do pico de absorção da azida em 2100 cm<sup>-1</sup>. Anal. Calcd. para C<sub>73</sub>H<sub>139</sub>N<sub>3</sub>O<sub>32</sub>: *m/z* 1569,93; MALDI-TOF-MS *m/z* 1593,10 [M+Na]<sup>+</sup> e HRMS Anal. Calcd. para C<sub>75</sub>H<sub>143</sub>N<sub>3</sub>O<sub>33</sub>Na: *m/z* 1636,95016; [M+Na]<sup>+</sup>; encontrado: 1636,9507.



**Esquema 4.** Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfifílicos C<sub>12</sub>PEO900GlcNAc (19) e C<sub>12</sub>PEO900Lac (20): **a)** DCC, DMAP, ácido dodecanóico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **b)** CuSO<sub>4</sub>, ascorbato de sódio, GlcNAc H<sub>2</sub>O/THF; **c)** CuSO<sub>4</sub>, ascorbato de sódio, Lac, H<sub>2</sub>O/THF.

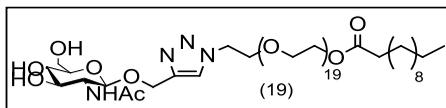
### Síntese do composto (18)



N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,100 g, 0,484 mmol) e 4 dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0122 g, 0,1 mmol) foram adicionados sob agitação mecânica uma solução de ácido dodecanóico (0,290 g, 1,45 mmol) e composto (14) (0,446 g, 0,483 mmol) contendo 25 mL de cloreto de metileno anidro. A reação foi realizada por 48 horas em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. O conteúdo da mistura foi então cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido

foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v) como eluente, fornecendo 0,416 g, (78%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, MEOD, ppm):  $\delta$  = 4,20 (t, 2H,  $J$  4,7 Hz); 3,71-3,64 (m,  $\sim$  78H); 3,38 (t, 2H,  $J$  = 4,9 Hz); 2,36-2,26 (m, 2H); 1,62-1,58 (m, 2H); 1,32-1,30 (m, 16H); 0,90 (t, 3H,  $J$  = 6,6Hz  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  = 173,8; 72,4; 70,6; 70,0; 69,2; 68,7; 63,3; 50,7; 33,8; 31,9; 29,6; 29,4; 29,3; 29,1; 25,5; 24,8; 22,7; 14,1. IV ( $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): pico de absorção da  $2100\text{ cm}^{-1}$ .

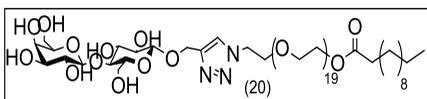
### Síntese do composto (19)



O derivado anfifílico (18) (0,200 g, 0,181 mmol) e GlcNAc (0,0588 g, 0,227 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solvente de

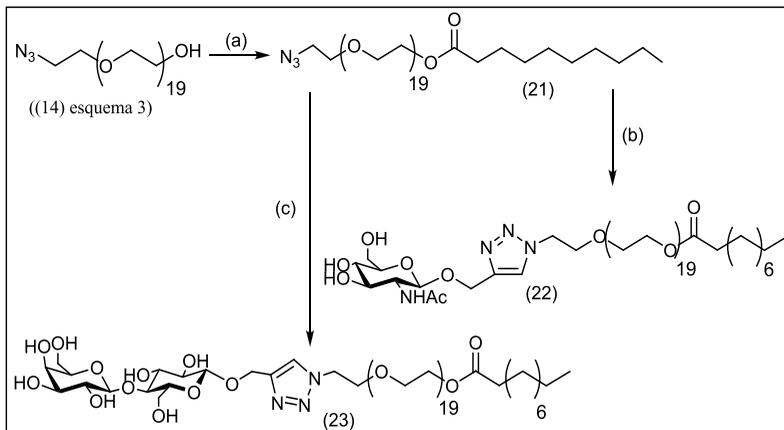
THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida foi realizado em uma solução THF/ $\text{H}_2\text{O}$  contendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (28,77 mg, 0,181 mmol) e ascorbato de sódio (46,6 mg, 0,235 mmol). A mistura foi aquecida a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, foi cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e  $\text{CHCl}_3$  foi usado para dissolver a fase orgânica os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo (0,168 g; 68%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 7,92 (s, 1H, anel triazol); 7,49 (d, 1H,  $J$  = 8,6 Hz, NH); 4,79 0-4,43 (m, 8H); 4,11 (t, 2H,  $J$  = 4,2 Hz); 3,82 (t, 2H,  $J$  = 4,8 Hz) 3,61-3,50 (m, 78H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,14 (2H,  $J$  = 4,8 Hz); 2,27 (t, 2H,  $J$  = 4 Hz); 1,8 (s, 3H); 1,53 (m, 2H); 1,24 (m, 16H); 0,87 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 172,76; 168,97; 143,55; 124,23; 100,19; 77,02; 74,23; 71,61; 70,69; 69,74; 69,57; 69,52; 68,67; 68,28; 67,87; 62,95; 61,25; 61,13; 55,30; 33,4; 31,24; 30,61; 28,93; 28,64; 28,37; 24,39; 23,0; 22,04; 13,89. Anal. Calcd. para  $\text{C}_{63}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_{27}$ :  $m/z$  1364,85 MALDI-TOF-MS  $m/z$  1387,91  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $m/z$  1403,89  $[\text{M}+\text{K}]^+$ . HRMS Anal. Calcd. para  $\text{C}_{63}\text{H}_{120}\text{N}_4\text{O}_{27}\text{Na}$ :  $m/z$  1387,80377;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado: 1387,8055.

### Síntese do composto (20)



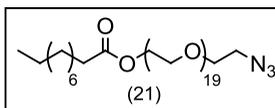
O derivado anfifílico (18) (0,196 g, 0,177 mmol) e o dissacarídeo (Lac) (0,084 g, 0,221 mmol) foram

dissolvidos em uma mistura de solvente de THF/H<sub>2</sub>O (1/1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida clique foi realizado em uma solução THF/H<sub>2</sub>O contendo CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (61 mg, 0,383 mmol) e ascorbato de sódio (79,2 mg, 0,400 mmol). A mistura foi aquecida a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, foi cuidadosamente filtrada sobre Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e CHCl<sub>3</sub> foi usado para dissolver a fase orgânica os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v), como eluente, fornecendo (0,179 g; 68%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>1</sup>H: (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 8,04 (s, 1H, anel triazol); 4,93-4,35 (m, 12H); 4,12 (t, 2H, J = 4,9 Hz); 3,82 (2H, J = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>O); 3,61-3,51 (m, ~ 78H, CH<sub>2</sub>O); 3,34 (2H, J = 4,8 Hz); 2,30-2,26 (m, 2H); 1,52 (m, 2H); 1,25 (m, 16H); 0,85 (t, 3H, J = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 172,73; 143,43; 124,45; 103,73; 101,74; 80,59; 75,44; 74,91; 73,28; 73,06; 71,58; 70,64; 69,72; 68,67; 68,28; 67,87; 62,95; 61,59; 60,51; 60,45; 60,18; 49,29; 33,40; 31,24; 28,93; 28,81; 28,64; 28,35; 24,39; 22,04; 13,86. Anal. Calcd. para C<sub>67</sub>H<sub>127</sub>N<sub>3</sub>O<sub>32</sub>: m/z 1485,91; MALDI-TOF-MS m/z 1508,90 [M+Na]<sup>+</sup>.



**Esquema 5.** Ilustra a estratégia sintética utilizada na preparação dos anfífilicos  $C_{10}$ PEO $_{900}$ GlcNAc (22) e  $C_{10}$ PEO $_{900}$ Lac (23): **a)** DCC, DMAP, ácido decanóico,  $CH_2Cl_2$ ; **b)**  $CuSO_4$ , ascorbato de sódio, GlcNAc  $H_2O/THF$ ; **c)**  $CuSO_4$ , ascorbato de sódio, Lac,  $H_2O/THF$ .

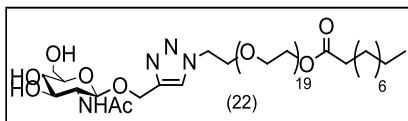
### Síntese do composto (21)



$N,N'$ -diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,105 g, 0,511 mmol) e 4 dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0122 g, 0,1 mmol) foram adicionados sob agitação mecânica uma solução de ácido decanóico (0,209 g, 1,22 mmol) e o composto (14) (0,450 g, 0,487 mmol) contendo 25 mL de cloreto de metileno anidro. A reação foi realizada por 48 horas em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (9/1 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. O conteúdo da misturas foi então cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o conseqüente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (9/1 v/v), como eluente, fornecendo (0,425 g; 81%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1H$ : (400 MHz, MEOD, ppm):  $\delta$  = 4,21 (t, 2H,  $J$  = 4,8 Hz); 3,71-3,64 (m, ~ 78 H,  $CH_2O$ ); 3,32 (t, 2H,  $J$  = 4,9 Hz); 2,36-2,26 (m, 2H); 1,62-1,60 (m, 2H); 1,31 (m, 12H); 0,90 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $CH_3$ ). RMN  $^{13}C$ : (75 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  = 177,72; 72,45; 70,58; 70,01; 69,21; 68,72; 63,34; 50,71; 34,19; 33,81; 31,84; 29,38; 29,23; 24,75; 22,63; 14,06. IV (Filme,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): pico de

absorção da  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Anal. Calcd. para  $\text{C}_{50}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_{21}$ :  $m/z$  1077,74; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1116,73  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

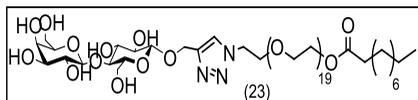
### Síntese do composto (22)



O derivado anfifílico (21) (0,205 g, 0,190 mmol) e (0,062 g, 0,240 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solvente de THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v).

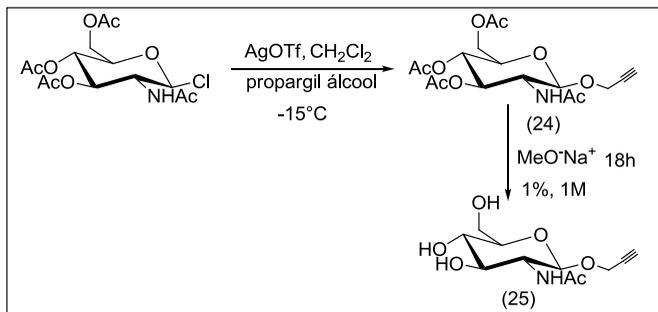
O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida clique foi realizado em uma solução THF/ $\text{H}_2\text{O}$  contendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (30,2 mg, 0,190 mmol) e ascorbato de sódio (37,6 mg, 0,190 mmol). A mistura foi aquecida a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, foi cuidadosamente filtrada sobre uma cama de Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e  $\text{CHCl}_3$  foi usado para dissolver a fase orgânica os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo (0,170 g; 67%) de um sólido ceroso branco. RMN  $^1\text{H}$ : (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 7,93 (s, 1H, anel triazol); 7,5 (d, 1H,  $J$  = 8,6 Hz, NH); 4,80-4,48 (m, 8H); 4,13 (t, 2H,  $J$  = 4,2 Hz); 3,83 (t, 2H,  $J$  = 4,8 Hz) 3,61-3,52 (m, 82H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,15 (2H,  $J$  = 4,8 Hz); 2,28 (t, 2H,  $J$  = 4 Hz); 1,79 (s, 3H); 1,53 (m, 2H); 1,26 (m, 12H); 0,86 (t, 3H,  $J$  = 6,6Hz,  $\text{CH}_3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$ : (75 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta$  = 172,78; 168,99; 143,57; 124,25; 100,21; 77,69; 77,04; 74,25; 71,6; 70,71; 69,76; 69,59; 69,54; 68,69; 68,31; 67,89; 62,97; 61,27; 61,15; 55,32; 33,42; 31,26; 30,63; 28,95; 28,66; 24,41; 23,01; 22,06; 13,91. IV (Filme,  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): Confirma o desaparecimento do pico de absorção da azida em  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Anal. Calcd. para  $\text{C}_{61}\text{H}_{116}\text{N}_4\text{O}_{27}$ :  $m/z$  1336,85; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1359,72  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . HRMS Anal. Calcd. para  $\text{C}_{61}\text{H}_{116}\text{N}_4\text{O}_{27}\text{Na}$ :  $m/z$  1359,77247;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; encontrado: 1359,7726.

### Síntese do composto (23)



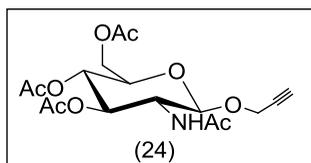
O derivado anfifílico (21) (0,195 g, 0,18 mmol) e propargil-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-

glicopiranosose (Lac) (0,086 g, 0,226 mmol) foram dissolvidos em uma mistura de solvente de THF/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v). O conjunto de auto-reação de acoplamento assistida clique foi realizado em uma solução THF/H<sub>2</sub>O contendo CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (28,78 mg, 0,181 mmol) e ascorbato de sódio (35,84 mg, 0,181 mmol). A mistura foi aquecida a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio, e a reação foi considerada completa por cromatografia CCD, (8/2 v/v), cloreto de metileno/metanol utilizando gel de sílica 60 F264. Após 24 horas de reação de acoplamento, foi cuidadosamente filtrada sobre Celite®, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e CHCl<sub>3</sub> foi usado para dissolver a fase orgânica os precipitados foram filtrados, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida, e o consequente produto foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, cloreto de metileno e metanol (8/2 v/v) como eluente, fornecendo (0,174 g; 66%) de um sólido ceroso branco. RMN <sup>1</sup>H: (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 8,07 (1H, anel triazol); 5,13-4,32 (m, 12H); 4,11 (t, 2H, *J* = 4,9 Hz); 3,82 (2H, *J* = 4,8 Hz, CH<sub>2</sub>O) 3,65-3,45 (m, ~ 78H, CH<sub>2</sub>O); 3,30 (2H, *J* = 4,8 Hz ); 2,31-2,26 (m, 2H); 1,50 (m, 2H); 1,24 (m, 1H); 0,86 (t, 3H, *J* = 6,6Hz, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 172,78; 143,38; 124,43; 103,76; 101,77; 80,66; 79,15; 75,47; 74,91; 73,23; 73,06; 71,61; 70,57; 69,74; 68,67; 68,26; 67,99; 67,87; 62,97; 61,56; 60,52; 60,28; 49,29; 33,40; 31,21; 30,63; 28,79; 28,64; 24,04; 22,96; 13,89. Anal. Calcd. para C<sub>65</sub>H<sub>123</sub>N<sub>3</sub>O<sub>32</sub>: *m/z* 1457,84; MALDI-TOF-MS *m/z* 1480,72 [M+Na]<sup>+</sup>. HRMS Anal. Calcd. para C<sub>65</sub>H<sub>123</sub>N<sub>3</sub>O<sub>32</sub>Na: *m/z* 1480,79874; [M+Na]<sup>+</sup>; encontrado: 1480,7978.



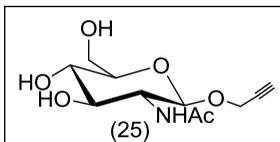
**Esquema 6.** Ilustração da síntese do composto (24); 3,4,6-triacetato-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicopiranoside e composto (25); 2-propargil 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glicopiranosose (GlcNAc).

### Síntese do composto (24)



Em um balão de 50 mL contendo 25 mL cloreto de metileno anidro dissolveu-se 1,0 g de cloreto de 3,4,6-triacetato de 2 acetamido-2-desoxi-α-D-glicopiranosil (2,74 mmol) e álcool propargílico (0,316 mL, 5,48 mmol). A solução foi resfriado e mantido a -10 °C, em seguida foi adicionada lentamente trifluorometanosulfonato de prata (0,773 g, 3,01 mmol). A reação foi acompanhada por CCD, (7/3 v/v), acetato de etila/tolueno e foi considerada completa após 5 horas. A mistura reacional foi lavada com bicarbonato de sódio saturado em seguida filtrada sobre uma cama de Celite®, o filtrado obtido foi extraído com cloreto de metileno (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, e o filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida obtendo-se um sólido bruto, o qual foi purificado por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando acetato de etila/tolueno (7/3 v/v) como eluente e fornecendo 0,601 g, (57%) de um sólido branco. PF = 251-253 °C, [α]<sub>D</sub> = 49,0. RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 170,94; 170,65; 170,25; 169,36 (CO); 98,37 (C-1); 78,53 (C≡CH); 76,62 (C≡CH); 75,37(C-3); 72,42 (C-5); 68,51 (C-4); 62,0 (C-6); 55,94 (CH<sub>2</sub>O); 54,35(C-2); 23,38; 20,74; 20,68; 20,63 (CH<sub>3</sub>). Anal. Calcd. para C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub>; *m/z* 385,14; ESI 386,14 [M+H]<sup>+</sup>. CHN C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>9</sub> Teor. = C(52,98%); H(6,02%) e N(3,63%); Exp. = C(52,74%); H(6,04%) e N(3,65%).

## Síntese do composto (25)



O composto (24) foi suspenso em 50 mL de MEOH a temperatura ambiente e foram adicionados 0,5 mL MEONa 1 M. A solução foi deixada sob forte agitação magnética por 15 horas. A reação foi acompanhada por CCD, (9/1v/v) acetonitrila/água e foi considerada completa. Em seguida a mistura foi neutralizada com a resina Amberlite IR-120 (forma H<sup>+</sup>) e deixada sob agitação por 30 minutos antes de filtrar em um pequeno filtro contendo algodão na extremidade. O filtrado obtido foi então evaporado sob pressão reduzida e purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando acetonitrila e água (9/1 v/v) como eluente, e seguida, o mesmo foi liofilizado obtendo-se 0,404 g, (85%) de um sólido branco. RMN <sup>13</sup>C: (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 169,0; 99,0; 79,8; 77,1; 77,0; 74,1; 70,6; 61,1; 55,2; 54,7; 56,0; 23,1. Anal. Calcd. para C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>: m/z 259,11; ESI 282,16 [M+Na]<sup>+</sup>. CHN; C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub> Teor. = C(50,96%), H(6,61%) e N(5,40%); Exp.= C(50,89%), H(6,64%) e N(5,42%).

## 6.4 Resultados e discussão

As abordagens sintéticas descrita nesse capítulo podem ser estendidas para a preparação de uma série de moléculas anfifílicas com controle rígido sobre a fração volume hidrofóbico para criar nanoestruturas com morfologias conhecidas. Essas moléculas anfifílicas são consideradas de interesse para aplicações biológicas devido à formação, em solução aquosa, de nanoestruturas supramoleculares bem definidas e com base em diferentes núcleos altamente hidrofóbicos de anéis aromáticos e ácidos graxos.

Os esquemas 1 e 2 descrevem a estratégia sintética utilizada para a preparação dos novos anfifílicos do tipo rod-coil formados por poli-aromáticos como haste hidrofóbica rígida conectada covalentemente ao polímero flexível PEO como braço espaçador hidrofílico de diferentes massas molares, em seguida a funcionalização dessas estruturas por carboidratos através da reação de “*click chemistry*”, foram obtidos em várias etapas de síntese com matérias-primas disponíveis comercialmente, obtendo-se rendimentos satisfatórios.

Para síntese dos cinco primeiros anfifílicos  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{GLcNAc}$  (6),  $4\phi\text{PEGO}_{900}\text{Lac}$  (7),  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GLcNAc}$  (13), os esquemas 1 e 2 foram baseados em metodologias já descritas na literatura de acordo com Lee e colaboradores.<sup>34, 35, 75, 76, 171</sup> Apesar da metodologia já ser conhecida, alterações nas últimas etapas da rota sintética foram realizadas com a finalidade de obter um melhor rendimento e, mais importante, originando anfifílicos funcionalizados com grupamentos azida visando reações de *click chemistry*. Desta forma abri-se possibilidades de ancorar outros tipos de moléculas bioativas na última etapa da síntese e a preparação de novos anfifílicos com diferentes estruturas, finalidades e aplicações, uma vez que estas moléculas decoradas com (oligo- e polissacarídeos) podem ser utilizadas para obtenção nanopartículas em solução aquosa.

A metodologia elaborada para a obtenção dos anfifílicos apresentados no parágrafo precedente, demonstra a importância dos dois intermediários chaves,  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5) e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12). Para a obtenção dos intermediários foram necessárias cinco etapas reacionais a partir do  $\text{PEO}_{900}$  e  $\text{PEO}_{600}$ , tendo como reações fundamentais a tosilção seletiva dos polímeros, substituições nucleofílicas e reações de acoplamento de Suzuki-Miyaura.<sup>172</sup>

Os esquemas sintéticos 3, 4 e 5, demonstram a mudança na estratégia de preparação dos novos anfifílicos com diferentes ácidos carboxílicos atuando como segmento hidrofóbico, mantendo a braço espaçador PEO e os carboidratos GlcNAc e Lac ancorados através de reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. O objetivo principal da alteração é obter anfifílicos que possam apresentar uma maior biocompatibilidade e biodegradabilidade, visando principalmente a produção de nanopartículas que apresentem sítios de reconhecimento celular na sua superfície e que sejam viáveis futuramente para encapsular substâncias ativas hidrofóbicas (fármacos e aromas).

O planejamento para a obtenção dos anfifílicos  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (16),  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (17),  $\text{C}_{12}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (19),  $\text{C}_{12}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (20),  $\text{C}_{10}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (22) e  $\text{C}_{10}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (23), foi baseado em um intermediário chave o composto (14), que necessitou duas etapas reacionais a partir do PEO, a partir do qual foram necessárias mais duas etapas para a obtenção dos anfifílicos, apresentados nos esquemas 3, 4 e 5.

A síntese, como descrito nos esquemas 1, 2 e 3, foi iniciada com a mono tosilção seletiva de  $\text{PEO}_{900}$  e  $\text{PEO}_{600}$  em presença de óxido de

prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) e uma quantidade catalítica de iodeto de potássio (KI), como relatado por Bouzide e colaboradores.<sup>173</sup> Este método, demonstra ser um excelente protocolo para a mediação da mono tosilacção de dióis simétricos e oligo (etileno glicóis) (OEGs), dando rendimentos satisfatórios dos compostos (1) e (8).

Os produtos subsequentes 2 e 9 foram sintetizados em condições básicas na presença de 4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-ol, favorecendo a reacção de substituição nucleofílica, com a expulsão do grupo tosila e caracterizados por MALDI-TOF-MS, RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C.

Os compostos 3 e 10 foram obtidos por reacções de acoplamento de Suzuki-Miyaura utilizando como catalisador tetrakis(trifenilfosfina)-paládio(0).

As moléculas 4 e 11, foram obtidas através da reacção de tosilacção da hidroxila livre dos compostos 3 e 10 na presença de trietilamina. O acompanhamento da reacção se deu por CCD com desaparecimento do produto de partida e surgimento dos produtos tosilados. As moléculas foram caracterizados por MALDI-TOF-MS e por espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C foi possível detectar o surgimento dos sinais na região aromática e um sinal característico do carbono metílico do substituinte aromático *p*-toluenossulfonil.

A preparação dos intermediários chave 5 e 12 se deu através da reacção de substituição nucleofílica do grupo tosila na presença de azida de sódio, com bons rendimentos. O acompanhamento da reacção se deu por infravermelho com desaparecimento do produto de partida e surgimento dos produtos funcionalizados com um pico de absorção em 2100  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo azida, o sinal referente ao carbono metileno adjacente ao grupo azida é visto em 50,7 ppm por RMN<sup>13</sup>C. A sua detecção confirma a eficiência da transformação.

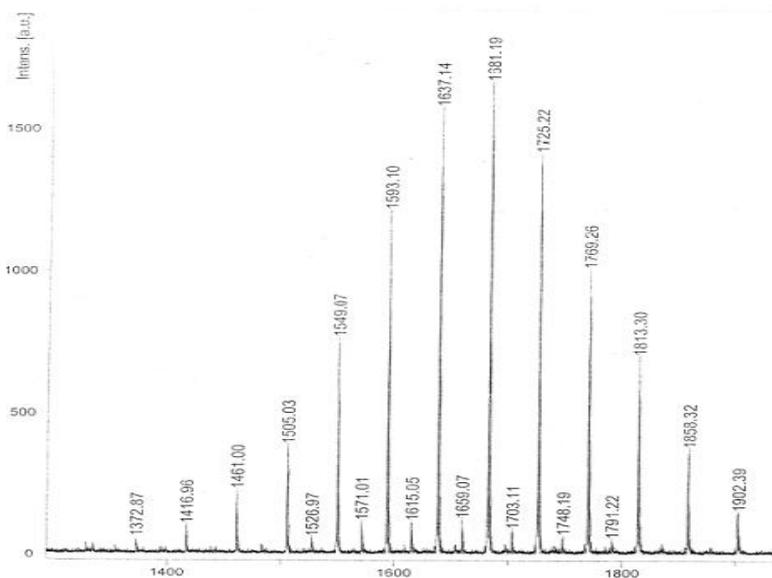
A continuidade das rotas sintéticas apresentadas nos esquemas 3, 4 e 5 foi a produção do intermediário chave 14, a qual é demonstrado na segunda etapa da síntese do esquema 3, onde ocorreu a substituição do grupo tosila na presença de azida de sódio com um rendimento de 85%. O pico de absorção em 2100  $\text{cm}^{-1}$ , observado por espectroscopia de infravermelho é referente ao grupo azida e o sinal referente ao carbono metileno adjacente ao grupo azida, visto em 50,7 ppm por RMN<sup>13</sup>C, confirmaram a eficiência da transformação, (ver anexos).

Os ácidos carboxílicos foram introduzidos através de reacções de esterificação promovidos na presença do agente de acoplamento DCC e do catalisador DMAP, as reacções demonstraram ser eficientes com média de 80% de rendimento para  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (15),  $\text{C}_{12}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (18) e  $\text{C}_{10}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (21).

A etapa final dos esquemas 1 ao 5, teve como foco obter somente os anfifílicos conjugados com GlcNAc e Lac com rendimentos satisfatórios.

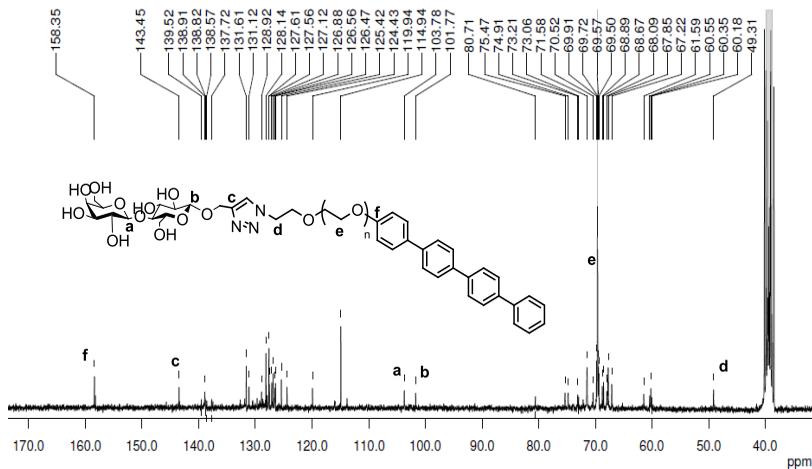
As reações de *click chemistry* foram realizada a 40 °C na presença do sistema catalítico cobre/ascorbato de sódio em uma mistura de água/THF para garantir uma boa solubilidade do anfifílico e rendimento satisfatório dos anfifílicos conjugados. Através da reação usando-se água como co-solvente da reação gerando Cu(I) *in situ* através da redução de Cu(II) com ascorbato de sódio, observou-se por RMN  $^{13}\text{H}$  somente um pico referente ao hidrogênio do anel triazol, aproximadamente em 8,0 ppm, isso demonstrou que a reação foi regioseletiva para todos anfifílicos conjugados com GlcNAc e Lac.

Embora o comportamento das moléculas anfifílicas dificultam a sua caracterização, as estruturas dos anfifílicos 4 $\phi$ PEO<sub>900</sub>GlcNAc (6), 4 $\phi$ PEGO<sub>900</sub>Lac (7), 4 $\phi$ PEO<sub>600</sub>N<sub>3</sub> (12), 4 $\phi$ PEO<sub>600</sub>GlcNAc (13) C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc (16), C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (17), C<sub>12</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc (19), C<sub>12</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (20), C<sub>10</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc (22) e C<sub>10</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (23) foram confirmadas por espectrometria de RMN em DMSO, um bom solvente para cada parte da molécula e espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS e ESI-MS) e alta resolução (HRMS) foram de extrema importância, pois juntamente com as outras técnicas permitiu a correta caracterização dos compostos e também possibilitou a identificação da massa molecular da unidade monomérica, a dedução dos grupos terminais presentes e a avaliação do padrão de distribuição do polímero, a massa molar das unidades monoméricas do PEO (m= 44,06) é observado como uma unidade de intervalo na distribuição da massa molar do polímero. A Figura 28 mostra o sucesso do produto de *click chemistry* do anfifílico C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (17), observa-se no espectro a obtenção do produto de acoplamento, a ausência do produto de partida e a formação de subprodutos, demonstrando o sucesso da reação de acoplamento.

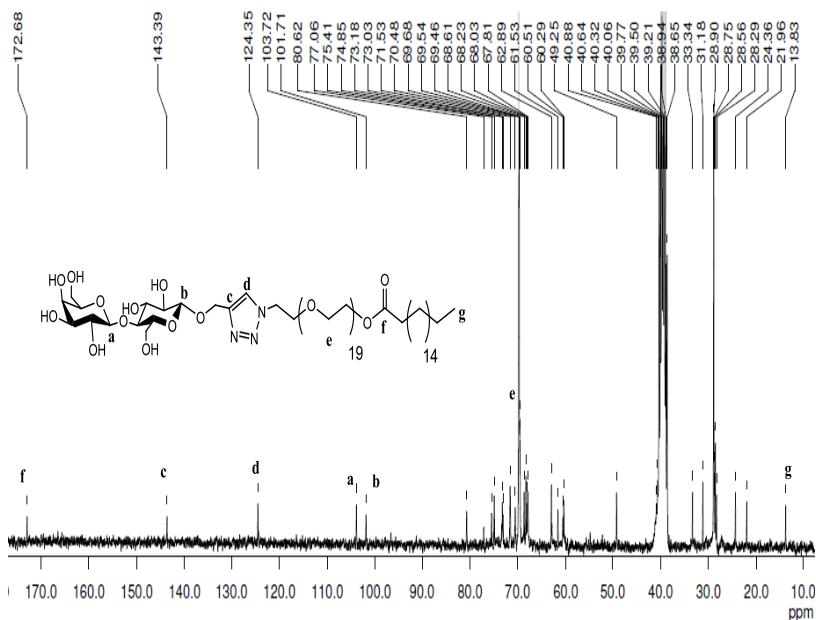


**Figura 28.** Espectro de massa MALDI-TOF do  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17).

Ambos os espectros RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  exibem sinais característicos das partes da cadeia dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, do polímero PEO e das unidades dos carboidratos GlcNAc e Lac, bem como os sinais do anel triazol. Os sinais característicos estão ilustrados nos espectros de RMN  $^{13}C$ , evidenciando o sucesso da reação de acoplamento. As Figuras 29 e 30 mostram dois exemplos representativos dos espectros de RMN  $^{13}C$  dos compostos  $4\phi PEGO_{900}Lac$  (7) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) em DMSO- $d_6$ .



**Figura 29.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz) do composto  $4\phi\text{PEGO}_{900}\text{Lac}$  (7).



**Figura 30.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz) do composto  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (17).

## 6.5 Considerações finais

Nesta primeira parte do trabalho, descrevemos a estratégia sintética das metodologias empregadas conseguindo demonstrar o sucesso da obtenção e caracterização dos novos anfifílicos funcionalizados com monossacarídeo GlcNAc e o dissacarídeo Lac através de reações de *click chemistry*, próprios para estudar o processo associativo como blocos de construção supramoleculares.

Com as devidas purificações e caracterizações, foi possível obter moléculas com uma pureza > 95% (sem traços observados por RMN). Quando as análises de RMN e espectrometria de massa não apresentaram vestígio de subprodutos a pureza das estruturas obtidas foi superior a 99%.



## CAPÍTULO 7

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os capítulos 7 e 8 descrevem o comportamento das auto-associações dos diferentes anfílicos sintetizados no capítulo anterior, dissolvidos em um solvente seletivo para um dos blocos, através de fluorescência do estado estacionário do pireno, espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamentos de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Esta última técnica foi utilizada para investigar a estrutura interna e dinâmica das micelas desses anfílicos.

#### 7.1 Determinação da *cmc*

Os métodos físicos para a caracterização micelar de anfílicos foram extensivamente revisados e apresentados por diversos pesquisadores, e listam sistematicamente as diferentes técnicas que têm sido aplicadas para determinação das auto-associações, composições e morfologias dos mais variados tipos de anfílicos e copolímeros em bloco.<sup>174-176</sup> Estas opiniões foram concluídas e expandidas recentemente através da técnica SAXS por Mortensen em estudos de fluorescência por Zana.<sup>177, 178</sup>

O conhecimento da *cmc*, adotado na investigação de uma solução de um copolímero em bloco, anfílico do tipo rod-coil e surfactantes é tão importante quanto o conhecimento da fração volume hidrofóbico tendo em vista que, em um regime abaixo da *cmc*, não ocorrem mudanças drásticas nas propriedades da solução e os anfílicos não se organizam em nanoestruturas.

Experimentalmente, a *cmc* é determinada pelo ponto de inflexão de um gráfico de alguma propriedade física da solução em função da concentração do anfílico. Uma ampla variedade de técnicas envolve medidas de tais propriedades físicas como condutividade elétrica, tensão superficial, fluorescência, RMN, viscosidade, espalhamento de luz.<sup>179-181</sup>

Como existe possibilidade de obter a *cmc* por diferentes técnicas podem refletir em uma transição em diferentes extensões. Com isso é comum o mesmo anfílico apresentar uma pequena diferença no valor da *cmc*, o quanto maiores os valores da *cmc*, mais larga a faixa de concentrações na qual a transição ocorre. Uma excelente compilação, apresentando diferenças nos valores da *cmc* devido a diferentes

metodologias empregadas para determiná-los encontra-se no livro de Mukerjee e Mysels.<sup>182</sup>

A energia livre de Gibbs do processo de micelização pode ser calculada a primeira aproximação adotada, levando em consideração o modelo de separação de fases (pseudofase), semelhante a saturação de solubilidade para a formação de agregados micelares, é dada pela definição da energia livre conforme as equações 7 e 8.<sup>133, 183-185</sup>

$$\Delta G = RT \ln(cmc) \quad (7)$$

$$\Delta G = (2 - \alpha)RT \ln(cmc) \quad (8)$$

Onde a equação 7 tem sido utilizada para a determinação da energia livre dos anfífilos não iônicos, compostos das partes hidrofóbicas de diferentes ácidos carboxílicos, enquanto a equação 8 é usada para a determinação da energia livre de anfífilos iônicos.<sup>133, 183-185</sup>

Na literatura explora-se preferencialmente, o uso da concentração molar nos cálculos energéticos do processo de micelização.<sup>186-189</sup> Para o anfílico micelizado, o estado micelar por si próprio é considerado como sendo o estado padrão de acordo com Atwood.<sup>190</sup>

Análise das contribuições específicas é dada pela equação 9, ressaltando que para anfífilos não-iônicos a micelização é sempre endotérmica e para a anfífilos iônicos o processo é variável.<sup>133, 183-185</sup>

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

## 7.2 Emissão de fluorescência do pireno dos anfífilos constituídos de ácidos carboxílicos como parte hidrofóbica

Para os anfífilos com diferentes ácidos carboxílicos conjugados com carboidratos optou-se em realizar experimentos de fluorescência, utilizando como sonda o pireno, que é uma técnica bastante sensível as mudanças do meio.

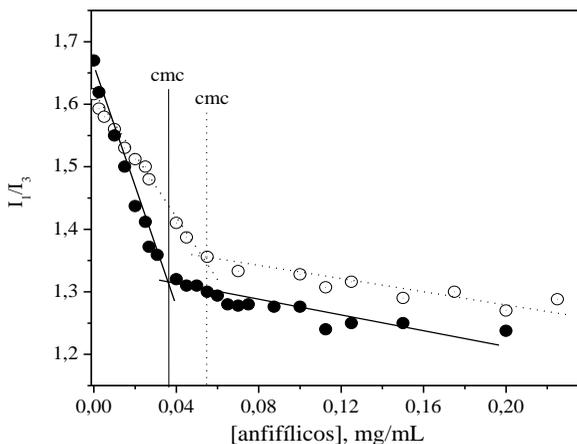
Técnicas utilizando sondas fluorescentes tais como o pireno, já foram utilizadas extensivamente para monitorar a formação de agregados de surfactante e também para determinar a *cmc* das micelas.<sup>191, 192</sup>

Os valores de *cmc* foram obtidos a partir das razões das intensidades das bandas  $I_1$  e  $I_3$  do espectro de emissão de fluorescência do pireno. As relações  $I_1/I_3$  do espectro de fluorescência do pireno diminuíram para os diferentes sistemas com o aumento da concentração total dos anfifílicos, refletindo a incorporação da sonda aos domínios hidrofóbicos devido à formação de agregados.

A atribuição mais razoável do valor de *cmc* nos perfis da Figura 31 refere-se à concentração dos anfifílicos determinados a partir da interceptação das partes íngremes das curvas, os valores de *cmc* para o  $C_{18}PEO_{900}N_3$  (15) e  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) ocorrem em  $\approx 0,033$  mg/mL e 0,055 mg/mL. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar a *cmc* do anfifílico  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) 0,060 mg/mL. A Tabela 4 apresenta os valores de *cmc* obtidos dos perfis da razão  $I_1/I_3$  vs [anfifílicos].

Usualmente, os valores de *cmc* obtidos por esta técnica são ligeiramente menores do que dos valores determinados através do método condutimétrico que analisa uma propriedade da solução e o tensiométrico que analisa uma propriedade da superfície da interface água/ar.

Essa diferença é normalmente esperada considerando a baixa solubilidade do pireno em água, que pode induzir a formação de pré-agregados micelares.



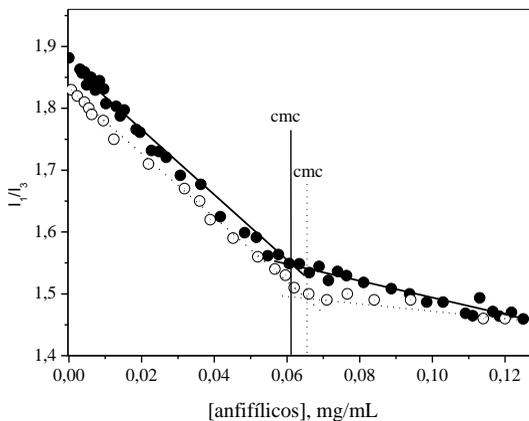
**Figura 31.** Perfis da razão  $I_1/I_3$  dos espectros de fluorescência do pireno medidas em função da concentração de  $C_{18}PEO_{900}N_3$  (15) (●) e  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) (○) em água a 25 °C.

A *cmc* nos perfis da Figura 32, refere-se à concentração dos anfifílicos determinados a partir da interceptação das partes íngremes das curvas. Os valores de *cmc* para o  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  (19) e  $C_{12}PEO_{900}Lac$  (20) ocorrem em  $\approx 0,058$  mg/mL e  $0,066$  mg/mL. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar a *cmc* do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}N_3$  (21)  $0,044$  mg/mL.

Em ambos perfis ilustrados nas Figura 31 e 32, observa-se uma diminuição da razão  $I_1/I_3$  dos espectros de fluorescência do pireno em função da concentração dos anfifílicos refletindo a transferência do pireno de um ambiente polar para um ambiente apolar.

Os mesmos procedimentos foram usados para determinar a *cmc* dos anfifílicos  $C_{10}PEO_{900}N_3$  (21),  $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$  (22) e  $C_{10}PEO_{900}Lac$  (23), ocorrendo em  $\approx 0,049$  mg/mL,  $0,060$  mg/mL e  $0,068$  mg/mL, respectivamente.

Os valores de *cmc* encontrados para os anfifílicos  $C_{10}$  ao  $C_{18}$  são ligeiramente maiores que os relatados na literatura, para os derivados de PEO com ácidos graxos. Esta diferença deve-se ao fato de que os grupos funcionais inseridos na extremidade de cada anfifílico provocam um aumento da solubilidade do monômero, resultando em um aumento na *cmc*.<sup>193-197</sup>



**Figura 32.** Perfis da razão  $I_1/I_3$  dos espectros de fluorescência do pireno medidas em função da concentração de  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  (19) (●) e  $C_{12}PEO_{900}Lac$  (20) (○) em água a  $25$  °C.

Os diferentes valores de *cmc* encontrados para a série de anfifílicos variando o tamanho do ácido carboxílico, aqui apresentados, estão de acordo com a natureza do grupo hidrofóbico, ou seja, com um

aumento no número de átomos na cadeia hidrocarbônica está conduzindo à diminuição da *cmc*, como pode ser visto nas Figuras 31 e 32, e Tabela 4 e resumidos na Figura 33. Através de cálculos teóricos do raio micelar, número de agregação e área superficial disponível por grupo polar a partir do comprimento, em ângstroms, da longa cadeia carbônica e os volumes, tanto do grupo polar, como apolar dos anfifílicos catiônicos, Zana constatou que o incremento do comprimento da cadeia hidrofóbica leva uma maior proximidade entre os grupos hidrofílicos e como, consequência ha uma diminuição da *cmc*.<sup>198</sup> Outra forma de expressar a dependência da *cmc* com o número de átomos de carbono na cadeia apolar é através da equação empírica de Klevens.<sup>179</sup>

$$\log(\text{cmc}) = A - Bn \quad (10)$$

onde A e B são constantes para uma determinada série homóloga.

A diferença dos valores encontrados para os anfifílicos como a mesma série homóloga de carbonos esta diretamente associado na diferença entre a natureza do grupo hidrofílico, cujo aumento no número dos grupos hidrofílicos acarretam um aumento da solubilidade dos anfifílicos e portanto, um aumento da *cmc*, com isso as características referentes a estrutura e composição dos anfifílicos encontradas estão em acordo com aqueles já citados por Holmberg e colaboradores.<sup>37</sup>

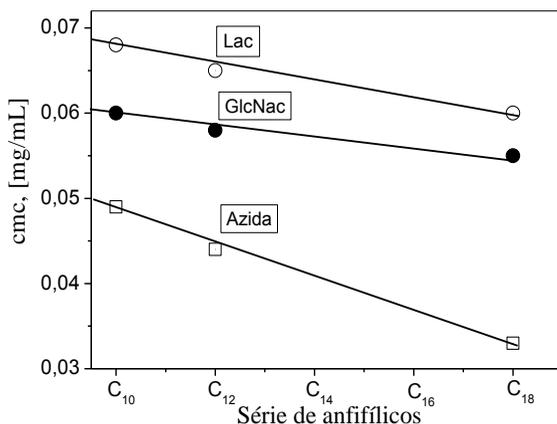
Em posse dos valores do raio do núcleo ou número de agregação experimentais pode-se prever os valores do raio, área superficial hidrofílica ( $a_0$ ) e o número máximo de agregação para alguns tipos de morfologias, tais como esfera, elipsoide, etc.<sup>188, 190</sup>

Os valores de *cmc* determinados a partir das intersecções das razões das intensidades das bandas  $I_1$  e  $I_3$  dos espectros de fluorescência do pireno a 25 °C, fração de volume hidrofóbico ( $\varphi$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ) e os valores de energia livre de Gibbs do processo de micelização ( $\Delta G^{\text{mic}}$ ), são apresentados na Tabela 4. As energias livre de Gibbs do processo de micelização foram determinadas conforme a equação 7, usando a concentração molar nos cálculos energéticos do processo de micelização, levando em conta que o estado teórico dos anfifílicos em solução aquosa é infinitamente diluído.<sup>186-189</sup>

**Tabela 4.** Valores de *cmc* encontrados a partir das razões das intensidades das bandas I<sub>1</sub> e I<sub>3</sub>, fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^{mic}$ ), a 25 °C.<sup>181, 188, 199</sup>

Anfifílicos	$\phi$	<i>cmc</i> (mg/mL)	$\Delta G^{mic}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> (15)	0,277	0,033	-35,96
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc (16)	0,236	0,055	-35,20
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac (17)	0,225	0,060	-35,17
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> (18)	0,197	0,044	-35,06
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc (19)	0,167	0,058	-34,91
C <sub>12</sub> PEO <sub>900</sub> Lac (20)	0,158	0,066	-34,80
C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub> (21)	0,175	0,049	-34,75
C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc (22)	0,140	0,060	-34,77
C <sub>10</sub> PEO <sub>900</sub> Lac (23)	0,132	0,068	-34,68

Os valores de *cmc* dos anfifílicos, obtidos dos perfis da razão I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub> dos espectros de fluorescência do pireno medidos em água, são resumidos na Figura 33. A *cmc* dos anfifílicos mostra uma dependência direta conforme o tamanho da cadeia hidrofóbica e da natureza hidrofílica que compõem a estrutura dos compostos.



**Figura 33.** Relação entre *cmc* (mg/mL) e a série de anfifílicos, (□) Azida, (●) GlcNAc e (○) Lac em água a 25 °C.

Observa-se, que a *cmc* varia linearmente com a série homóloga dos anfifílicos antes e depois da funcionalização com GlcNAc e Lac, cujas correlações lineares são definidas pelas equações 11, 12 e 13, a partir dos resultados obtidos das razões  $I_1/I_3$  dos espectros de fluorescência do pireno, respectivamente.

As determinações da *cmc* por fluorescência variando-se a série hidrofóbica dos anfifílicos mostram um decréscimo linear da *cmc* com o aumento da série homóloga dos carbonos dos anfifílicos  $C_{10}$  à  $C_{18}$  (Figura 33). Este resultado é mais uma evidência que a *cmc* mostra uma dependência do grupo hidrofóbico. A inclinação das curvas é de  $(-1,96 \times 10^{-3}$ ,  $-5,96 \times 10^{-4}$  e  $-9,6 \times 10^{-4})$  para os anfifílicos antes e após da reação de *click chemistry* com GlcNAc e Lac, respectivamente. Uma relação linear entre as *cmc* dos anfifílicos com a variação do comprimento da cadeia hidrofóbica que compõem a estrutura dos anfifílicos é dada pelas equações 11, 12 e 13, para os anfifílicos funcionalizados com Azida, GlcNAc e Lac, respectivamente.

$$\mathbf{cmc}_{\text{azida}} = \mathbf{0,065}_{(\text{mg/mL})} + \mathbf{(-1,96 \times 10^{-3})} * (\text{n}^\circ \text{ de carbonos da série hidrofóbica}) \quad (11)$$

$$\mathbf{cmc}_{\text{GlcNAc}} = \mathbf{0,065}_{(\text{mg/mL})} + \mathbf{(-5,96 \times 10^{-4})} * (\text{n}^\circ \text{ de carbonos da série hidrofóbica}) \quad (12)$$

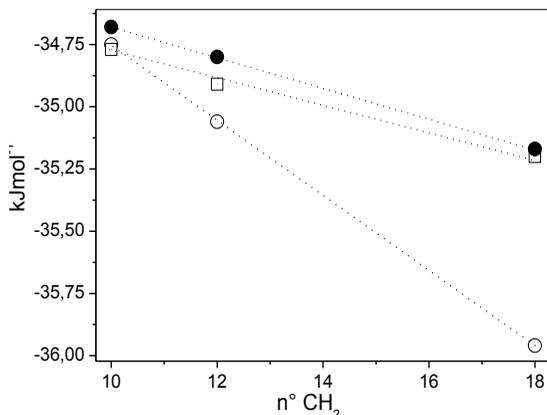
$$\mathbf{cmc}_{\text{Lactose}} = \mathbf{0,077}_{(\text{mg/mL})} + \mathbf{(-9,6 \times 10^{-4})} * (\text{n}^\circ \text{ de carbonos da série hidrofóbica}) \quad (13)$$

As correlações lineares para os três perfis são 0,99; 0,95 e 0,97 para os anfifílicos funcionalizados com Azida, GlcNAc e Lac, respectivamente.

Os valores negativos de energia livre de Gibbs, do processo de micelização apresentados na Tabela 4, estão relacionados a organização dos anfifílicos principalmente pelo efeito hidrofóbico e pela diminuição da entropia do sistema. Os valores de  $\Delta G^{\text{mic}}$  são coerentes e estão de acordo com o que é apresentado na literatura por diversos trabalhos, demonstrando que a tendência de micelização é governada pelo ganho de entropia.<sup>133, 188, 200, 201</sup>

Uma abordagem teórica para o cálculo da energia livre de micelização ( $\Delta G^{\text{mic}}$ ) é feita para os anfifílicos que consiste de uma cadeia de hidrocarbonetos alifáticos com grupos hidrofílicos terminais. Para estas substâncias a energia livre de micelização pode ser dividida em separado por componentes atrativos e repulsivos que compõem a estrutura do anfifílico. O componente atrativo é exclusivamente decorrente do efeito hidrofóbico, que visa minimizar o contato entre os hidrocarbonetos e a água, e assume-se independente do grupo

hidrofílico. Ambos os componentes dependem do tamanho das micelas e sua dependência é aqui relacionada com a dependência da superfície do tamanho da micela. O uso de modelos teóricos foram sugeridos para determinação teórica da área de superfície, afim de esclarecer os processos associativos dos anfifílicos, com ênfase nas contribuições sobre os efeitos hidrofóbicos propostos por Tanford.<sup>200, 202</sup>



**Figura 34.** Relação entre  $\Delta G^{\text{mic}}$  e carbonos da série hidrofóbica dos anfifílicos, (○) Azida, (□) GlcNAc e (●) Lac em água a 25 °C.

A Figura 34, ilustra a relação entre  $\Delta G^{\text{mic}}$  com o número de carbonos que compõem os anfifílicos funcionalizados ou não pelos carboidratos GlcNAc e Lac. Observa-se que as relações entre  $\Delta G^{\text{mic}}$  e carbonos da série hidrofóbica dos anfifílicos Azida, GlcNAc e Lac varia linearmente demonstrando uma dependência com número de carbonos que compõem a parte hidrofóbica, evidenciando o efeito atrativo decorrente das interações hidrofóbicas cujas correlações lineares são definidas pelas equações 14, 15 e 16.

$$\Delta G^{\text{mic}}_{\text{azida}} = -33,24 \text{ kJ mol}^{-1} + (-0,151 \text{ kJ mol}^{-1}) * (\text{n}^\circ \text{ de carbonos}) \quad (14)$$

$$\Delta G^{\text{mic}}_{\text{GlcNAc}} = -34,26 \text{ kJ mol}^{-1} + (-0,525 \text{ kJ mol}^{-1}) * (\text{n}^\circ \text{ de carbonos}) \quad (15)$$

$$\Delta G^{\text{mic}}_{\text{Lactose}} = -34,06 \text{ kJ mol}^{-1} + (-0,0631 \text{ kJ mol}^{-1}) * (\text{n}^\circ \text{ de carbonos}) \quad (16)$$

As correlações lineares para os três perfis são 0,99; 0,98 e 0,99 para os anfifílicos Azida, GlcNAc e Lac, respectivamente.

Os dados apresentados até aqui permitem algumas conclusões fundamentais:

- (i) Os anfifílicos do tipo rod-coil constituídos de diferentes ácidos graxos auto-associam espontaneamente, evidenciados pelos perfis da razão  $I_1/I_3$  dos espectros de fluorescência do pireno;
- (ii) Os anfifílicos até aqui apresentados mostraram valores de *cmc* inferiores em comparação aos surfactantes gêmeos e glicosídicos convencionais;
- (iii) O aumento no número de átomos na cadeia hidrocarbônica conduz à diminuição da *cmc*, este fato está associado com a predominância do efeito hidrofóbico;
- (iv) Um aumento no número dos grupos hidrofílicos acarreta um aumento da solubilidade dos anfifílicos e como consequência, um acréscimo da *cmc*;
- (v) A energia livre de Gibbs do processo de micelização varia linearmente demonstrando a dependência dos grupos apolares.

### 7.3 Emissão de fluorescência dos anfifílicos do tipo rod-coil com parte hidrofóbica constituída de poliaromáticos

Diferentes valores de *cmc* para as estruturas dos anfifílicos do tipo rod-coil com parte hidrofóbica constituída de 4 e 5 anéis aromáticos foram determinados fazendo o uso do método de fluorescência utilizando como sonda o reagente Vermelho Nilo por Lee e colaboradores.<sup>77, 203</sup>

A determinação da *cmc* por fluorescência dos anfifílicos constituído de poliaromáticos utilizando como sonda o pireno poderia trazer resultados divergentes, pois os seguintes anfifílicos podem ser excitados numa faixa entre 290 a 330 nm, a faixa de excitação é bem próxima utilizada pelo pireno e a emissão é observada em 398 e 420 nm ocorrendo assim uma sobreposição das cinco bandas vibrônicas, bem resolvidas do pireno (Figura 24) entre 370 e 400 nm.

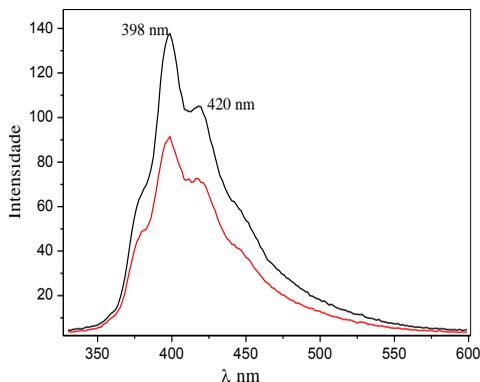
Os anfifílicos  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{GLcNAc}$  (6),  $4\phi\text{PEGO}_{900}\text{Lac}$  (7),  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GLcNAc}$  (13), aqui preparados apresentam estruturas e valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ): 0,278, 0,237, 0,226, 0,36 e 0,294 semelhantes aos preparados por Lee e colaboradores.<sup>77, 204</sup>

Como os valores de *cmc* encontrados pelos autores acima são na ordem de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> valores bem abaixo aos encontrados para surfactantes comuns tais como dodecanoato de sódio (SDoD) 0,027 mol.L<sup>-1</sup> e os anfifílicos discutidos anteriormente.<sup>205</sup> Optou-se em realizar os experimentos de MET, DLS e SAXS numa faixa de concentração desses anfifílicos bem acima da *cmc*, apresentados por Lee e colaboradores.<sup>77, 203</sup>

Outras técnicas citada em alguns parágrafos precedentes que acompanham propriedades físicas da solução em função da concentração do anfifílico poderiam ser usadas para determinação do valor da *cmc*, porém necessitaria grande quantidade do produto tornando-se inviável devido as várias etapas da rota sintética e o custo.

Com o intuito de acompanhar o processo de emissão de fluorescência e futuras utilizações como sonda fluorescente no estudo de interações de anfifílicos com polímeros neutros hidrossolúveis, foram realizados experimentos excitando o anfifílico 4φPEO<sub>600</sub>GLcNAc (13) em 320 nm e registrando os espectros de intensidade de emissão entre 330 e 600 nm, foram observadas duas bandas uma em 398 nm e outra em 420 nm, cujas intensidades aumentaram com o aumento da concentração do anfifílico em água (Figura 35). Este fato é decorrente das fortes interações hidrofóbicas das ligações π-π, dos anéis poliaromáticos que compõem a parte hidrofóbica dessas moléculas.

Por fim, o experimento evidencia que a força principal que orienta a auto-associação desses anfifílicos do tipo rod-coil é atrativa entre os anéis poliaromáticos.



**Figura 35.** Espectro de emissão de fluorescência em função da concentração do anfifílico 4φPEG<sub>600</sub>GlcNAc (13) 0,005 mg/mL (—) e 0,015 mg/mL (—) em água a 25 °C, com excitação em 320 nm.

#### 7.4 Morfologia das nanopartículas acessadas por DLS e MET

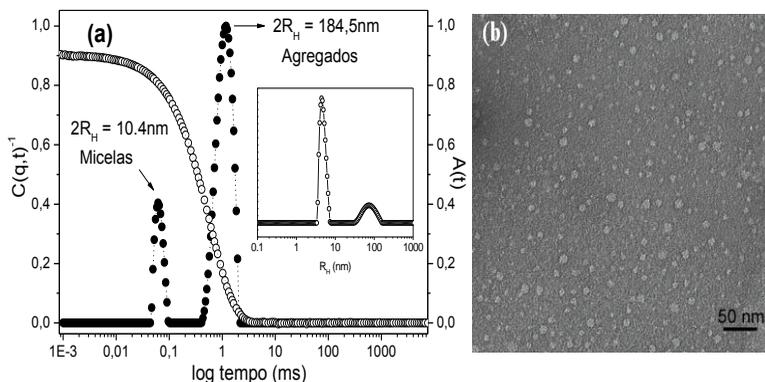
Os anfifílicos quando dissolvidos em água, um bom solvente para um dos blocos e pobre para outro, auto-associam em diferentes morfologias, dependentes de fatores como massa molar, fração em volume hidrofóbico, bem como da sua incompatibilidade e também pelo método de preparação.<sup>143</sup>

Os diferentes anfifílicos sintetizados e caracterizados no Capítulo 6, foram preparados por dissolução direta em água Milli-Q ou em solução tampão em concentrações acima da *cmc* entre uma faixa 0,10 e 1,50 mg/mL e investigados por DLS, MET e SAXS. Maiores detalhes sobre a preparação das soluções e dos equipamentos utilizados, estão descritos no Capítulo 5 (Item 5.1, 5.3, 5.4 e 5.5).

Primeiramente serão apresentados os resultados para os anfifílicos compostos de diferentes ácidos carboxílicos atuando como parte hidrofóbica, mantendo a braço espaçador PEO, funcionalizados com os carboidratos GlcNAc e Lac e posteriormente os compostos formados da mesma parte hidrofílica substituindo a parte hidrofóbica por poliaromáticos.

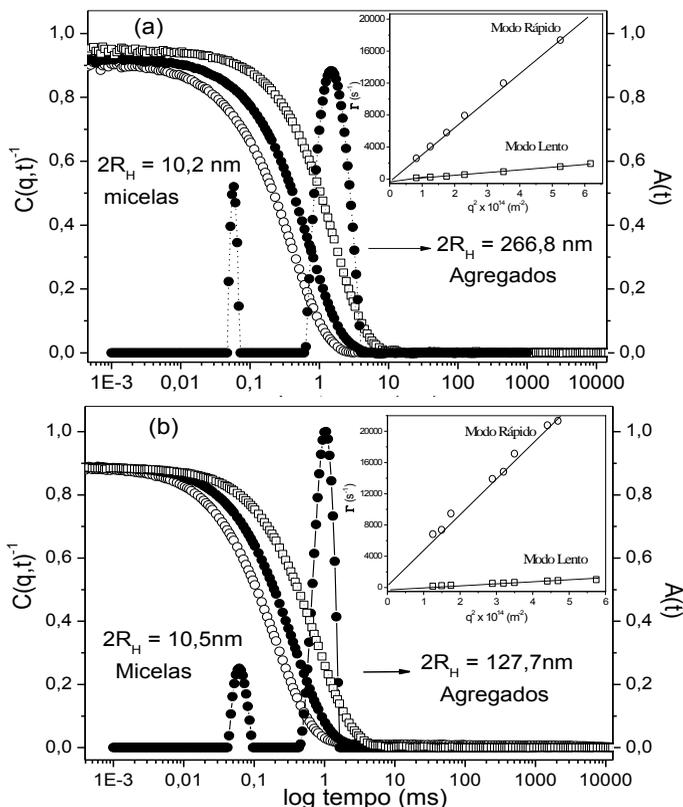
#### 7.5 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos $C_{18}PEO_{900}N_3$ , $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$ e $C_{18}PEO_{900}Lac$

A Figura 36 mostra a função de autocorrelação  $C(q,t)$ , medida a  $90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , como revelado pela análise do programa comercial CONTIN para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{18}PEO_{900}N_3$  (15) em água Milli-Q. O intermediário 15 não-glicosilado auto-associa, em solução aquosa em nanopartículas com baixa polidispersidade com diâmetro ( $2R_H = 10,4$  nm). Além da contribuição de intensidade relacionada à presença de micelas bem definidas, observa-se ainda a presença de uma contribuição de espalhamento de luz atribuído à formação de grandes agregados com estruturas flexíveis. No entanto, a intensidade de espalhamento de luz é ponderada pela massa das partículas e tamanho, o que implica que DLS relata uma distribuição de intensidade média. A inserção na Figura 36, mostra a distribuição do  $R_H$ , tendo em conta a contribuição do volume das partículas, em vez de a contribuição de espalhamento de luz onde pode ser facilmente notado que a presença de grandes agregados podem ser negligenciados, como claramente demonstrado pela imagem de MET, (Figura 36 (b)). A racionalização é igualmente válida para outros anfifílicos.



**Figura 36.** Função de correlação temporal típica adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , de uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{18}PEO_{900}N_3$  (15) a  $25^\circ C$ . A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , considerando a contribuição das partículas relacionadas com o seu volume total. Imagem obtida por MET da auto-associação do anfifílico  $C_{18}PEO_{900}N_3$  (15) em água, visualizada após coloração negativa.

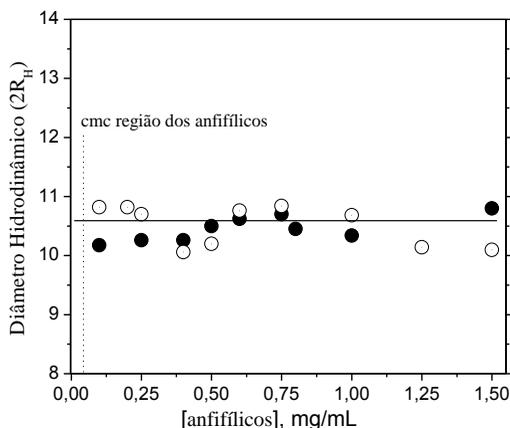
A Figura 37 mostra as funções de correlação temporal, medida em diferentes ângulos de espalhamento e as respectivas distribuições do tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$  para os respectivos anfifílicos dissolvidos em água  $C_{18}PEO_{900}GlcNac$  (16) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) ambos na concentração de 0,5 mg/mL. As inserções na (Figura 37 (a) e (b)), mostram a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$  indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas.



**Figura 37.** Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para soluções aquosas dos anfífilicos (a)  $0,5 \text{ mg/mL}$   $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) e (b)  $0,5 \text{ mg/mL}$   $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16), em água a  $25^\circ\text{C}$ . As inserções mostram a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$  indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas.

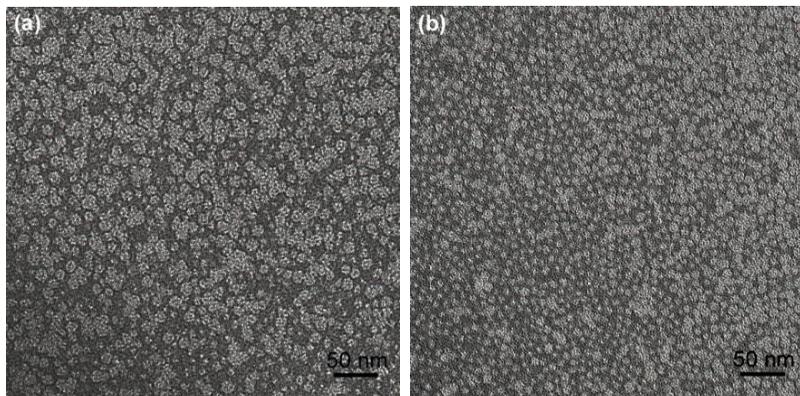
Os raios hidrodinâmicos para os  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17), foram calculados aplicando-se a relação de Stokes-Einstein, definido aqui pela equação 3, pode-se observar que os valores encontrados para ambos anfífilicos são semelhantes ao encontrado para o anfífilico  $C_{18}PEO_{900}N_3$  (15) antes da reação de *click chemistry*. O tamanho hidrodinâmico ( $2R_H$ ) das partículas são iguais a  $10,5$  e  $10,2 \text{ nm}$  para  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17), respectivamente.

A Figura 38 resume os valores obtidos para  $2R_H$  em função da concentração dos anfifílicos dissolvidos em água  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) demonstrando que o tamanho das micelas é independente da concentração em ambos os casos (para  $C > cmc$ ), considerando somente a primeira contribuição de distribuição de  $R_H$ , negligenciando a segunda distribuição atribuída aos agregados.



**Figura 38.** Diâmetro hidrodinâmico ( $2R_H$ ) em função da concentração dos anfifílicos  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) (○) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) (●), medido em água a 25 °C.

As imagens de MET (Figura 39), revelaram que ambos anfifílicos auto-associaram em nano-estruturas esféricas na faixa de 10 nm, com baixa polidispersidade formadas em água. Apenas um pequeno número de grandes agregados podem ser observados na microscopia sugerindo que, embora a técnica de espalhamento de luz dinâmica é muito sensível à presença de grandes agregados, o número real nos sistemas atuais é insignificante, como mencionado por vários autores, o tamanho, morfologia e estrutura das nanopartículas é principalmente dependente do equilíbrio de forças de atração e repulsão entre os diferentes blocos de anfifílicos. As micelas esféricas encontradas aqui são compatíveis com a fração volumétrica da região hidrofóbica ( $\phi$ ) < 1/3.<sup>34, 206, 207</sup> De fato, a fração hidrofóbica calculada para os anfifílicos constituídos da parte hidrofóbica do ácido esteárico com base na densidade de cada constituinte foi igual a 0,28, 0,24 e 0,23, respectivamente, ver Tabela 5, assim micelas esféricas são esperadas.<sup>34, 159, 207</sup>



**Figura 39.** Imagens obtidas por MET dos auto-conjuntos, visualizadas após coloração negativa para os anfifílicos: **(a)**  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) e **(b)**  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17). Barra de escala corresponde a 50 nm.

Outros autores exploram que a morfologia micelar esférica para os anfifílicos que apresentam um valor da fração da massa hidrofílica do poli(óxido etileno) ( $W_{PEO}$ ) seja acima de 65%, e que na faixa entre 55 a 65% há possibilidade de encontrar morfologias cilíndricas e esféricas ou uma mistura das duas morfologias, nesse caso os anfifílicos aqui apresentados tem uma fração hidrofílica entre 57 a 65%, porém somente morfologias esféricas foram encontradas.<sup>143</sup> Nas imagens de MET mostradas acima, tomou-se o cuidado de não fazer a filtração da solução.

Através dos coeficientes de difusão inseridos na Figura 37, observa-se que os valores da frequência angular dos anfifílicos (16) e (17) são linearmente dependentes de  $q^2$  para ambos anfifílicos e a extrapolação para  $q \rightarrow 0$  passando pela origem evidência claramente um comportamento difusivo típico de partículas esféricas e não cilíndricas.<sup>34,77</sup>

Os valores dos coeficientes de difusão do modo rápido e lento para o anfifílico  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) são  $3,41 \times 10^{-11} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$  e  $3,35 \times 10^{-12} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$  e para o anfifílico  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) assume valores semelhantes  $4,33 \times 10^{-11} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$  e  $2,94 \times 10^{-12} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$ .

Com o intuito de reforçar que a presença de grandes agregados pode ser realmente negligenciada, optou-se em fazer experimentos utilizando a técnica de Cryo-TEM dos anfifílicos em altas concentrações sem filtrar a solução que foi depositada e exposta a uma temperatura inferior a  $-120^\circ\text{C}$ . Através do experimento não foi possível detectar as

pequenas partículas de tamanho de 10 nm vistos por (DLS e MET), pois a técnica é eficaz com partículas superiores a 20 nm.

O número de agregação teórico dos anfifílicos *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina-PEO<sub>900</sub>-Estearato e  $\beta$ -Lactosil-PEO<sub>900</sub>-Estearato conjugados foi determinado através de cálculos que consideram estruturas perfeitamente esféricas. O número máximo de monômeros para os anfifílicos podem variar com a temperatura, adição de aditivo e da área da superfície hidrofílica.

Na literatura, anfifílicos com tamanhos variados de PEO conjugados com os ácidos esteárico e dodecanóico apresentaram valores de agregação maiores que os calculados para os anfifílicos PEO<sub>900</sub>-Estearato. Isso pode ser justificado devido a diferença da fração volume hidrofóbico. Os anfifílicos, mesmo constituídos de uma parte hidrofóbica diferente, auto-associam em nanopartículas de tamanho e coeficientes de difusão semelhantes aos anfifílicos *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina-PEO<sub>900</sub>-Estearato e  $\beta$ -Lactosil-PEO<sub>900</sub>-Estearato conjugados.<sup>193</sup> A Tabela 5, faz uma compilação dos parâmetros obtidos dos anfifílicos descritos acima.

**Tabela 5.** Valores de fração volume hidrofóbico ( $\varphi$ ), diâmetro da nanopartícula ( $2R_H$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ), parâmetro de empacotamento ( $P$ ) e morfologia dos anfifílicos C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>N<sub>3</sub>, C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc e C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>Lac.<sup>188, 199</sup>

Anfifílicos	$\varphi$	$2R_H$	$l_c$ (nm)	$v$ (nm <sup>3</sup> )	$P^a$	$N_{agg}$ teórico	Morfologia
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	0,28	10,4	2,304	0,484	Nd	Nd	esférica
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> GlcNAc	0,24	10,5	2,304	0,484	0,24	94	esférica
C <sub>18</sub> PEO <sub>900</sub> Lac	0,22	10,2	2,304	0,484	0,23	78	esférica

<sup>a</sup> $P = v/(a_0 l_c)$ ,  $a_0$  área da superfície hidrofílica na cmc.

Nd = Não determinado.

## 7.6 Nanopartículas formadas a partir dos anfífilicos $C_{12}PEO_{900}N_3$ , $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$ e $C_{12}PEO_{900}Lac$

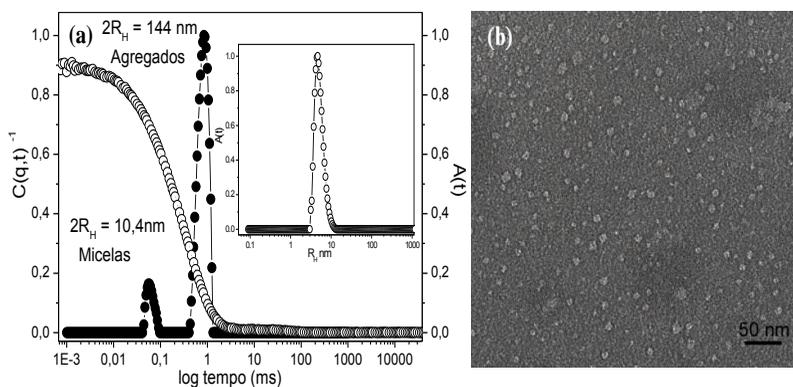
Os processos associativos de outra série de anfífilicos variando o tamanho da parte hidrofóbica foram investigados, demonstrando que os anfífilicos constituídos do ácido carboxílico dodecanóico se comportaram de maneira semelhante aos anfífilicos 15, 16 e 17 citados na seção 7.5.

A Figura 40, mostra a função de correlação temporal, medida a  $90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , analisadas por CONTIN, para uma solução de 0,5 mg/mL  $C_{12}PEO_{900}N_3$  (18) a  $25^\circ C$ . O anfífilico (18) não-glicosilado auto-associa em solução aquosa em nanopartículas com diâmetro ( $2R_H = 10,4$  nm) e observa-se ainda a presença de uma contribuição de espalhamento de luz atribuído à formação de grandes agregados com tamanhos de ( $2R_H = 144$  nm).

No entanto, a intensidade de espalhamento de luz é ponderada pela massa das partículas e tamanho o que implica que DLS relatou uma distribuição de intensidade média.

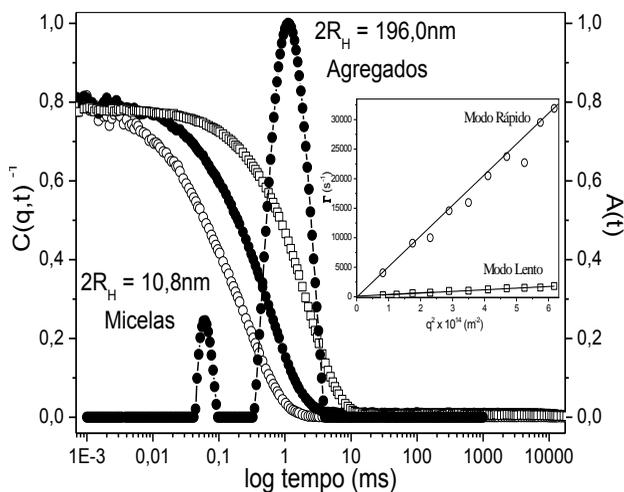
A inserção na Figura 40 (a), mostra uma distribuição do  $R_H$ , tendo em conta a contribuição do volume das partículas. Através da imagem de MET Figura 40 (b), observa-se que a presença de grandes agregados pode ser negligenciada, como claramente demonstrado pela inserção na Figura 40 (a).

A imagem de MET mostra que o anfífilico antes da reação de *click chemistry*, auto-associa em nanopartículas esféricas com baixa polidispersidade com tamanho aproximado de 10 nm. Os resultados de DLS e MET são semelhantes aos encontrados para os anfífilicos constituídos do ácido esteárico como parte hidrofóbica.



**Figura 40.** Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}N_3$  (18) a  $25^\circ C$ . A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , em volume total. **(b)** Imagem obtida por MET da auto-associação do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}N_3$  (18) em água, visualizada após coloração negativa.

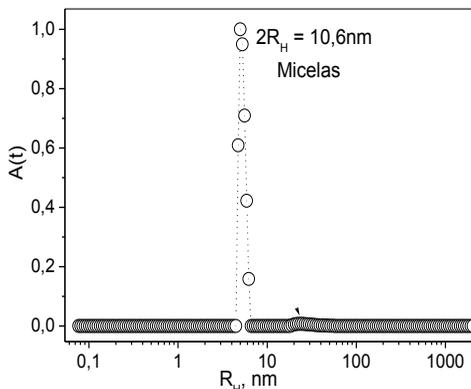
O processo de auto-organização dos anfifílicos constituídos do ácido carboxílico dodecanóico funcionalizados com os carboidratos GlcNac e Lac foram investigados por DLS e MET. A Figura 41 mostra as funções de correlação temporal monitoradas em diferentes ângulos  $\theta = 50^\circ, 90^\circ$  e  $130^\circ$ , e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para solução aquosa do anfifílico  $C_{12}PEG_{900}Lac$  (20). É importante salientar que as funções de correlação temporal são representadas por curvas monoexponenciais indicando a boa correlação do anfifílico  $C_{12}PEG_{900}Lac$ . Observa-se a existência de dois modos de relaxação, o primeiro com diâmetro  $2R_H = 10,8$  nm, referente a micelas esféricas e o segundo é atribuído à formação de agregados com tamanhos de  $2R_H = 196$  nm, o qual posteriormente pode ser negligenciado pelas imagens MET (ver Figura 43).



**Figura 41.** Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para solução aquosa  $0,5 \text{ mg/mL}$  do anfifílico  $C_{12}\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (20) a  $25^\circ\text{C}$ . A Figura inserida mostra a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$  indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas.

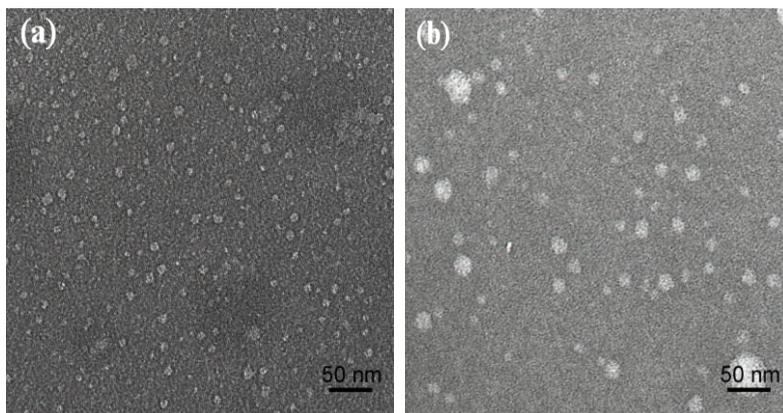
Por fim, a inserção na Figura 41, mostra os coeficientes de difusão obtidos dos movimentos aleatórios (brownianos) das moléculas, os valores da frequência angular é linearmente dependentes de  $q^2$  evidenciando nitidamente um comportamento difusivo típico de partículas esféricas, semelhante aos anfifílicos descritos na seção 7.5.

O anfifílico  $C_{12}\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (19), comporta-se de forma semelhante aos anfifílicos anteriores, o qual é observado na Figura 42 e na imagem de MET na Figura 43. A Figura 42 mostra a distribuição do  $R_H$ , levando em conta a contribuição do volume das partículas, predominando as partículas esféricas de diâmetro aproximado ( $2R_H = 10,6 \text{ nm}$ ), semelhante ao encontrado aos anfifílicos  $C_{18}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$ , contendo a mesma parte hidrofílica e também aos anfifílicos com diferentes partes hidrofílicas mencionados em parágrafos antecedentes.



**Figura 42.** Distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$  obtida através do tratamento matemático utilizando-se o algoritmo CONTIN, para uma solução aquosa do anfifílico  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  0,5 mg/mL a  $25^\circ C$ .

As imagens obtidas por MET confirmaram a existência das nanopartículas esféricas com tamanhos aproximados de 10 nm para ambos anfifílicos  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  (19) e  $C_{12}PEO_{900}Lac$  (20), estando em acordo com os resultados obtidos por espalhamento de luz.



**Figura 43.** Imagens obtida por MET das auto-associações dos anfifílicos (a)  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  (19) e (b)  $C_{12}PEO_{900}Lac$  (20) em água, visualizadas após coloração negativa. Barra de escala é de 50 nm.

A morfologia esférica encontrada para ambos anfifílicos do tipo rod-coil investigadas por DLS e MET esta de acordo com as frações em volume dos segmentos hidrofílico e hidrofóbico, a composição hidrofílica calculado para PEO esta acima de 60% e fração volume hidrofóbico abaixo de 30%, ver Tabela 6. A dinâmica das auto-associações dos anfifílicos é puramente atrativa, dependente principalmente das interações hidrofóbica que compõem cada anfifílico.

**Tabela 6.** Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula ( $2R_H$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ) e morfologia dos anfifílicos  $C_{12}PEO_{900}N_3$ ,  $C_{12}PEO_{900}GlcNAc$  e  $C_{12}PEO_{900}Lac$ .<sup>188, 199</sup>

Anfifílicos	$\phi$	$2R_H$	$l_c$ (nm)	$v$ (nm <sup>3</sup> )	Morfologia
$C_{12}PEO_{900}N_3$	0,197	10,4	1,540	0,323	esférica
$C_{12}PEO_{900}GlcNAc$	0,167	10,6	1,540	0,323	esférica
$C_{12}PEO_{900}Lac$	0,158	10,8	1,540	0,323	esférica

### 7.7 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos $C_{10}PEO_{900}N_3$ , $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$ e $C_{10}PEO_{900}Lac$

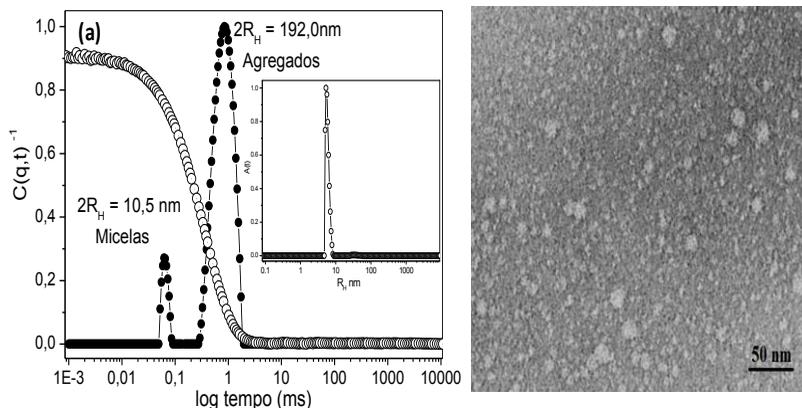
A série dos anfifílicos sintetizados e caracterizados no Capítulo 6, variando o tamanho do ácido carboxílico e mantendo as mesmas partes hidrofílicas, foi investigada o por DLS e MET, demonstrando que os anfifílicos constituídos do ácido carboxílico decanóico se comportaram de maneira semelhante aos compostos 15 ao 20 citados nas seções 7.5 e 7.6.

Os anfifílicos  $C_{10}PEO_{900}N_3$  (21),  $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$  (22) e  $C_{10}PEO_{900}Lac$  (23) sintetizados, apresentam frações hidrofóbicas menores ( $\phi$ ) < 1/3, ver Tabela 7, logo são esperadas micelas esféricas.<sup>34, 159, 207</sup>

A Figura 44 (a) mostra a função de autocorrelação  $C(q,t)$ , medida a 90° e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , analisada para uma solução de 0,5 mg/mL  $C_{10}PEO_{900}N_3$  (21) a 25 °C. O anfifílico ainda não funcionalizado pelos carboidratos GlcNAc e Lac, auto-organiza em solução aquosa em nanopartículas com diâmetro ( $2R_H = 10,5$  nm) e observa-se ainda a presença de uma contribuição de espalhamento de luz atribuído à formação de grandes agregados com tamanhos de ( $2R_H = 192$  nm). A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , considerando a contribuição das partículas relacionadas com o seu volume total, o qual pode-se desconsiderar a

contribuição do tempo de relaxação correspondente à formação de grandes agregado, como explorado anteriormente.

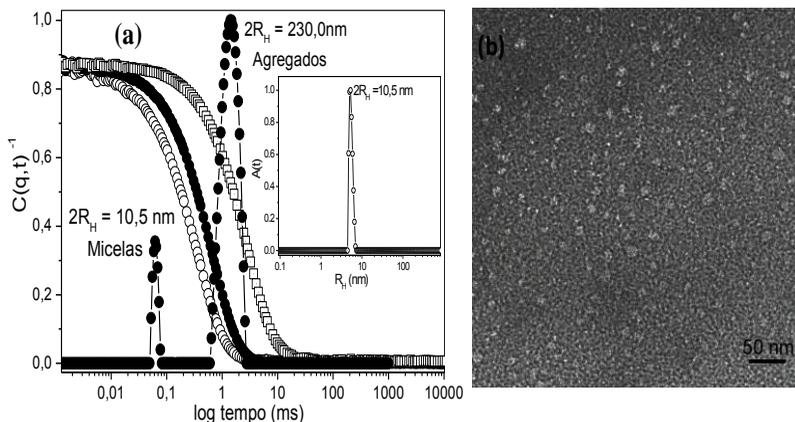
Por fim, a imagem obtida por MET, Figura 44 (b), confirma a existência das nanopartículas esféricas com tamanhos aproximados de 10 nm e outras partículas de 20 nm encontradas são decorrentes da fusão ou agregação de duas pequenas durante o processo de secagem da amostra.



**Figura 44.** Função de autocorrelação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução aquosa do anfifílico  $C_{10}PEO_{900}N_3$  (21), 0,5 mg/mL a  $25^\circ C$ . A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , considerando a contribuição das partículas relacionadas com o seu volume total. (b) Imagem obtida por MET da auto-associação do anfifílico  $C_{10}PEG_{900}N_3$  (22) em água, visualizada após coloração negativa.

O anfifílico  $C_{10}PEG_{900}Lac$  (23), comporta-se de forma semelhante aos demais anfifílicos constituídos da mesma parte hidrofóbica e também em comparação aos de tamanho diferentes de ácidos graxos, apresentando morfologia esférica com diâmetro aproximado de 10 nm. A estrutura interna e outros parâmetros dos anfifílicos serão discutidos através dos perfis de SAXS no Capítulo 8.

O anfílico  $C_{10}PEG_{900}GLcNAc$  (22) auto-associa em pequenas partículas esféricas de tamanho 10,5 nm como demonstrado na (Figura 45 (a) e (b)). A Figura inserida evidencia claramente a distribuição de  $R_H$  concordando com os resultados de MET e SAXS explorados no Capítulo 8.



**Figura 45.** (a) Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para solução aquosa do anfílico 0,5 mg/mL  $C_{10}PEG_{900}GLcNAc$  (22). A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , considerando a contribuição das partículas relacionadas com o seu volume total. (b) Imagem obtida por MET da auto-associação do anfílico  $C_{10}PEG_{900}GLcNAc$  (22) em água, visualizada após coloração negativa.

Os resultados teóricos obtidos de Nagg, Tabela 7, são menores que os apresentados para os anfílicos constituídos de  $C_{18}$  na parte hidrofóbica e próximos aos obtidos experimentalmente dos ajustes dos perfis de SAXS.<sup>193</sup>

A morfologia micelar esférica para os anfílicos compostos da parte hidrofóbica do ácido decanóico era esperada, visto que os anfílicos antes e depois da funcionalização apresentam um grau de empacotamento menor que 1/3 e também apresentam um valor da fração da massa hidrofílica do poli(óxido etileno) ( $W_{PEO}$ ) acima de 65% indo de encontro ao que é explorado na literatura que preve somente estruturas micelares esféricas acima de 60% ( $W_{PEO}$ ).<sup>143</sup>

**Tabela 7.** Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula ( $2R_H$ ), comprimento da cadeia carbônica ( $l_c$ ), volume ( $v$ ), parâmetro de empacotamento ( $P$ ) e morfologia dos anfifílicos  $C_{10}PEO_{900}N_3$ ,  $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$  e  $C_{10}PEO_{900}Lac$ .<sup>188, 199</sup>

Anfifílicos	$\phi$	$2R_H$	$l_c$ (nm)	$v$ (nm <sup>3</sup> )	$P^a$	$N_{agg}$ teórico	Morfologia
$C_{10}PEO_{900}N_3$	0,175	10,5	1,292	0,269	Nd	Nd	esférica
$C_{10}PEO_{900}GlcNAc$	0,140	10,5	1,292	0,269	0,145	34	esférica
$C_{10}PEO_{900}Lac$	0,132	10,6	1,292	0,269	0,130	28	esférica

<sup>a</sup> $P = v/(a_0l_c)$ ,  $a_0$  área da superfície hidrofílica, na *cmc*.

Nd = Não determinado.

Os anfifílicos do tipo rod-coil constituídos de  $C_{10}$  a  $C_{18}$ , auto-associam espontaneamente em nanopartículas esféricas em água do tamanho aproximado de 10 nm, o conhecimento dos parâmetros que compõem cada anfifílico é de extrema importância, pois permite prever a passagem de uma morfologia para outra, como vai ser explorado nas próximas seções, para os anfifílicos compostos de poliaromáticos.

Para os anfifílicos acima  $C_{10}$  a  $C_{18}$  há possibilidade de mudar a morfologia e o tamanho das nanopartículas em duas hipóteses a primeira seria preparar as nanopartículas por dissolução indireta, dissolvendo em solventes orgânicos tais como DMSO e dioxano e lentamente adicionando uma pequena quantidade de água gota à gota, em seguida realizar a diálise onde pequenas partículas e os monômeros que não se associaram serão excluídas devido ao tamanho do corte da membrana da diálise.

E a outra forma, é controlar uma faixa segura da fração volume hidrofóbico que possa migrar de uma estrutura para outra. Por exemplo, para os anfifílicos  $C_{10}$  a  $C_{18}$  acima apresentados, poderia ser diminuído o tamanho do PEO pela metade, e como consequência, aumentaria a porcentagem hidrofóbica e poderíamos obter cilindros. Dessa forma, utilizando o mesmo protocolo de síntese poderiam ser obtidos diferentes morfologias com infinitas aplicações levando em conta sempre a composição de cada constituinte.

## 7.8 Nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos $4\phi PEG_{900}N_3$ , $4\phi PEG_{900}GlcNAc$ e $4\phi PEG_{900}Lac$

O processo de auto-organização dos anfifílicos rod-coil, constituídos da parte hidrofóbica de anéis aromáticos e da parte flexível hidrofílica composta do polímero PEO funcionalizados com

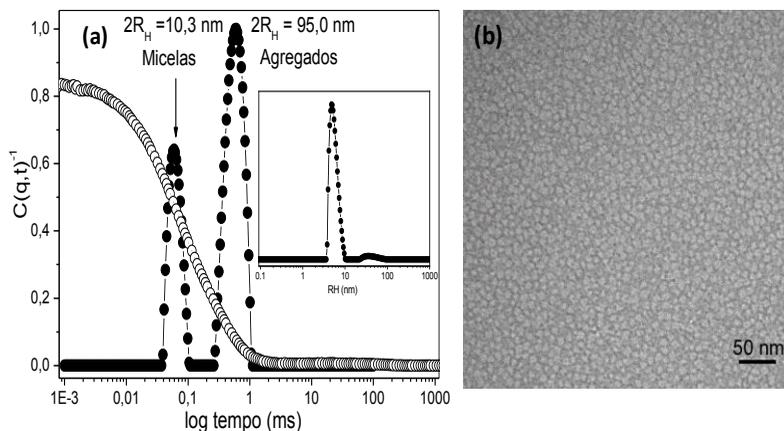
carboidratos GlcNAc e Lac em solução aquosa foram investigados. Estes anfifílicos foram estudados através de experimentos de DLS e MET e no Capítulo 8 através de experimentos de SAXS.

Os anfifílicos constituídos de uma parte hidrofílica maior auto-associam em estrutura supramoleculares esféricas. Em contrapartida, com a diminuição do tamanho do polímero PEO que compõem a parte hidrofílica dos anfifílicos rod-coil, observa-se uma mudança na morfologia das partículas esféricas para estruturas vesiculares.

Primeiramente serão apresentados os resultados para os anfifílicos constituídos da parte hidrofílica maior  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7), posteriormente os anfifílicos compostos de uma parte hidrofílica menor  $4\phi\text{PEG}_{600}\text{N}_3$  (12),  $4\phi\text{PEG}_{600}\text{GlcNAc}$  (13).

A Figura 46 mostra a função de correlação temporal, medido a um ângulo de dispersão de  $90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , como revelado pela análise do programa comercial CONTIN para uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5), a  $25^\circ\text{C}$ . É importante notar que a função de correlação é representada por uma boa curva mono-exponencial, indicando uma boa correlação da amostra. Para o anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5), um intermediário não-glicosilado auto-associa, em solução aquosa em nanopartículas esféricas com baixa polidispersidade com diâmetro ( $2R_H = 10,3$  nm). Observa-se ainda a presença de uma contribuição de espalhamento de luz atribuído à formação de grandes agregados com estruturas flexíveis. No entanto, a intensidade de espalhamento de luz é ponderada pela massa das partículas e tamanho o que implica que DLS relata uma distribuição de intensidade média.

A inserção na Figura 46 (a), mostra a distribuição do  $R_H$ , tendo em conta a contribuição do volume das partículas, em vez da contribuição de espalhamento de luz onde pode ser facilmente notado que a presença de grandes agregados que podem ser negligenciados, como claramente demonstrado pela imagem MET, Figura 46 (b). A simplificação é igualmente válida para os anfifílicos  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7).



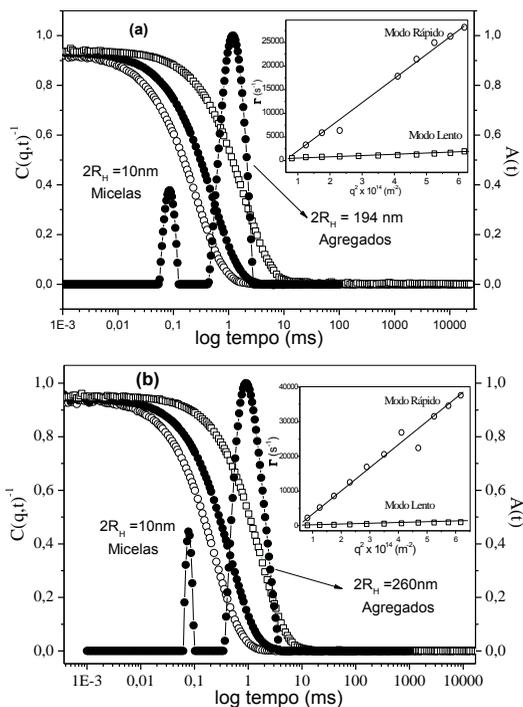
**Figura 46.** (a) Típica função de autocorrelação  $C(q,t)$  adquiridas no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , como revelado pela análise utilizando-se o algoritmo CONTIN, de uma solução aquosa de 0,5 mg/mL do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5), em água a  $25^\circ\text{C}$ . A Figura inserida mostra a respectiva distribuição de  $R_H$ , considerando a contribuição das partículas relacionadas com o seu volume total. (b) Imagens obtidas por MET da auto-associação do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5) em água. As estruturas foram visualizadas após a coloração negativa. Barra de escala é de 50 nm.

A auto-associação em pequenas micelas esféricas do intermediário não-glicosilado  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5) é semelhante a morfologia encontrada por Lee e colaboradores.<sup>77</sup> A imagem obtida por MET ilustra claramente a formação de nanopartículas esféricas com baixa polidispersa, racionalizando que a contribuição de grandes agregados pode ser desconsiderada, como mencionado nos parágrafos anteriores.

Por fim, a morfologia esférica era esperada, devido que o anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5) apresenta uma fração volume hidrofóbico menor que 1/3 e fração da massa hidrofílica do PEO acima de 65%.

A auto-associação do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5) em solução aquosa, reforça o sucesso da reação de “click chemistry” através dos bons rendimentos obtidos, descritos no Capítulo 6, na qual a funcionalização do anfifílico se da em meio aquoso.

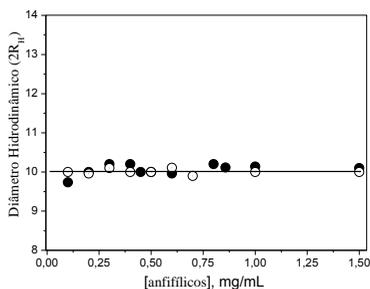
A Figura 47, mostra as funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuições de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para soluções aquosas dos anfifílicos  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7). Os raios hidrodinâmicos dos anfifílicos (6) e (7) foram calculados usando a relação de Stokes-Einstein e estes são praticamente os mesmos dos valores obtidos antes da reação de *click chemistry*. Os tamanhos hidrodinâmico ( $2R_H$ ) das partículas são iguais a 10,0 e 10,0 nm para  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7), respectivamente.



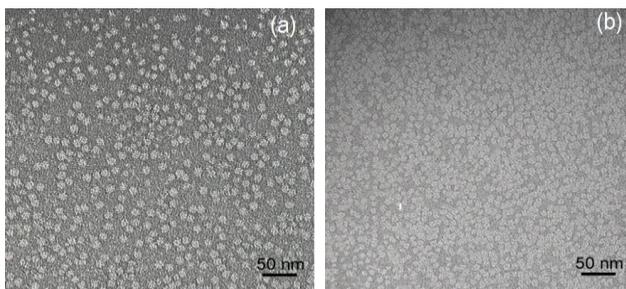
**Figura 47.** Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos  $50^\circ$  ( $\circ$ ),  $90^\circ$  ( $\bullet$ ) e  $130^\circ$  ( $\square$ ), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a  $90^\circ$ , para soluções aquosas dos anfifílicos (a) 0,5 mg/mL  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e (b) 0,5 mg/L  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7), em água a  $25^\circ\text{C}$ . As inserções na Figura 47 mostram a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$  indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas.

As inserções na Figura 47, mostram os coeficientes de difusão dos modos rápido e lento obtidos dos movimentos aleatórios (brownianos) das moléculas e os valores da frequência angular são linearmente dependentes de  $q^2$  evidenciando um comportamento difusivo típico de partículas esféricas.

A Figura 48 resume os valores obtidos para  $2R_H$  em função da concentração dos anfifílicos dissolvidos em água  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7). Observa-se que o tamanho das micelas é independente da concentração em ambos os casos, comportamento análogo aos anfifílicos  $\text{C}_{18}\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (16) e  $\text{C}_{18}\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (17), mesmo apresentando diferentes partes hidrofóbicas. Logo, isso reforça que o processo auto-associativo para os anfifílicos é puramente hidrofóbico, dependendo principalmente do balanço hidrofóbico e hidrofílico que compõe cada anfifílico.



**Figura 48.** Diâmetro hidrodinâmico ( $2R_H$ ) em função da concentração dos anfifílicos  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) (○) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) (●), medido em água a 25 °C.



**Figura 49.** Imagens obtidas por MET das auto-associações dos anfifílicos (a)  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e (b)  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) em água. As estruturas foram visualizadas após a coloração negativa. Barra de escala é de 50 nm.

As imagens de MET (Figura 49 (a) e (b)) mostram as morfologias formadas a partir dos anfifílicos  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) em soluções aquosas. Para ambos anfifílicos torna-se evidente a formação de nano-estruturas esféricas monodispersas de 10 nm. As imagens de MET foram utilizadas a fim de corroborar com os resultados obtidos por DLS e SAXS, demonstrando que ambas as técnicas confirmam o processo associativo dos anfifílicos em nanopartículas esféricas.

Por fim, a Tabela 8, apresenta um resumo do tamanho e da morfologia obtida para os anfifílicos constituídos da parte hidrofóbica de anéis poliaromáticos.

**Tabela 8.** Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula, morfologia dos anfifílicos  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$ ,  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$ .

Anfifílicos	$\phi$	$2R_H$	Morfologia
$4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$	0,29	10,3	esférica
$4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$	0,24	10,0	esférica
$4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$	0,23	10,0	esférica

### 7.9 Nanopartículas formadas pelos anfifílicos $4\phi\text{PEG}_{600}\text{N}_3$ e $4\phi\text{PEG}_{600}\text{GLcNAc}$

Com o propósito de proporcionar novas oportunidades de investigações, modificações nas características dos materiais foram realizados. As alterações foram feitas no balanço hidrofílico e hidrofóbico, com o intuito de observar a transição de uma morfologia para outra. Esta alteração foi realizada mantendo a mesma parte hidrofóbica dos anfifílicos (ver esquema 2), mudando o tamanho do polímero PEO, as mudanças foram realizadas com sucesso, obtendo-se moléculas originais, como descritas e caracterizadas no Capítulo 6.

A mudança acarretou em um aumento na fração volume hidrofóbica dos anfifílicos  $4\phi\text{PEG}_{600}\text{N}_3$  (12) e  $4\phi\text{PEG}_{600}\text{GLcNAc}$  (13), ver Tabela 9.

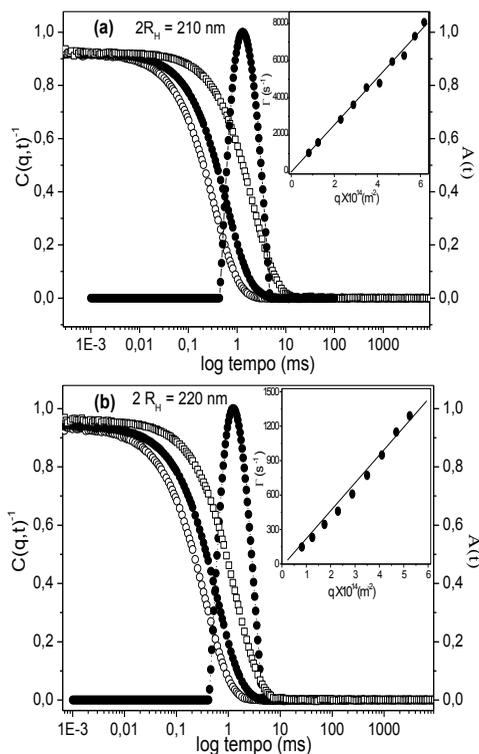
Os experimentos de DLS mostram que a redução na fração hidrofílica dos anfifílicos levou a uma mudança na morfologia. Os anfifílicos constituídos de  $\text{PEO}_{600}$  auto-associaram em água em nanopartículas vesiculares com  $2R_H \sim 215$  nm.

O anfifílico  $\text{PEG}_{600}$  também foi investigado por espalhamento de luz estático (SLS), com medições variando o ângulo de espalhamento

( $\theta$ ) 30-150° com 15° de espaçamentos entre os aumentos, uma vez que para partículas grandes ( $R_g > \lambda/20$ ) a dependência angular da luz espalhada é relacionado ao fator de forma de partículas  $P(q)$  e, finalmente, para  $qR_g < 1$  o fator de forma é dada por:

$$P(q) = \frac{I(q)}{I(0)} \sim 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3}$$

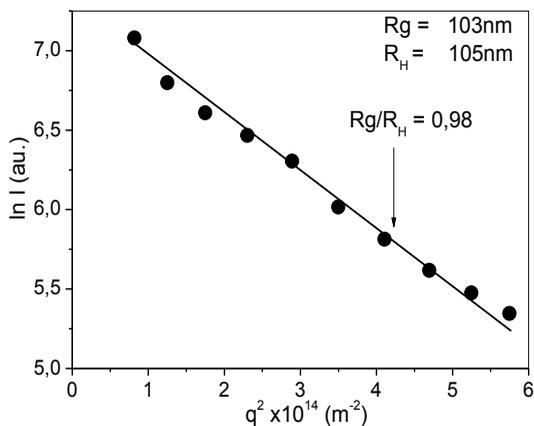
Portanto, pode-se usar a aproximação Guinier (eq. 4), para extrair o raio de giro dos objetos de dispersão.



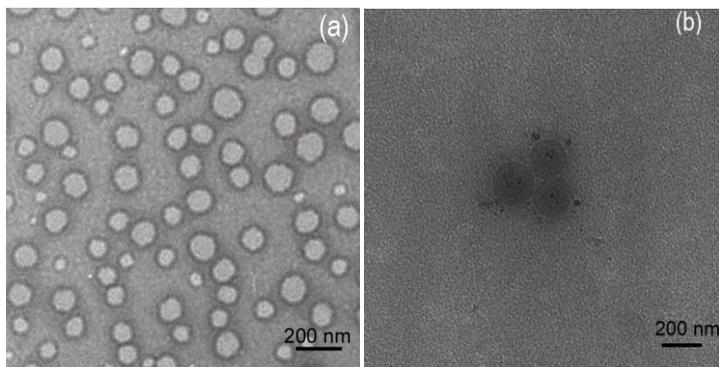
**Figura 50.** Funções de autocorrelação  $C(q,t)$  obtidas nos ângulos 50 (○), 90 (●) e 130° (□), e a respectiva distribuição de tempo de relaxação  $A(t)$  a 90°, para soluções aquosas dos anfifílicos (a) 0,4 mg/mL 4 $\phi$ PEO<sub>600</sub>N<sub>3</sub> (12) e (b) 0,5 mg/mL 4 $\phi$ PEO<sub>600</sub>GlcNAc (13) a 25 °C. As inserções na Figura 50 mostram a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$  indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas.

A Figura 51, ilustra o gráfico de Guinier ( $\ln I$  vs  $q^2$ ) obtido a partir dos resultados das funções de correlação temporal obtidas nos ângulos 30 a 150° e as respectivas distribuições dos tempos de relaxação  $A(t)$ , para solução aquosa dos anfifílicos 0,4 mg/mL  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12). Observa-se que não houve desvio no gráfico, indicando nesse caso, a ausência de agregados. O raio hidrodinâmico para o anfifílico  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) foi calculado aplicando-se a relação de Stokes-Einstein, definido aqui pela equação 3 como 105 nm. O valor  $R_g$  para as nanopartículas do anfifílico  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  foi de 103 nm e foi obtido da inclinação do gráfico de Guinier através da equação 4.

O valor obtido da razão do parâmetro sensível à forma  $\rho = R_g/R_H$  foi de 0,98 bem próximo ao valor teórico para uma partícula vesicular, ver Tabela 2. O resultado é superior aos encontrados para as micelas dos anfifílicos  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (15),  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{GlcNAc}$  (16),  $\text{C}_{18}\text{PEO}_{900}\text{Lac}$  (17),  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) que mantêm-se entre 0,80 e 0,90 os quais são favoráveis com a formação de estruturas esféricas.<sup>5</sup>



**Figura 51.** Análise de Guinier dos resultados obtidos do anfifílico  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  da Figura 50 (a).



**Figura 52.** Imagens obtidas por MET das auto-associações dos anfífilicos (a)  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) e (b)  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GlcNAc}$  (13) em água. As estruturas foram visualizadas após a coloração negativa.

As imagens obtidas por MET, Figura 52, ilustram as auto-associações dos anfífilicos  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GlcNAc}$  (13) em água em nanopartículas vesiculares corroborando com os resultados de DLS e estando de acordo com os resultados dos anfífilicos sintetizados e caracterizados por Lee e colaboradores.<sup>33</sup>

Com a alteração no tamanho do polímero PEO foi possível mudar a morfologia das nanopartículas esféricas (10 nm) para vesículas com tamanho aproximado de 200 nm. A morfologia, o tamanho e a estrutura das nanopartículas é dependente principalmente do equilíbrio de forças de atração e repulsão entre os diferentes blocos que compõem os anfífilicos e também da metodologia de preparação.

As micelas esféricas encontradas para os anfífilicos  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) são compatíveis com a fração volumétrica da região hidrofóbica ( $\phi$ ) < 1/3.<sup>34, 206, 207</sup> De fato, a fração hidrofóbica calculada para os anfífilicos  $4\phi\text{PEO}_{900}\text{N}_3$  (5),  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GLcNAc}$  (6) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) com base na densidade de cada constituinte foi igual a 0,29, 0,24 e 0,23, respectivamente, assim micelas esféricas são esperadas enquanto que a diminuição da parte hidrofílica para os anfífilicos  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  (12) e  $4\phi\text{PEG}_{600}\text{GlcNAc}$  (13) acarretou um aumento da fração volume hidrofóbico para 0,38 e 0,31. A Tabela 9 apresenta os resultados dos anfífilicos (12) e (13).<sup>34, 159, 207</sup>

Tornou-se evidente que um controle sobre cada constituinte que compõem o anfífilico é de extrema importância, pois pode determinar a mudança de uma estrutura para outra sem fazer uso de outras metodologias de preparo na qual são usados solventes orgânicos.

O mais interessante que antes da funcionalização os anfifílicos auto-organizam em estruturas que deixam expostos os grupos azidas nas extremidades facilitando a funcionalização das nanopartículas por diferentes moléculas bioativas solúveis em solução aquosa, aumentando o rendimento da reação de acoplamento.

É importante salientar que a funcionalização por pequenas unidades de carboidratos, que não alteram significativamente o volume hidrofílico, não serão observadas mudanças no tamanho e na morfologia das nanopartículas, como investigados para os anfifílicos  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GlcNAc}$

**Tabela 9.** Valores de fração volume hidrofóbico ( $\phi$ ), diâmetro da nanopartícula e morfologia dos anfifílicos  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$  e  $4\phi\text{PEO}_{600}\text{GlcNAc}$ .

<b>Anfifílicos</b>	<b><math>\phi</math></b>	<b><math>2R_H</math></b>	<b><i>Morfologia</i></b>
$4\phi\text{PEO}_{600}\text{N}_3$	0,38	210,0	vesicular
$4\phi\text{PEG}_{600}\text{GlcNAc}$	0,31	220,0	vesicular



## CAPÍTULO 8

### ESTRUTURA INTERNA DAS MICELAS FORMADAS POR NOVOS ANFIFÍLICOS TIPO ROD-COIL ACESSADA POR SAXS

O intuito da utilização dos experimentos de SAXS foi delinear e propor uma estrutura interna das micelas dos anfifílicos 4 $\phi$ PEO<sub>900</sub>GlcNAc (6), 4 $\phi$ PEGO<sub>900</sub>Lac (7), C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc (16) e C<sub>18</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (17), C<sub>10</sub>PEO<sub>900</sub>GlcNAc (22) e C<sub>10</sub>PEO<sub>900</sub>Lac (23), tipo rod-coil sintetizados e descritos no Capítulo 6 e corroborar com resultados de DLS e MET (Capítulo 7).

Na literatura explora-se os experimentos de SAXS devido a facilidade em acessar dimensões como o tamanho do núcleo micelar dos anfifílicos e para a determinação e exploração da conformação das cadeias poliméricas formadoras da coroa micelar. Com isso é cada vez mais comum o surgimento de modelos para interpretar e dar uma correta dimensão e conformação das micelas formadas por copolímeros em bloco, anfifílicos do tipo rod-coil.

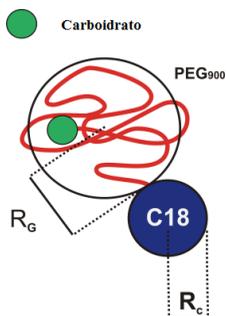
A caracterização da estrutura interna de micelas por intermédio de medidas de SAXS é viável, sendo no entanto necessário trabalhar com sistemas bastante diluídos. Com essas condições, pode-se considerar  $S(q) \sim 1$  e as contribuições de espalhamento são dominadas pelo fator forma da partícula, associado com o tamanho e forma da partícula espalhante.

Os experimentos de SAXS, devido à baixa intensidade de espalhamento, necessitam do uso de maiores concentrações dos anfifílicos para se obter curvas com uma relação razoável sinal-ruído. No entanto, foi verificado que para todas as amostras estudadas nesta tese, o valor de  $R_H$  das micelas formadas é basicamente independente da concentração dos anfifílicos presente até aproximadamente 40 mg/mL.

#### 8.1 Medidas de SAXS

Com a finalidade de complementar os resultados de DLS, TEM e de caracterizar a estrutura interna de partículas isoladas, as concentrações de polímero utilizadas foram as maiores possíveis, nas quais se constatou que não houve interferência de  $S(q)$ , até a concentração máxima de 45 mg/mL. Maiores detalhes sobre a técnica e preparação das amostras, foram descritos nos Capítulos 4 e 5 (itens 4.4 e 5.5).

Primeiramente serão mostrados e discutidos os resultados de SAXS e a caracterização da estrutura interna para os anfifílicos  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) e  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17),  $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$  (22) e  $C_{10}PEO_{900}Lac$  (23). Posteriormente os resultados para os anfifílicos  $\phi PEO_{900}GlcNAc$  (6) e  $4\phi PEO_{900}Lac$  (7) foram monitorados na concentração massa/volume de 40 mg/mL. Esta concentração foi selecionada visto que proporcionou uma boa relação sinal-ruído, não apresentou mudanças na estrutura micelar e os resultados puderam ser ajustados utilizando-se modelos teóricos, propostos por Pedersen e Gerstenberg para micelas que apresentam núcleos com diferentes geometrias.<sup>166, 208</sup> A Figura 53 ilustra esquematicamente o modelo mais simples desta série na qual faz referência as micelas com núcleo esférico e cadeias Gaussianas ancoradas ao núcleo.



**Figura 53.** Representação gráfica da interpretação do fator forma micelar de acordo com o modelo para micelas que apresentam um núcleo esférico. O modelo considera um núcleo denso de raio  $R_c$  e cadeias Gaussianas com raio de giro  $R_G$  (cadeia) fixadas ao núcleo.<sup>3</sup>

A intensidade de espalhamento de  $I(q)$  de uma solução isotrópica de partículas altamente regulares incorporadas em uma matriz com uma densidade de elétrons constante, e após a normalização das relações com a dispersão de fundo do solvente, é dada por:

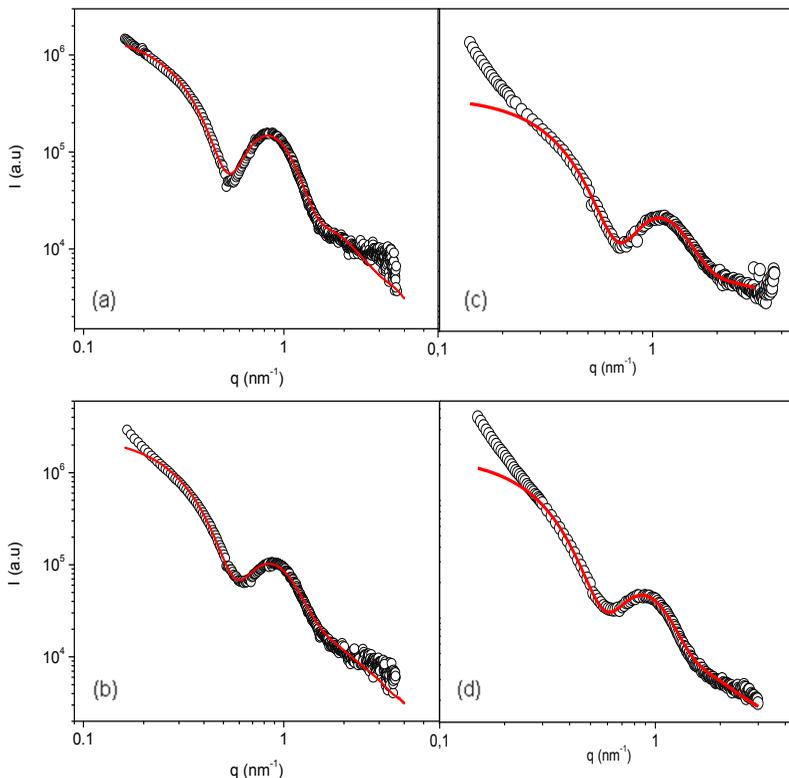
$$I(q) = NP(q)S(q) \quad (17)$$

Onde  $N$  é o número de partículas de espalhamento por unidade de volume,  $P(q)$  é o fator de forma de uma partícula individual, e  $S(q)$  é o fator de estrutura decorrente das correlações de longo alcance entre os

centros de dispersão. Para sistemas diluídos,  $S(q) \sim 1$ , e  $(q)$  é, portanto, proporcional ao fator de forma  $P(q)$ , que reflete o tamanho e a forma dos objetos de dispersão.<sup>3,209, 210</sup>

A Figura 54 mostra os perfis de SAXS das amostras  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) (a),  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) (b),  $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$  (22) (c) e  $C_{10}PEO_{900}Lac$  (23) (d), dissolvidos em água a 25°C com concentração igual a 40 mg/mL. A linha sólida vermelha ilustra o melhor ajuste utilizando-se o modelo teórico de Pedersen e Gerstenberg.<sup>166</sup> Essa faixa de concentração dos anfífilicos apresentou uma relação sinal-ruído razoável e a presença de agregados é sugerida pela elevada intensidade de espalhamento de raios-X a baixos ângulos ( $I(q) \rightarrow 0$ ).<sup>3</sup> Na região de altos ângulos ( $I(q) > 1,5 \text{ nm}^{-1}$ ) o perfil das auto associações das nanopartículas é dominado pelo espalhamento proveniente da estrutura interna das cadeias poliméricas dissolvidas na coroa conhecida como *blob scattering*.<sup>3</sup> Isto é devido à contribuição proveniente do espalhamento das cadeias de PEO dissolvidos na corona micelar que domina o perfil de espalhamento de raios-X na região de altos  $q$ , que é idealmente ditada pela função de Debye e, portanto, tem uma dependência de  $q^2$  dependendo da conformação das cadeias flexíveis do PEO.<sup>3</sup>

Observa-se claramente na Figura 54 as oscilações de alta amplitude do fator de forma que só pode ser observado no caso das partículas bem definidas, com uma distribuição de tamanho estreito. Os perfis de SAXS podem ser ajustados de forma satisfatória usando apenas o modelo para micelas de copolímeros em bloco com núcleo esférico proposto por Pedersen e Gerstenberg, descrito pelas equações em material suplementar anexo.<sup>3, 166</sup>



**Figura 54.** Perfis de SAXS para as amostras  $C_{18}PEO_{900}GlcNAc$  (16) (a),  $C_{18}PEO_{900}Lac$  (17) (b),  $C_{10}PEO_{900}GlcNAc$  (22) (c) e  $C_{10}PEO_{900}Lac$  (23) (d), dissolvidos em água a  $25^{\circ}C$  com concentração igual a 40 mg/mL. A linha sólida vermelha ilustra o melhor ajuste obtido para os pontos experimentais usando-se o modelo para micelas de anfífilicos que contém um núcleo esférico.

O modelo descreve a dispersão das micelas compostas por um núcleo esférico homogêneo, com um raio ( $R_c$ ) e cadeias Gaussianas com raio de giro  $R_G$  (cadeia) ancoradas ao núcleo. No entanto, o modelo apresenta um número grande de parâmetros ajustáveis:  $R_G$ ,  $R_c$ ,  $N_{agg}$  (número de agregação),  $d$  (explicado abaixo) e o excesso de comprimento de espalhamento do bloco formador do núcleo  $\beta_{núcleo}$  e da coroa  $\beta_{coroa}$  com relação ao solvente. Em consequência, normalmente não é possível obter um único conjunto de parâmetros ao final de um

processo de ajuste se os excessos de comprimento de espalhamento não forem fixados, portanto, o processo de ajuste pode conduzir a resultados duvidosos. Assim, durante os procedimentos de montagem da cadeia os parâmetros  $\beta$  ( $7,30 \times 10^{-12}$  cm) e  $d$  foram mantidos fixos para todos os anfifílicos.

O parâmetro  $d = 1$  imita a não penetração das cadeias coroa no núcleo. Portanto, o ponto de partida das cadeias de Gauss é deslocada para um valor de  $R' \sim Rc + R_G$  de distância do centro da partícula.

O valor da cadeia de  $\beta$  PEO<sub>900</sub> foi calculado pela equação 18:

$$\beta_{cadeia} = NV_{PEO} (\sigma_{PEO} - \sigma_{solvente}) \quad (18)$$

onde  $N$  é o grau de polimerização do segmento de polímeros ( $N = 20$ ),  $v_{PEO}$  é o volume de uma unidade do monômero do PEO,  $\sigma_{PEO}$  é a densidade de comprimento de espalhamento do segmento de polímeros e  $\sigma_{solvente}$  é a densidade de comprimento de espalhamento do solvente.

O volume ocupado por um único monômero de  $V_{PEO}$  foi determinado considerando a densidade do homopolímero ( $d_{PEO}$ ) e os valores das densidades de comprimento de espalhamento. A unidade do solvente e de monômero foi calculada utilizando a composição química de cada componente e suas respectivas densidades ( $d_x$ ) de acordo com a equação:

$$\sigma_x = \frac{b_e d_x N_A}{M_x} \sum_i n_i z_i \quad (19)$$

onde  $x$  representa H<sub>2</sub>O ou PEO,  $N_A$  é o número de Avogadro, e  $M_x$  é a massa molar de cada componente,  $n_i$  é o número de átomos  $i$ , em cada componente com número atômico  $z_i$ , e  $b_e$  é o comprimento de espalhamento de Thomson, que é o comprimento de espalhamento de um elétron ( $b_e = 2,817 \times 10^{-13}$  cm). Todos estes parâmetros mencionados foram calculados e estão listados na Tabela 10. (Para outras informações ver nos anexos).

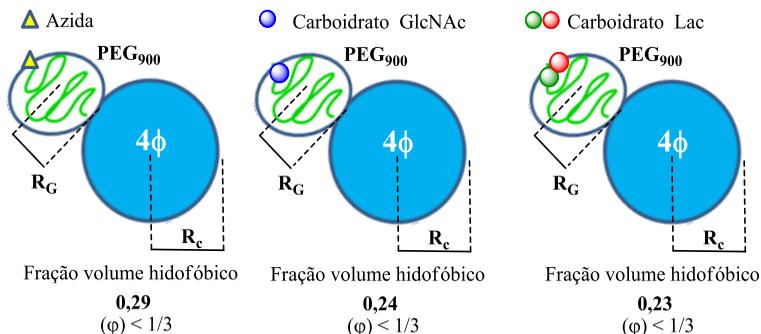
**Tabela 10.** Parâmetros usados para determinação  $\beta_{cadeia}$ .

	$d^a$ (g/cm <sup>3</sup> )	$V$ (10 <sup>-23</sup> cm <sup>3</sup> )	$M$ (g/mol)	composição química	$\sum n_i z_i$	$\beta$ (10 <sup>10</sup> cm <sup>-2</sup> )
PEG	1,08	6,76	44,0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	24	9,99
H <sub>2</sub> O	1,00	2,99	18,0	H <sub>2</sub> O	10	9,42

<sup>a</sup> valores retirados da referência.

Mantendo-se fixas estas duas variáveis, o processo de ajuste gera quatro parâmetros que foram, portanto,  $N_{agg}$ ,  $R_c$ ,  $R_G$ , núcleo  $\beta$ . Na Figura 55, as linhas sólidas vermelhas correspondem ao melhor encaixe obtido usando o modelo esférico de Pedersen e Gerstenberg.<sup>166</sup> A alta qualidade dos ajustes podem ser diretamente observada e é ainda atestada por valores de  $\chi^2$  sempre inferiores a 2,5, reforçando que tal modelo pode reproduzir corretamente a curva experimental em toda sua amplitude. As propriedades físico-químicas de espalhamento dos nano-objetos determinados por medidas de SAXS são apresentadas na Tabela 11.

Para os anfífilos constituídos da parte hidrofóbica de poliaromáticos o modelo proposto por Pedersen e Gerstenberg de micela esférica pode ser ajustado satisfatoriamente. A Figura 55, mostra um esquema gráfico para ilustrar a interpretação do fator de forma micelar de acordo com o modelo para micelas que apresentam um núcleo esférico e também a fração volume hidrofóbico de cada anfílico, ( $\phi$ ) < 1/3.

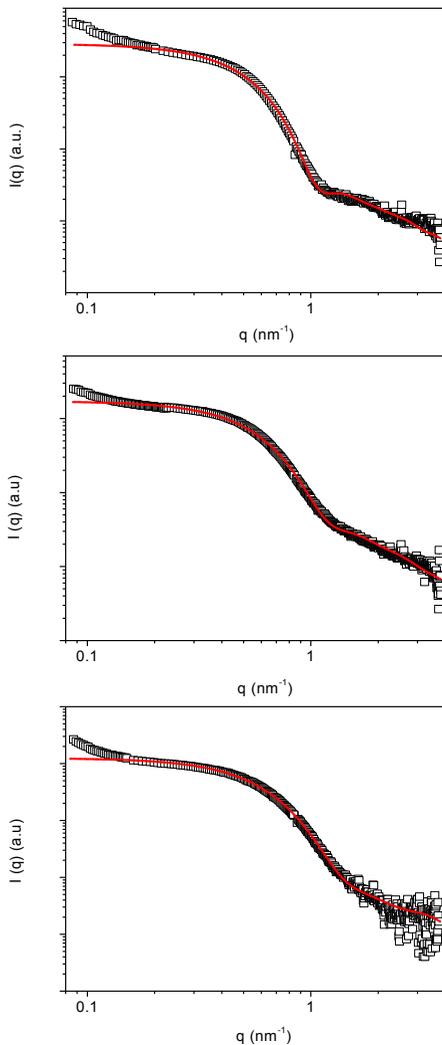


**Figura 55.** Esquema para interpretação do fator forma micelar de acordo com o modelo para micelas que apresentam um núcleo esférico. O modelo considera um núcleo denso de raio  $R_c$  e cadeias Gaussianas com raio de giro  $R_G$  (cadeia) fixadas ao núcleo.

A Figura 56 ilustra os perfis de SAXS para os anfifílicos 4 $\phi$ PEG<sub>900</sub>GlcNAc (6), 4 $\phi$ PEG<sub>900</sub>Lac (7) e 4 $\phi$ PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub> (5), dissolvidos em água a 25°C com concentração igual a 40 mg/mL. A faixa de concentração dos anfifílicos apresentou uma relação sinal-ruído razoável e a presença de agregados é sugerida pela intensidade de espalhamento de raios-X a baixos ângulos ( $I(q) \rightarrow 0$ ).

Mantendo-se fixas as variáveis  $d$  e o excesso de comprimento de espalhamento do bloco formador do núcleo  $\beta_{\text{núcleo}}$  e da coroa  $\beta_{\text{coroa}}$  com relação ao solvente, o processo de ajuste gera os parâmetros  $N_{\text{agg}}$ ,  $R_c$ ,  $R_G$  e  $\beta$ . Detalhes sobre as equações e parâmetros usados para a determinação de  $\beta$  e modelo segue em anexo. Na Figura 57, as linhas sólidas vermelhas correspondem ao melhor ajuste utilizando o modelo de micelas de copolímero em bloco com núcleo esférico proposto por Pedersen e Gerstenberg.<sup>166</sup> A alta qualidade dos ajustes podem ser directamente observada e é ainda atestada por valores de  $\chi^2$  sempre inferiores a 1,7, reforçando que tal modelo pode reproduzir corretamente toda a curva experimental.

A modelagem para os anfifílicos foi realizada não levando em conta o grau da dispersibilidade das micelas, embora a presença desse efeito seja esperado, devido à natureza de equilíbrio do sistema. O fato é que poderíamos obter um encaixe satisfatório sem incluir o índice de dispersibilidade, atestando que tal parâmetro é razoavelmente baixo, como demonstrado pelos resultados anteriores de DLS e MET. Além disso, nas Figuras 54 e 56, observamos que em alguns casos, a região de baixos valores de  $q$  não estava equipado com o mesmo grau de precisão, o que está associado a presença de um pequeno número de agregados, com estrutura flexível, como já evidenciado pelos experimentos DLS. Os parâmetros extraídos dos ajustes dos perfis de SAXS das Figuras 55 e 57 são apresentados na Tabela 11.



**Figura 56.** Perfis de de SAXS para as  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (6) (superior);  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) (meio) e  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{N}_3$  (5) (parte inferior), dissolvidos em água a 25 °C com concentração igual a 40 mg/mL. A linha sólida vermelha ilustra o melhor ajuste obtido para os pontos experimentais usando-se o modelo para micelas de anfífilicos que contém um núcleo esférico.

**Tabela 11.** Propriedades físico-químicas de espalhamento dos nano-objetos determinados por medidas de SAXS, usando o modelo de Pedersen e Gerstenberg de micelas que apresentam um núcleo esférico para diferentes amostras.<sup>3, 166, 208</sup>

Anfífilicos	$R_C$ (nm)	$R_G$ (nm)	$L^a$ (nm)	$R_{mic}^b$ (nm)	$N_{agg}$	$\beta_{nucleo}$ ( $10^{-12}cm$ )	$A_c$ ( $nm^2$ )
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> N <sub>3</sub>	1,9	1,2	2,4	4,3	59	2,6	0,8
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> GlcNAc	2,5	0,9	1,8	4,3	41	2,6	1,9
4 $\phi$ PEO <sub>900</sub> Lac	2,1	1,0	2,0	4,1	30	2,6	1,8
C <sub>18</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc	2,7	1,6	3,2	5,9	41	-1,8	2,2
C <sub>18</sub> PEG <sub>900</sub> Lac	2,3	2,0	4,0	6,3	34	-1,1	1,9
C <sub>12</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc	2,2	2,3	4,6	6,8	14	-1,0	5,0
C <sub>12</sub> PEG <sub>900</sub> Lac	2,4	1,8	3,6	6,0	16	-1,2	4,5
C <sub>10</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc	1,8	1,6	3,2	5,0	28	-1,4	1,4
C <sub>10</sub> PEG <sub>900</sub> Lac	2,1	1,7	3,4	5,5	21	-1,1	2,6

<sup>a</sup> $L = 2R_G$  espessura da coroa micelar.

<sup>b</sup> $R_{mic} = R_C + L$

$$A_c = \frac{4\pi R_c^2}{N_{agg}}$$

Através dos perfis de SAXS, Figuras 54 e 56, das propriedades físico-químicas de espalhamento dos nano-objetos listados na Tabela 11 e dos resultados de DLS e MET, podemos afirmar que os anfífilicos compostos do PEO<sub>900</sub>, constituídos de diferentes partes hidrofóbicas se comportaram de forma semelhante e os mesmos puderam ser ajustados satisfatoriamente pelo modelo teórico proposto por Pedersen e Gerstenberg.<sup>166</sup>

Com referência aos anfífilicos compostos de diferentes ácidos carboxílicos, observamos que a maioria comporta-se de forma semelhante com o decréscimo de  $R_C$  ocorre um equilíbrio ocasionado pelo aumento de  $R_G$

As dimensões micelares ( $R_{cmicelar}$ ) dos anfífilicos C<sub>10</sub> ao C<sub>18</sub> foram calculadas através de  $R_C + 2R_G$  obtendo-se valores entre (5,0 a 6,8 nm), o que combina razoavelmente com os valores  $R_H$  extraídos dos experimentos de DLS.

A dimensão micelar calculada por  $R_C + 2R_G$  para os anfífilicos aromáticos, está situada numa faixa entre 4,1 a 4,3 nm. Deve-se ter em mente que para objetos esféricos densos o parâmetro sensível à forma ( $\rho = R_G/R_H$ ) é teoricamente igual a 0,774. Portanto, o tamanho do  $R_{mic}$  monitorado através dos perfis de SAXS tem que ser um pouco menor do  $R_H$  monitorado por DLS ( $R_H \sim 5$  nm).



## CAPÍTULO 9

### INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DAS NANOPARTÍCULAS COM AS LECTINAS WGA E PNA

Atualmente, existem diferentes técnicas experimentais que permitem avaliar as interações das lectinas com os carboidratos. Algumas avaliam a capacidade das lectinas inibir as ligações cruzadas ou agregação dos carboidratos, outras medem a afinidade ou especificidade das forças de interação dessas lectinas.<sup>97, 211</sup>

Dentre as técnicas de uso mais corrente, podemos apontar o teste de inibição hemaglutinação (HIA, Hemagglutination Inhibition Assay), microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC, Isothermal Titration Microcalorimetry) cristalografia de proteínas de raios-X que permitem a investigação estrutural de lectinas.<sup>117, 211, 212</sup>

#### 9.1 Ensaios de Inibição da Hemaglutinação (HIA)

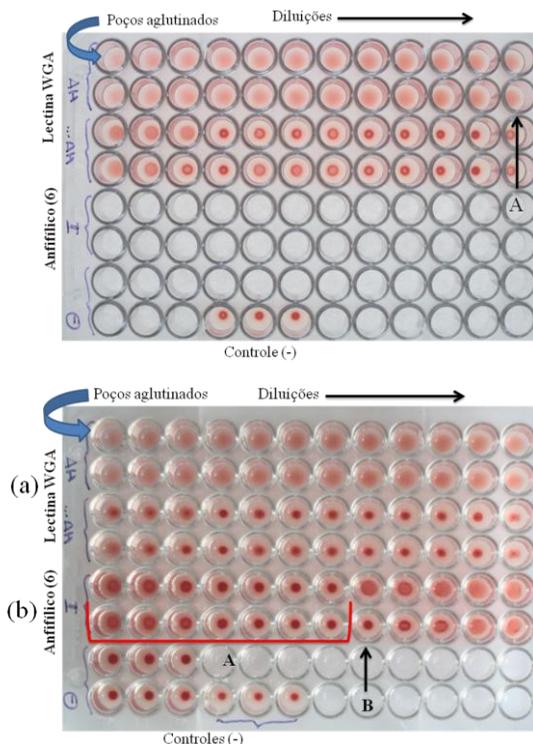
Antes de iniciar os testes de interações específicas das nanopartículas com as lectinas WGA e PNA através das técnicas DLS foram realizados ensaios de hemaglutinação. Os ensaios de atividade hemaglutinante é o teste simples e amplamente utilizado para a detecção e caracterização das lectinas.<sup>213</sup> É baseado na propriedade destas lectinas se ligarem a glicoconjugados na superfície das hemácias. O teste está fundamentado na observação de aglutinação (ou agregação) por lectinas visíveis a olho nu, que formaram uma fase gelatinosa e a determinação do ponto de equivalência, é a concentração mínima de lectina mostrando uma aglutinação evidente.

As hemácias mais utilizadas são de mamíferos (humanos, porco, coelho, cordeiros, etc...). A atividade hemaglutinante de lectinas WGA e PNA foram realizadas em microplacas, sendo que maiores detalhes sobre preparação das amostras e o ensaio de atividade, foram descritos no Capítulo 5 (seção 5.6).

Na presença de um ligante solúvel, hemaglutinação pode ser completamente inibida, determinando dessa forma a concentração do ligante que impede hemaglutinação o potencial inibição do ligante. Isso geralmente é dependente de variáveis como a idade e a origem dos eritrócitos.

A Figura 57 (a), ilustra o ensaio da hemaglutinação na presença da lectina WGA em consecutivas diluições o teste avaliou o potencial de hemaglutinação da lectina WGA determinado foi  $4096 \text{ UH mL}^{-1}$  e

esse valor pode variar um pouco dependendo das variáveis como a idade e a origem dos eritrócitos. O mesmo procedimento foi efetuado para determinar o potencial de hemaglutinação da PNA cujo o valor de  $1024 \text{ UH mL}^{-1}$  foi inferior ao encontrado para WGA.



**Figura 57.** (a) Teste de Hemaglutinação em presença da lectina WGA 1,0 mg/mL e (b) 0,5 mg/mL  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  em solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ) sobre uma microplaca de titulação.

Observa-se na Figura 57 (b), que a lectina WGA mostra primeiramente afinidade pelo carboidrato que esta recobrando a superfície da nanopartícula não mostrando afinidade pelo sangue do coelho. O qual pode ser comprovado pelo controle negativo, só a partir do oitavo poço indicado pela seta B a lectina começou mostrar afinidade aos glicoconjugados das hemácias do sangue. O ensaio permitiu visualizar e confirmar afinidade da lectina específica WGA pelos

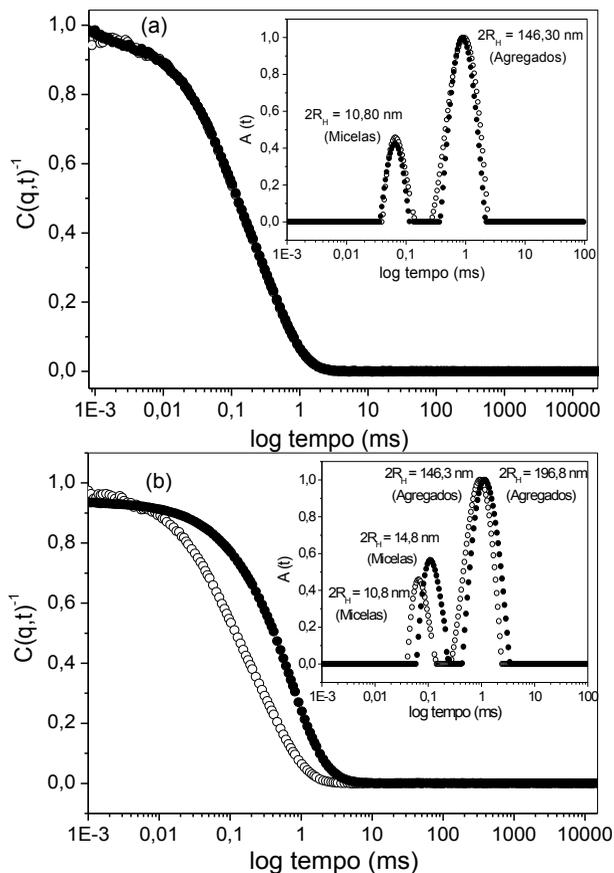
epitopos que estão recobrando a nanopartícula. Somente em soluções bem diluídas das nanopartículas pode-se assim ver a hemaglutinação.

A partir desse teste foi possível determinar uma boa faixa de concentração para acompanhar os estudos de interações específicas das nanopartículas com as lectinas WGA e PNA acessadas por DLS.

## **9.2 Interações das nanopartículas com as lectinas WGA e PNA acessadas por DLS formadas a partir dos anfífilos $C_{18}PEG_{900}GlcNAc$ e $C_{18}PEG_{900}Lac$**

A Figura 58, mostra a função de correlação temporal adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfílico  $C_{18}PEG_{900}Lac$  (17), na presença e ausência de lectinas específicas.

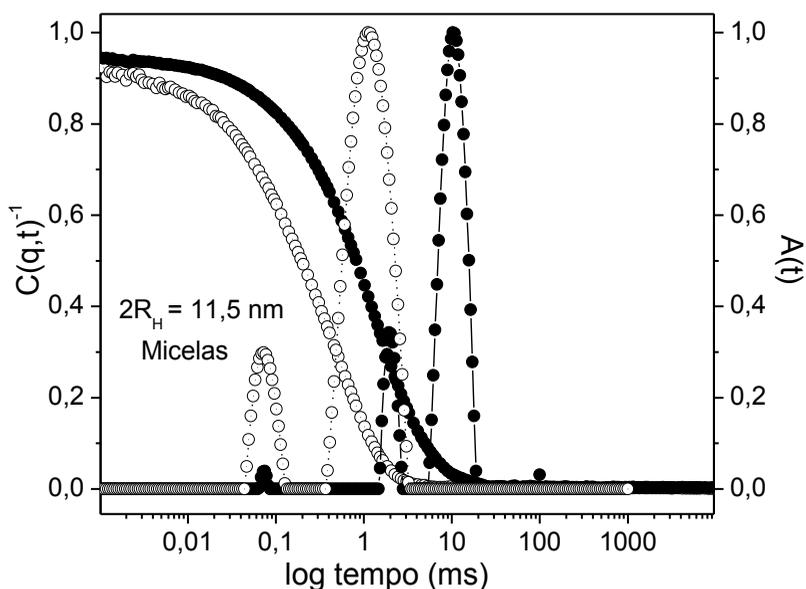
Observa-se na Figura 58 (a), que a adição da lectina WGA, que não tem afinidade com a lactose, não perturbou o sistema, mantendo a mesma curva de autocorrelação, bem como a distribuição dos tempos de relaxação. No entanto, como mostrado na Figura 58 (b), em pequenas adições da lectina PNA, ocorre uma alteração significativa da curva de autocorrelação, bem como a distribuição dos tempos de relaxação. Este fato está associado com uma forte interação das nanopartículas recobertas por epitopos de lactose com a lectina específica PNA aumentando significativamente o raio hidrodinâmico micelar  $R_H$  de 10,8 para 14,8 nm. Este efeito evidencia claramente a interação específica da proteína com unidades de lactose que estão recobrando a superfície da nanopartícula, demonstrando que experimentos de DLS podem tornar-se uma ferramenta importantíssima para o estudo de nanopartículas funcionalizadas por carboidratos com lectinas.



**Figura 58.** Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{18}PEG_{900}Lac$  (17) em solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, contendo 150 mM NaCl, 1mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$ ) a  $37^\circ C$ , na ausência ( $\circ$ ) e na presença de proteína ( $\bullet$ ), (a) WGA (6  $\mu L$ , 1,0 mg/mL) e (b) PNA (4  $\mu L$ , 1,0 mg/mL).

A Figura 59, mostra a função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para o anfifílico  $C_{18}PEG_{900}GlcNAc$  (16). Na ausência da lectina o anfifílico auto-associa em nanopartículas com diâmetro ( $2R_H = 11,5$  nm) valor um pouco superior ao encontrado na seção 7.5, pelo fato

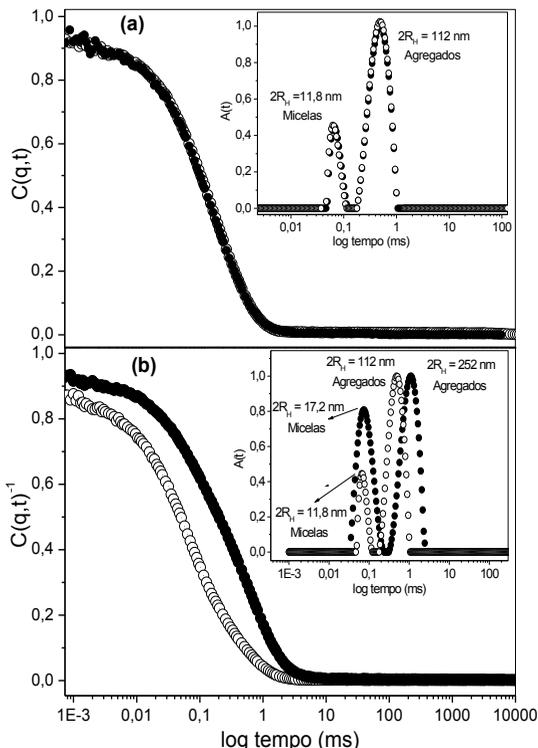
das partículas serem formadas em solução tampão salino PBS. Após adição de uma pequena quantidade da lectina WGA que apresenta afinidade por resíduos GlcNAc, houve uma alteração significativa na função de correlação temporal demonstrando uma forte interação entre WGA com o carboidrato GlcNAc que esta recobrendo as nanopartículas. Os resultados de DLS mesmo em baixas quantidades de WGA, mostraram grandes alterações nos tempos de distribuição em comparação com quantidades maiores da lectina PNA citadas acima. Conclui-se, que a lectina WGA apresenta uma atividade hemaglutinante maior que a lectina PNA, fato que pode ser explicado pela presença de dois sítios de ligação por molécula de WGA.



**Figura 59.** Função de correlação  $C(q,t)$  adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $C_{18}PEG_{900}GlcNAc$  (16) em solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, contendo 150 mM NaCl, 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MnCl_2$ ) a 37 °C, na ausência ( $\circ$ ) e na presença ( $\bullet$ ) de proteína WGA (2  $\mu$ L, 1,0 mg/L).

### 9.3 Interações das nanopartículas formadas a partir dos anfifílicos $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$ e $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$ com as lectinas WGA e PNA acessadas por DLS

A Figura 60, mostra a função de correlação temporal adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7), na presença e ausência de lectinas específicas.



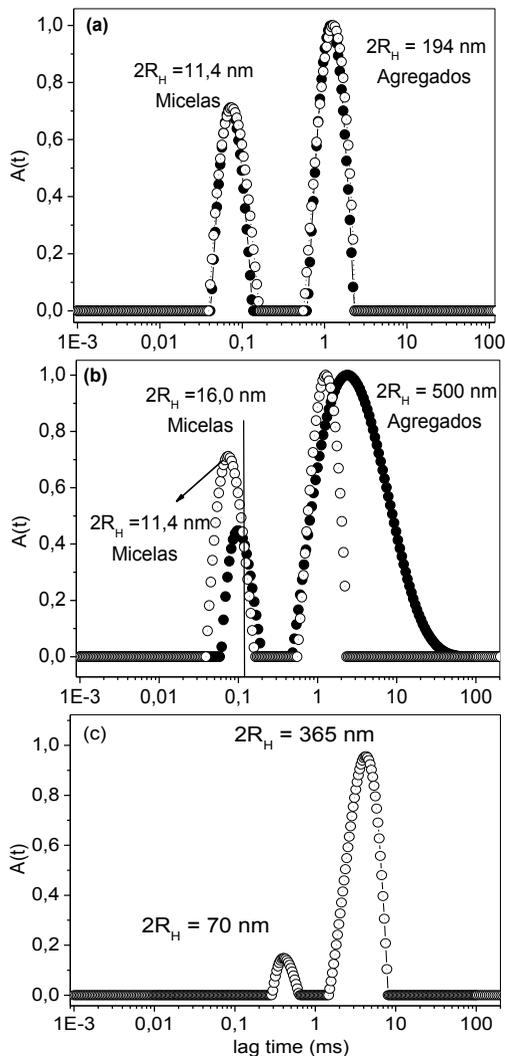
**Figura 60.** Função de correlação temporal adquirida no ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$  e a respectiva distribuição do tempo de relaxação  $A(t)$ , para uma solução de 0,5 mg/mL do anfifílico  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{Lac}$  (7) em solução tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,2, contendo 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ) a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência ( $\circ$ ) e na presença ( $\bullet$ ) de proteína (a) WGA (4  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/mL) e (b) PNA (4  $\mu\text{L}$ , 1,0 mg/mL).

Observa-se na Figura 60 (a), que adição da lectina WGA não perturbou o sistema mantendo uma boa curva de autocorrelação bem como os mesmos tempos de relaxação. Após adição da lectina PNA ocorreu uma forte perturbação nitidamente vista na função de correlação temporal e com consequência um aumento bastante significativo da nanopartícula de  $2R_H = 11,5$  nm para 17,2 nm e também um deslocamento na respectiva distribuição do tempo de relaxação dos agregados, demonstrando uma forte interação específica da proteína com unidades de lactose que estão na superfície das nanopartículas.

Por fim, a Figura 61, mostra as respectivas distribuições dos tempos de relaxação,  $A(t)$  a  $90^\circ$ , a partir das funções de autocorrelação  $C(q,t)$  para soluções de 1,0 mg/mL de  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (6) em solução tampão fosfato salino PBS na ausência e na presença das lectinas PNA e WGA.

A Figura 61, é dividida em três partes, a primeira parte mostra que as nanopartículas esféricas, revestidas com as unidades do carboidratos GlcNAc, ignoram em solução a adição da lectina PNA, mantendo a mesma distribuição dos tempos de relaxação,  $A(t)$ , não demonstrando afinidade pela lectina PNA. Enquanto a segunda parte da Figura 61 (b), mostra a interação das micelas esféricas com pequenas quantidades da lectina WGA, levando a mudanças na distribuição dos tempos de relaxação e reforçando a presença de interação específica entre a lectina e o carboidrato GlcNAc que recobre as nanopartículas.

A Figura 61 (c), mostra que apenas em grandes quantidades da lectina WGA, é possível detectar a distribuição dos tempos de relaxação, obtidos através da análise CONTIN por dois diâmetros distintos 70 e 365 nm. Este fato mostra que em pequenas adições da lectina WGA a diferença encontrada nos perfis de DLS é somente atribuída a forte interação da lectina com carboidratos, aumentando o tamanho e a quantidade de agregados em solução.



**Figura 61.** Respectivas distribuições dos tempos de relaxação,  $A(t)$  a  $90^\circ$ , a partir das funções de autocorrelação  $C(q,t)$  para soluções de  $1,0$  mg/mL de  $4\phi\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$  (6) em solução tampão fosfato salino (PBS,  $10\text{mM}$ ,  $\text{pH}$   $7,2$ , contendo  $150$  mM NaCl,  $1$  mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $1$  mM  $\text{MnCl}_2$ ) a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência (○) e na presença (●) de proteína, **(a)** PNA ( $4\ \mu\text{L}$ ,  $1,0$  mg/mL), **(b)** WGA ( $2\ \mu\text{L}$ ,  $1,0$  mg/mL) e **(c)** solução da lectina WGA em solução tampão (PBS,  $10$  mM,  $\text{pH}$   $7,2$ , contendo  $150$  mM NaCl,  $1$  mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $1$  mM  $\text{MnCl}_2$ ) a  $25^\circ\text{C}$ .

## CAPÍTULO 10

### CONCLUSÕES

A síntese e caracterização de anfífilos formados a partir de diferentes partes hidrofóbicas funcionalizados com o monossacarídeo GlcNAc e o dissacarídeo Lac e sua auto-associação em água foram relatadas pela primeira vez.

A estratégia sintética e as metodologias empregadas permitiram obter com sucesso novos anfífilos funcionalizados com hidratos de carbono através de reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre espécies funcionalizadas por um grupamento azida, de um lado, e um alcino terminal do outro.

Com as devidas purificações e caracterizações, foi possível obter moléculas próprias.

Ambos os glicoconjugados espontaneamente auto-associam em água em micelas esféricas de diâmetro médio de 10 nm e uma estreita polidispersão como evidenciado por DLS, SAXS e experiências MET. A capacidade das nanopartículas de interagir com lectinas através de ligações específicas foram investigadas por espalhamento de luz dinâmico, confirmando a possível aplicação de tais glicoconjugados, como sistemas de liberação de fármacos a sítios específicos.

Os anfífilos antes da funcionalização auto-organizam em estruturas que deixam expostos os grupos azidas na extremidades facilitando a funcionalização das nanopartículas por diferentes sacarídeos abrindo a possibilidade de segmentação por outros receptores.

Demonstramos que é de extrema importância o controle sobre cada constituinte que compõem o anfífilo, pois com mudanças na fração de volume hidrofóbico conseguimos mudar a morfologia das nanopartículas esféricas de 10 nm para vesículas com tamanho aproximado de 200 nm sem fazer uso da metodologia de preparação indireta das nanopartículas.

Os resultados apresentados na tese são promissores e investigações futuras estão previstas visando mudanças no balanço hidrofílico e hidrofóbico, com o intuito de obter diferentes morfologias para segmentação de variados receptores.

Existe ainda perspectiva da utilização e validação do potencial dessas nanopartículas no encapsulamento e liberação de fármacos e também a investigação dos processos associativos através da dissolução indireta seguida de diálise.



**CAPÍTULO 11****REFERÊNCIAS**

1. Lovinger, A. J., Nano-, bio-, multi-, inter-, ... : Polymer research in an era of prefixes. *J. Macromol. Sci.-Polym. Rev.* **2005**, C45, (3), 195-199.
2. Toma, H. E.; Araki, K., O gigantesco e promissor mundo do muito pequeno. *Ciência Hoje* **2005**, 37, (217), 24-31.
3. Dal Bo, A. G.; Soldi, V.; Giacomelli, F. C.; Jean, B.; Pignot-Paintrand, I.; Borsali, R.; Fort, S., Self-assembled carbohydrate-based micelles for lectin targeting. *Soft Matter.* **2011**.
4. Hamley, I. W., *Block Copolymer in Solution: Fundamentals and Applications.* John Wiley: New York. **2006**.
5. Giacomelli, F. C. Estruturação e comportamento físico-químico de sistemas coloidais sob efeito de campo elétrico externo como perspectiva para a ciência macromolecular. Porto Alegre, Tese, **2009**.
6. Pires, T. C., *Parcerias Estratégicas/Centro de Estudos Estratégicos.* Brasília, Vol. 18, **2004**.
7. Feynman, R., There's plenty of room at the bottom. Annual Meeting of the American Physical Society, 20 dez 1959. California Institute of Technology (Caltech). *Eng Sci.* California: Caltech, fev 1960. Disponível em:
8. NSTC, National Science and Technology Council (NSTC). *Nanotechnology Research Directions; WGN Workshop Report,* Washington, **1999**.
9. Ruoslathi, E.; Piersbacher, M. D., New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **1987**, 238, 491-497.
10. Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (5), 631-651.
11. Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O., Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56, (11), 1649-1659.
12. Labarre, D.; Vauthier, C.; Chauvierre, C.; Petri, B.; Muller, R.; Chehimi, M. M., Interactions of blood proteins with poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles decorated with a polysaccharidic brush. *Biomaterials* **2005**, 26, (24), 5075-5084.
13. Passirani, C.; Barratt, G.; Devissaguet, J. P.; Labarre, D., Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran

- covalently bound to poly(methyl methacrylate) with the complement system. *Life Sciences* **1998**, 62, (8), 775-785.
14. Osterberg, E.; Bergstrom, K.; Holmberg, K.; Schuman, T. P.; Riggs, J. A.; Burns, N. L.; Vanalstine, J. M.; Harris, J. M., Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations - comparison to PEG. *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, 29, (6), 741-747.
  15. Haley, B.; Frenkel, E., Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology Seminars and Original Investigations* **2008**, 26, 57-64.
  16. Formariz, T. P.; Wanczinski, B. J.; Júnior, A. A. d. S.; Scarpa, M. V.; Oliveira, A. G., Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. *Infarma* **2004**, 16 n. 1-2, 44-57.
  17. Villetti, M. A.; Borsali, R.; Crespo, J. S.; Soldi, V.; Fukada, K., Static and Dynamic Light Scattering of Polyelectrolyte/Surfactant Solutions: The Na-Hyaluronate/(C10TAB) System *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, 205, 907-917.
  18. Dumitriu, S., *Polysaccharides as Biomaterials* 2nd edition, ed. by Severian Dumitriu, Marcel Dekker, Inc., New York, **2002**, Chapt. 1, p.1-61.
  19. Azevedo, M. M. M. *Nanoesferas e a Liberacao Controlada de Farmacos*. Universidade Estadual de Campinas, **2002**.
  20. Azevedo, M. M. M.; Oliveira, A. F.; Durán, N., *First Brazilian Winter School on Nanobiotechnology-Rede Nanobiotec* **2002**, 2, 173.
  21. Klug, M.; Sanches, M. N. M.; Laranjeira, M. C. M.; Fávere, V. T.; Rodrigues, C. A., Análise das Isotermas de Adsorção de Cu(II), Cd(II), Ni(II) e Zn(II) Pela N-(3,4-Dihidroxibenzil) Quitosana Empregando O Método de Regressão Não Linear. *Quimica Nova* **1998**, 410-415.
  22. Hong, S. W.; Kim, K. H.; Huh, J.; Ahn, C.-H.; Jo, W. H., Drug release behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone)-b-poly(acrylic acid) shell crosslinked micelles below the critical micelle concentration. *Macromolecular Research* **2005**, 5, 397-402.
  23. Buszello, K.; Harnisch, S.; Muller, R. H.; Muller, B. W., The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with Solutol HS 15((R)). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 49, (2), 143-149.

24. Fini, A.; Moyano, J. R.; Gines, J. M.; Perez-Martinez, J. I.; Rabasco, A. M., Diclofenac salts, II. Solid dispersions in PEG6000 and Gelucire 50/13. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, 60, (1), 99-111.
25. Schmidt, V.; Giacomelli, C.; Lecolley, F.; Lai-Kee-Him, J.; Brisson, A. R.; Borsali, R., Diblock copolymer micellar nanoparticles decorated with Annexin-A5 proteins. *Journal Of The American Chemical Society* **2006**, 128, (28), 9010-9011.
26. Ikkala, O.; ten Brinke, G., Hierarchical self-assembly in polymeric complexes: Towards functional materials. *Chemical Communications* **2004**, (19), 2131-2137.
27. Ouarti, N.; Viville, P.; Lazzaroni, R.; Minatti, E.; Schappacher, M.; Deffieux, A.; Putaux, J. L.; Borsali, R., Micellar aggregation in blends of linear and cyclic poly(styrene-*b*-isoprene) diblock copolymers. *Langmuir* **2005**, 21, (20), 9085-9090.
28. Giacomelli, C.; Schmidt, V.; Borsali, R., Specific interactions improve the loading capacity of block copolymer micelles in aqueous media. *Langmuir* **2007**, 23, (13), 6947-6955.
29. Chan, S. C.; Kuo, S. W.; Lee, H. F.; Chang, F. C., Synthesis and characterizations of the multiple morphologies formed by the self-assemble of the semicrystalline P4VP-*b*-PCL diblock copolymers. *Polymer* **2007**, 48, 5059-5068.
30. Caruthers, S. D.; Wickline, S. A.; Lanza, G., Nanotechnological applications in medicine. *Current opinion in Biotechnology* **2007**, 18, 26-30.
31. Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Meier, G.; Frielinghaus, H.; Monkenbusch, M., Synthesis and characterization of model cyclic block copolymers of styrene and butadiene. Comparison of the aggregation phenomena in selective solvents with linear diblock and triblock analogues. *Macromolecules* **2002**, 35, (14), 5426-5437.
32. Hamley, I. W., Nanostructure fabrication using block copolymers. *Nanotechnology* **2003**, 14, (10), R39-R54.
33. Nakashima, K.; Bahadur, P., Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends. *Advances In Colloid And Interface Science* **2006**, 123, 75-96.
34. Lim, Y. B.; Moon, K. S.; Lee, M., Rod-coil block molecules: their aqueous self-assembly and biomaterials applications. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, 18, (25), 2909-2918.

35. Lim, Y.-b.; Moon, K.-S.; Lee, M., Recent advances in functional supramolecular nanostructures assembled from bioactive building blocks. *Chem Soc Rev* **2009**, 38, (4), 925-934.
36. Fendler, J. H., Reactivity Control in Membrane Mimetic Systems. *Pure & Appl. Chem.* **1982**, 54, (10), 1809-1817.
37. Holmberg, K.; Jonsson, B.; Holmberg, K.; Lindman, B., Surfactants and polymers in aqueous solution. John Wiley & Sons: New York, **2002**; Vol. 2, p 547.
38. Barragan-Montero, V.; Winum, J. Y.; Moles, J. P.; Emmanuelle, J.; Clavel, C.; Montero, J. L., Synthesis and properties of isocannabinoid and cholesterol derivatized rhamnosurfactants: application to liposomal targeting of keratinocytes and skin. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 40, (10), 1022-1029.
39. Zana, R., Gemini (dimeric) surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1996**, 1, (5), 566-571.
40. Zana, R.; Levy, H.; Kwetkat, K., Mixed micellization of dimeric (gemini) surfactants and conventional surfactants. I. Mixtures of an anionic dimeric surfactant and of the nonionic surfactants C12E5 and C12E8. *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, 197, (2), 370-376.
41. Paria, S., Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science* **2008**, 138, (1), 24-58.
42. Kumar, N.; Ravikumar, M. N. V.; Domb, A. J., Biodegradable block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 23-44.
43. Lee, H. K.; Park, K. M.; Jeon, Y. J.; Kim, D.; Oh, D. H.; Kim, H. S.; Park, C. K.; Kim, K., Vesicle formed by amphiphilic cucurbit[6]uril: Versatile, noncovalent modification of the vesicle surface, and multivalent binding of sugar-decorated vesicles to lectin. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (14), 5006-5007.
44. Huber, K., Static And Dynamic Scattering From Block Copolymeric Ring Molecules. *Macromolecules* **1988**, 21, (5), 1305-1309.
45. Matyjaszewski, K.; Xia, J., Atom Transfer Radical Polymerization. *Chemical Reviews* **2001**, 101, 2921-2990.
46. Moreira, J. C.; Wang, S. H., Síntese de copolímeros em bloco de p-acetoxiestireno com isopreno através de polimerização

- “viva” via radical livre. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2004**, 14, (3), 171-175.
47. Marko, J. F., Microphase Separation Of Block Copolymer Rings. *Macromolecules* **1993**, 26, (6), 1442-1444.
48. Ryu, J. H.; Lee, M., Liquid crystalline assembly of rod-coil molecules. *Liquid Crystalline Functional Assemblies and Their Supramolecular Structures* **2008**, 128, 63-98.
49. Ouarti, N.; Viville, P.; Lazzaroni, R.; Minatti, E.; Schappacher, M.; Deffieux, A.; Borsali, R., Control of the morphology of linear and cyclic PS-b-PI block copolymer micelles via PS addition. *Langmuir* **2005**, 21, (4), 1180-1186.
50. Schmidt, V.; Giacomelli, C.; Brisson, A. R.; Borsali, R.; Lecolley, F.; Lai-Kee-Him, J., Diblock Copolymer Micellar Nanoparticles Decorated with Annexin-A5 Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 9010-9011.
51. Giacomelli, C.; Le Men, L.; Borsali, R.; Lai-Kee-Him, J.; Brisson, A.; Armes, S. P.; Lewis, A. L., Phosphorylcholine-based pH-responsive diblock copolymer micelles as drug delivery vehicles: Light scattering, electron microscopy, and fluorescence experiments. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (3), 817-828.
52. Discher, B. M.; Won, Y. Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C. M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A., Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* **1999**, 284, (5417), 1143-1146.
53. Minatti, E.; Viville, P.; Borsali, R.; Schappacher, M.; Deffieux, A.; Lazzaroni, R., Micellar morphological changes promoted by cyclization of PS-b-PI copolymer: DLS and AFM experiments. *Macromolecules* **2003**, 36, (11), 4125-4133.
54. Zhang, L. F.; Eisenberg, A., Thermodynamic vs kinetic aspects in the formation and morphological transitions of crew-cut aggregates produced by self-assembly of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers in dilute solution. *Macromolecules* **1999**, 32, (7), 2239-2249.
55. Rijcken, C. J. F.; Soga, O.; Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F., Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery. *Journal Of Controlled Release* **2007**, 120, (3), 131-148.

56. Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A., Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, 16, 3-27.
57. Schweitzer, B.; Felipe, A. C.; Dal Bo, A.; Minatti, E.; Zanette, D.; Lopes, A., Sodium dodecyl sulfate promoting a cooperative association process of sodium cholate with bovine serum albumin. *Journal Of Colloid And Interface Science* **2006**, 298, (1), 457-466.
58. Stuart, M. A. C.; Hofs, B.; Voets, I. K.; de Keizer, A., Assembly of polyelectrolyte-containing block copolymers in aqueous media. *Current Opinion In Colloid & Interface Science* **2005**, 10, (1-2), 30-36.
59. Minatti, E. Um Novo Modelo Para a Interação entre Polímeros Neutros Hidrossolúveis e Surfactantes. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
60. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 47, 113-131.
61. Gaucher, G.; Dufresne, M.-H.; Sant, V. P.; Kang, N., Block copolymer micelles : preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2005**, 109, 169-188.
62. Adams, M. L.; Lavasanifar, A.; Kwon, G. S., Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal Of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 92, (7), 1343-1355.
63. Rabocai, T., Físico-Química de Superfície. Washington: Organização dos Estados Americanos, **1979**.
64. Cabane, B., Structure Of Some Polymer Detergent Aggregates In Water. *Journal Of Physical Chemistry* **1977**, 81, (17), 1639-1645.
65. Torchilin, V. P., Nanocarriers. *Pharmaceutical Research* **2007**, 24, (12), 2333-2334.
66. Astafieva, I.; Zhong, X. F.; Eisenberg, A., Critical Micellization Phenomena In Block Polyelectrolyte Solutions. *Macromolecules* **1993**, 26, (26), 7339-7352.
67. Torchilin, V. P., Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research* **2007**, 24, (1), 1-16.
68. Lee, J. H.; Lee, H. B.; Andrade, J. D., Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Progress in Polymer Science* **1995**, 20, (6), 1043-1079.

69. Kumar, N.; Ravikumar, M. N. V.; Domb, A. J., Biodegradable block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, (1), 23-44.
70. Zalipsky, S., Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, 6, (2), 150-165.
71. Vermette, P.; Meagher, L., Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2003**, 28, (2-3), 153-198.
72. Kwon, G. S.; Kataoka, K., Block-Copolymer Micelles As Long-Circulating Drug Vehicles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, 16, (2-3), 295-309.
73. Rosler, A.; Vandermeulen, G. W. M.; Klok, H. A., Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, (1), 95-108.
74. Yang, L.; Qi, X.; Liu, P.; El Ghzaoui, A.; Li, S. M., Aggregation behavior of self-assembling polylactide/poly(ethylene glycol) micelles for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 394, (1-2), 43-49.
75. Kim, B. S.; Yang, W. Y.; Ryu, J. H.; Yoo, Y. S.; Lee, M., Carbohydrate-coated nanocapsules from amphiphilic rod-coil molecule: binding to bacterial type 1 pili. *Chemical Communications* **2005**, (15), 2035-2037.
76. Lim, Y.; Lee, M., Self-assembled multivalent carbohydrate ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, 5, (3), 401-405.
77. Kim, B. S.; Hong, D. J.; Bae, J.; Lee, M., Controlled self-assembly of carbohydrate conjugate rod-coil amphiphiles for supramolecular multivalent ligands. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (46), 16333-16337.
78. Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **1994**, 263, (5153), 1600-1603.
79. Allen, T. M.; Cullis, P. R., Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* **2004**, 303, (5665), 1818-1822.

80. Torchilin, V. P., Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *Journal of Microencapsulation* **1998**, 15, (1), 1-19.
81. Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R., Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends in Biotechnology* **1998**, 16, (12), 506-513.
82. Stella, B.; Arpicco, S.; Peracchia, M. T.; Desmaele, D.; Hoebeke, J.; Renoir, M.; D'Angelo, J.; Cattel, L.; Couvreur, P., Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 89, (11), 1452-1464.
83. Jiang, F. N.; Jiang, S.; Liu, D.; Richter, A.; Levy, J. G., Development of technology for linking photosensitizers to a model monoclonal-antibody. *Journal of Immunological Methods* **1990**, 134, (1), 139-149.
84. Gaucher, G.; Dufresne, M. H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J. C., Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2005**, 109, (1-3), 169-188.
85. Langer, K.; Coester, C.; Weber, C.; von Briesen, H.; Kreuter, J., Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 49, (3), 303-307.
86. Nobs, L.; Buchegger, F.; Gurny, R.; Allemann, E., Surface modification of poly(lactic acid) nanoparticles by covalent attachment of thiol groups by means of three methods. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 250, (2), 327-337.
87. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, (9), 3057-3064.
88. Yamamoto, H.; Kuno, Y.; Sugimoto, S.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y., Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *Journal of controlled Release* **2005**, 102, (2), 373-381.
89. Lemarchand, C.; Gref, R.; Couvreur, P., Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, 58, (2), 327-341.
90. Langer, K.; Mutschler, E.; Lambrecht, G.; Mayer, D.; Troschau, G.; Stieneker, F.; Kreuter, J., Methylmethacrylate sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles for drug

- delivery - Part III: Evaluation as drug delivery system for ophthalmic applications. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, 158, (2), 219-231.
91. Langer, K.; Stieneker, F.; Lambrecht, G.; Mutschler, E.; Kreuter, J., Methylmethacrylate sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles for drug delivery - Part II: arecaidine propargyl ester and pilocarpine loading and in vitro release. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, 158, (2), 211-217.
  92. Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E., Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, 14, (14), 2161-2175.
  93. Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V., Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, (30), 5418-5429.
  94. Jones, M. N., Carbohydrate-mediated liposomal targeting and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1994**, 13, (3), 215-249.
  95. Jelinek, R.; Kolusheva, S., Carbohydrate biosensors. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (12), 5987-6015.
  96. Sharon, N., Lectin carbohydrate complexes of plants and animals - an atomic view. *Trends in Biochemical Sciences* **1993**, 18, (6), 221-226.
  97. Lis, H.; Sharon, N., Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews* **1998**, 98, (2), 637-674.
  98. Vijayan, M.; Chandra, N., Lectins. *Current Opinion in Structural Biology* **1999**, 9, (6), 707-714.
  99. Loris, R., Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2002**, 1572, (2-3), 198-208.
  100. Bies, C.; Lehr, C. M.; Woodley, J. F., Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56, (4), 425-435.
  101. Trigueros, V.; Lougarre, A.; Ali-Ahmed, D.; Rahbe, Y.; Guillot, J.; Chavant, L.; Fournier, D.; Paquereau, L., Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2003**, 1621, (3), 292-298.
  102. Sharon, N.; Lis, H., Lectins as cell recognition molecules. *Science* **1989**, 246, (4927), 227-234.

103. Tavares, G. A.; Caracelli, I.; Burger, R.; Correia, M. T. S.; Coelho, L.; Oliva, G., Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1996**, 52, 1046-1047.
104. Sharon, N.; Lis, H., Legume lectins - a large family of homologous proteins. *Faseb Journal* **1990**, 4, (14), 3198-3208.
105. Aragão, K. S. Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum*. Université Grenoble I - Joseph Fourier Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant - Grenoble, França, **2008**.
106. Nagata, Y.; Burger, M. M., Wheat-germ agglutinin - molecular characteristics and specificity for sugar binding. *Journal of Biological Chemistry* **1974**, 249, (10), 3116-3122.
107. Kearse, K. P.; Singer, A., Isolation of immature and mature t-cell receptor complexes by lectin affinity-chromatography. *Journal of Immunological Methods* **1994**, 167, (1-2), 75-81.
108. Schwefel, D.; Maierhofer, C.; Beck, J. G.; Seeberger, S.; Diederichs, K.; Moller, H. M.; Welte, W.; Wittmann, V., Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. *Journal of the American Chemical Society* 132, (25), 8704-8719.
109. Greene, W. C.; Goldman, C. K.; Marshall, S. T.; Fleisher, T. A.; Waldmann, T. A., Stimulation of immunoglobulin biosynthesis in human b-cells by wheat-germ-agglutinin .1. evidence that wga can produce both a positive and negative signal for activation of human-lymphocytes. *Journal of Immunology* **1981**, 127, (2), 799-804.
110. Ito, Y.; Tsurudome, M.; Yamada, A.; Hishiyama, M., Interferon induction in mouse spleen-cells by mitogenic and nonmitogenic lectins. *Journal of Immunology* **1984**, 132, (5), 2440-2444.
111. Banerjee, R.; Das, K.; Ravishankar, R.; Suguna, K.; Surolia, A.; Vijayan, M., Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *Journal of Molecular Biology* **1996**, 259, (2), 281-296.
112. Neumann, D.; Lehr, C. M.; Lenhof, H. P.; Kohlbacher, O., Computational modeling of the sugar-lectin interaction. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56, (4), 437-457.
113. Neumann, D.; Kohlbacher, O.; Lenhof, H. P.; Lehr, C. M., Lectin-sugar interaction - Calculated versus experimental

- binding energies. *European Journal of Biochemistry* **2002**, 269, (5), 1518-1524.
114. Smart, J. D.; Nicholls, T. J.; Green, K. L.; Rogers, D. J.; Cook, J. D., Lectins in drug delivery: a study of the acute local irritancy of the lectins from *Solanum tuberosum* and *Helix pomatia*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **1999**, 9, (1), 93-98.
115. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides - all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, 3, (2), 97-130.
116. Thomas, G. B.; Rader, L. H.; Park, J.; Abezgauz, L.; Danino, D.; DeShong, P.; English, D. S., Carbohydrate Modified Catanionic Vesicles: Probing Multivalent Binding at the Bilayer Interface. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (15), 5471-5477.
117. Rieger, J.; Freichels, H.; Imberty, A.; Putaux, J. L.; Delair, T.; Jerome, C.; Auzely-Velty, R., Polyester Nanoparticles Presenting Mannose Residues: Toward the Development of New Vaccine Delivery Systems Combining Biodegradability and Targeting Properties. *Biomacromolecules* **2009**, 10, (3), 651-657.
118. Rieger, J.; Stoffelbach, F.; Cui, D.; Imberty, A.; Lameignere, E.; Putaux, J. L.; Jerome, R.; Auzely-Velty, R., Mannosylated poly(ethylene oxide)-b-Poly(is an element of-caprolactone) diblock copolymers: Synthesis, characterization, and interaction with a bacterial lectin. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (9), 2717-2725.
119. Niemeyer, C. M., Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, (22), 4128-4158.
120. Niemeyer, C. M.; Ceyhan, B., DNA-directed functionalization of colloidal gold with proteins. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, (19), 3685-+.
121. Lin, C. C.; Yeh, Y. C.; Yang, C. Y.; Chen, C. L.; Chen, G. F.; Chen, C. C.; Wu, Y. C., Selective binding of mannose-encapsulated gold nanoparticles to type 1 pili in *Escherichia coli*. *Journal Of The American Chemical Society* **2002**, 124, (14), 3508-3509.
122. Gabizon, R.; McKinley, M. P.; Groth, D.; Prusiner, S. B., Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, 85, (18), 6617-6621.

123. Ikehara, Y.; Niwa, T.; Biao, L.; Ikehara, S. K.; Ohashi, N.; Kobayashi, T.; Shimizu, Y.; Kojima, N.; Nakanishi, H., A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using intraperitoneal macrophages as a cellular vehicle. *Cancer Research* **2006**, 66, (17), 8740-8748.
124. Mauk, M. R.; Gamble, R. C.; Baldeschwieler, J. D., Targeting of lipid vesicles - specificity of carbohydrate receptor analogs for leukocytes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1980**, 77, (8), 4430-4434.
125. Afra, D.; Baron, B.; Bonadonna, G.; Curran, W. J.; Green, S. B.; Hildebrand, J.; Scott, C. B.; Shapiro, W.; Thomas, D.; Trojanowski, T.; Urtasun, R.; Walker, M. D.; Burdett, S.; Parmar, M. K. B.; Souhami, R. L.; Stenning, S. P.; Stewart, L. A.; Glioma Meta-analysis Trialists, G., Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **2002**, 359, (9311), 1011-1018.
126. Couvreur, P.; Vauthier, C., Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research* **2006**, 23, (7), 1417-1450.
127. Groothuis, D. R., The blood-brain and blood-tumor barriers: A review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro-Oncology* **2000**, 2, (1), 45-59.
128. Du, J.; Lu, W. L.; Ying, X.; Liu, Y.; Du, P.; Tian, W.; Men, Y.; Guo, J.; Zhang, Y.; Li, R. J.; Zhou, J.; Lou, J. N.; Wang, J. C.; Zhang, X.; Zhang, Q., Dual-Targeting Topotecan Liposomes Modified with Tamoxifen and Wheat Germ Agglutinin Significantly Improve Drug Transport across the Blood-Brain Barrier and Survival of Brain Tumor-Bearing Animals. *Molecular Pharmaceutics* **2009**, 6, (3), 905-917.
129. Licciardi, M.; G., G.; Du, J.; Armes, S. P.; Tang, Y.; Lewis, A. L., New folate-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems. *Polymer* **2006**, 47, 2946-2955.
130. Licciardi, M.; Tang, Y.; Bilingham, N. C.; Armes, S. P., Synthesis of novel folic acid-functionalized biocompatible block copolymers by atom transfer radical polymerization for gene delivery and encapsulation of hydrophobic drugs. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1085-1096.

131. Esmaeili, F.; Ghahremani, M. H.; Esmaeili, B.; Khoshayand, M. R.; Atyabi, F.; Dinarvand, R., PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, 349, 249-255.
132. Bader, H.; Ringsdorf, H.; Schmidt, B., Watersoluble Polymers In Medicine. *Angewandte Makromolekulare Chemie* **1984**, 123, (AUG), 457-485.
133. Riess, G., Micellization of block copolymers. *Progress In Polymer Science* **2003**, 28, (7), 1107-1170.
134. Xie, Z.; Guan, H. G.; Chen, X.; Lu, C.; Chen, L.; Hu, X.; Shi, Q.; Jing, X., A novel polymer-paclitaxel conjugate based on amphiphilic triblock copolymer  
*Journal of Controlled Release* **2007**, 117, 210-216.
135. Enomoto, Y.; Kamitakahara, H.; Takano, T.; Nakatsubo, F., Synthesis of diblock copolymers with cellulose derivatives. 3. Cellulose derivatives carrying a single pyrene group at the reducing-end and fluorescent studies of their self-assembly systems in aqueous NaOH solutions. *Cellulose* **2006**, 13, (4), 437-448.
136. Kamitakahara, H.; Nakatsubo, F., Synthesis of diblock copolymers with cellulose derivatives. 1. Model study with azidoalkyl carboxylic acid and cellobiosylamine derivative. *Cellulose* **2005**, 12, (2), 209-219.
137. Liu, J. Y.; Zhang, L. M., Preparation of a polysaccharide-polyester diblock copolymer and its micellar characteristics. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 69, (1), 196-201.
138. Landfester, K., The generation of nanoparticules in miniemulsion. *Advanced Materials* **2001**, 13, 765-768.
139. Jabbari, E.; Khakpour, M., Morphology of and release behavior from porous polyurethane microspheres. *Biomaterials* **2000**, 21, 2073-2079.
140. Letchford, K.; Burt, H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticles structures: micelles, nanosphers, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 65, 259-269.
141. Villetti, M. A.; Borsali, R.; Crespo, J. S.; Soldi, V.; Fukada, K., Static and dynamic light scattering of polyelectrolyte/surfactant solutions: the Na-hyaluronate/(C(10)TAB) system.

- Macromolecular Chemistry And Physics **2004**, 205, (7), 907-917.
142. Zhang, L.; Yu, K.; Eisenberg, A., Ion-Induced Morphological Changes in Crew-Cut • Aggregates of Amphiphilic Block Copolymers. *Science* **1996**, 272, (5269), 1777-1779.
143. Giacomelli, C.; Schmidt, V.; Aissou, K.; Borsali, R., Block Copolymer Systems: From Single Chain to Self-Assembled Nanostructures. *Langmuir* **2010**, 26, (20), 15734-15744.
144. Moffitt, M.; Khougaz, K.; Eisenberg, A., Micellization of ionic block copolymers. *Accounts Of Chemical Research* **1996**, 29, (2), 95-102.
145. Saulinier, P.; Anton, N.; Heurtault, B.; Benoit, J.-P., Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. *C. R. Chimie In Press*, **2007**.
146. Zhang, L. F.; Eisenberg, A., Multiple morphologies of crew-cut aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block-copolymers. *Science* **1995**, 268, (5218), 1728-1731.
147. Yu, Y. S.; Zhang, L. F.; Eisenberg, A., Morphogenic effect of solvent on crew-cut aggregates of amphiphilic diblock copolymers. *Macromolecules* **1998**, 31, (4), 1144-1154.
148. Yu, K.; Eisenberg, A., Multiple morphologies in aqueous solutions of aggregates of polystyrene-block-poly(ethylene oxide) diblock copolymers. *Macromolecules* **1996**, 29, (19), 6359-6361.
149. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K., Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, (7), 2039-2044.
150. Zana, R., *Surfactants in Solution: New Methods of Investigation*; M. Dekker: New York, 1987; Vol. Chapter 5. 1987.
151. Kalyanasundaram, K., *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*; Academic Press: New York 1987.
152. Turro, N. J.; Baretz, B. H.; Kuo, P.-L., Photoluminescence Probes for the Investigation of Interactions between Sodium Dodecyl Sulfate and Water-Soluble Polymers. *Macromolecules* **1984**, 17, 1321.
153. Winnik, F. M.; Regismond, S. T. A., Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, 118, (1-2), 1-39.

154. Christoff, M.; da Silveira, N. P.; Samios, D., Fluorescence and light scattering studies on the aggregation of sodium cholate in the presence of low molecular weight poly(ethylene oxide). *Langmuir* **2001**, 17, (9), 2885-2888.
155. MARTINS, R. M. Estrutura e Dinâmica da Interação de Éteres de Celulose com Surfactantes Porto Alegre, 2006.
156. Pecora, R., Doppler Shifts In Light Scattering From Pure Liquids + Polymer Solutions. *Journal Of Chemical Physics* **1964**, 40, (6), 1604-&.
157. Tanford, C., *Physical Chemistry of Macromolecules*. John Wiley & Sons: 1961.
158. Berne, B. J.; Pecora, R., *Dynamic Light Scattering*; John Wiley & Sons: New York, 1976.
159. Giacomelli, C.; Schmidt, V.; Borsali, R., Nanocontainers formed by self-assembly of poly(ethylene oxide)-b-poly(glycerol monomethacrylate) - Drug conjugates. *Macromolecules* **2007**, 40, (6), 2148-2157.
160. Guinier, A.; Fournet, G., *Small-Angle Scattering of X-rays*; Wiley: New York, 1955.
161. Wolff, D.; Czaplá, S.; Heyer, A. G.; Radosta, S.; Mischnick, P.; Springer, J., Globular shape of high molar mass inulin revealed by static light scattering and viscometry. *Polymer* **2000**, 41, (22), 8009-8016.
162. Burchard, W., Solubility and solution structure of cellulose derivatives. *Cellulose* **2003**, 10, (3), 213-225.
163. Provencher, S. W., CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications* **1982**, 27, (3), 229-242.
164. Guo, X. H.; Zhao, N. M.; Chen, S. H.; Teixeira, J., Small-angle neutron scattering study of the structure of protein/detergent complexes. *Biopolymers* **1990**, 29, 335-346.
165. Itri, R.; Amaral, L. Q., Micellar- shape anisometry near isotropic- liquid- crystal phase transitions. *Phys. Rev.* **1993**, 47, 2551- 2557.
166. Pedersen, J. S.; Gerstenberg, M. C., Scattering form factor of block copolymer micelles. *Macromolecules* **1996**, 29, (4), 1363-1365.
167. J., K., Software package SASfit for fitting small-angle scattering curves; Paul Scherrer Institute: Villigen, URL: <http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html> **2010**.

168. Ma, D. L.; Shum, T. Y. T.; Zhang, F. Y.; Che, C. M.; Yang, M. S., Water soluble luminescent platinum terpyridine complexes with glycosylated acetylde and arylacetylde ligands: photoluminescent properties and cytotoxicities. *Chemical Communications* **2005**, (37), 4675-4677.
169. Mereyala, H. B.; Gurralla, S. R., A highly diastereoselective, practical synthesis of allyl, propargyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-gluco, beta-D-galactopyranosides and allyl, propargyl heptaacetyl-beta-D-lactosides. *Carbohydrate Research* **1998**, 307, (3-4), 351-354.
170. Fort, S.; Birikaki, L.; Dubois, M. P.; Antoine, T.; Samain, E.; Driguez, H., Biosynthesis of conjugatable saccharidic moieties of GM(2) and GM(3) gangliosides by engineered E-coli. *Chemical Communications* **2005**, (20), 2558-2560.
171. Ryu, J. H.; Lee, E.; Lim, Y. B.; Lee, M., Carbohydrate-coated supramolecular structures: Transformation of nanofibers into spherical micelles triggered by guest encapsulation. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, (15), 4808-4814.
172. Miyaura, N.; Suzuki, A., Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chemical Reviews* **1995**, 95, (7), 2457-2483.
173. Bouzide, A.; LeBerre, N.; Sauve, G., Silver(I) oxide-mediated facile and practical sulfonylation of alcohols. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, (50), 8781-8783.
174. Tuzar, Z., Overview of polymer micelles. In: Webber SE, Munk P, Tuzar Z, editors. *Solvents and self-organization of polymer*. NATO ASI series, serie E: applied sciences, vol. 327. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; **1996**.p. 1-17.
175. Chu, B.; Zhou, Z., Physical chemistry of polyoxyalkylene block copolymer surfactants. In: Nace VM, editor. *Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers*. Surfactant science series 60, New York: Marcel Dekker; **1996**. p. 67-143.
176. Munk, P., Classical methods for the study of block copolymer micelles. In: Webber SE, Munk P, Tuzar Z, editors. *Solvents and self-organization of polymer*. NATO ASI series, serie E: applied sciences, vol. 327. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; **1996**. p. 367-81.
177. Zana, R., Fluorescence studies of amphiphilic block copolymers in solution. In: Alexandridis P, Lindman B, editors. *Amphiphilic block copolymers: self assembly and applications*. Amsterdam: Elsevier; **2000**. p. 221-252.

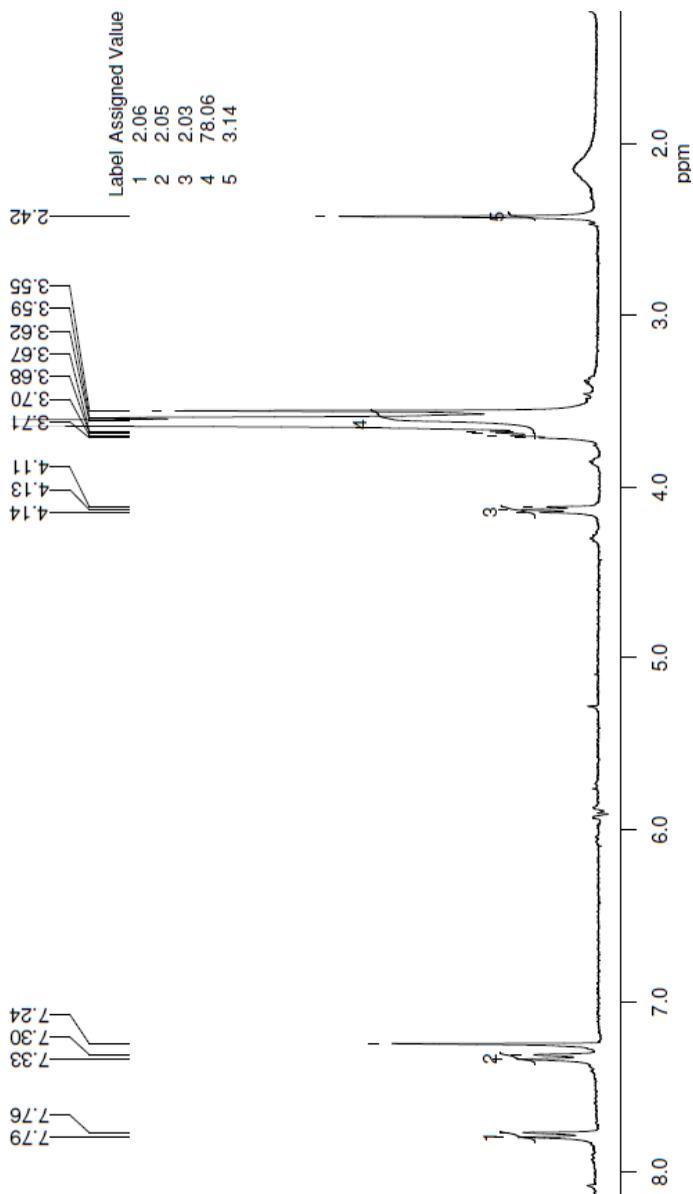
178. Mortensen, K., Small angle scattering studies of block copolymer micelles, micellar mesophases and networks. In: Alexandridis P, Lindman B, editors. Amphiphilic block copolymers: self assembly and applications. Amsterdam: Elsevier; **2000**. p. 191-220
179. Atwood, D.; Florence, A. T., Surfactants Systems: their chemistry, pharmacy and biology. New York: Chapman, **1983**. cap. 3, p. 72-123.
180. Tadros, T. F., Surfactants. Academic Press: London, **1984**.
181. Lainez, A.; del Burgo, P.; Junquera, E.; Aicart, E., Mixed micelles formed by n-octyl-beta-D-glucopyranoside and tetradecyltrimethylammonium bromide in aqueous media. *Langmuir* **2004**, 20, (14), 5745-5752.
182. Mukerjee, P.; Mysels, K. J., Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems. National Bureau of Standards: Washington, DC, **1971**.
183. Bunton, C. A.; Nome, F.; Quina, F. H.; Romsted, L. S., Ion Binding and Reactivity at Charged Aqueous Interfaces. *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 357-364.
184. Romsted, L. S., Micellar Effects on Reaction Rates and Equilibria. In *Surfactants in Solution*, Mittal, K. L.; Lindman, B., Eds. Plenum Press: New York, **1984**; Vol. 2, pp 1015-1067.
185. Zaldivar, M.; Larson, R. G., Lattice Monte Carlo simulations of dilute mixed micelles. *Langmuir* **2003**, 19, (24), 10434-10442.
186. Garcia-Rio, L.; Leis, J. R.; Lopez-Fontan, J. L.; Mejuto, J. C.; Mosquera, V.; Rodriguez-Dafonte, P., Mixed micelles of alkylamines and cetyltrimethylammonium chloride. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 289, (2), 521-529.
187. Tiwary, L. K.; Mandal, A.; Alam, M. S.; Thennarasu, S.; Mandal, A. B., Thermodynamics studies on tyrosine-hydantoin drug-cetyltrimethylammonium bromide mixed micellar system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2010** 82, (1), 126-133.
188. Tanford, C., Theory of micelle formation in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry* **1974**, 78, (24), 2469-2479.
189. Rodríguez-Pulido, A.; Casado, A.; Muñoz-Ubeda, M. n.; Junquera, E.; Aicart, E., Experimental and Theoretical Approach to the Sodium Decanoate-Dodecanoate Mixed Surfactant System in Aqueous Solution. *Langmuir* **2010**, 26, (12), 9378-9385.

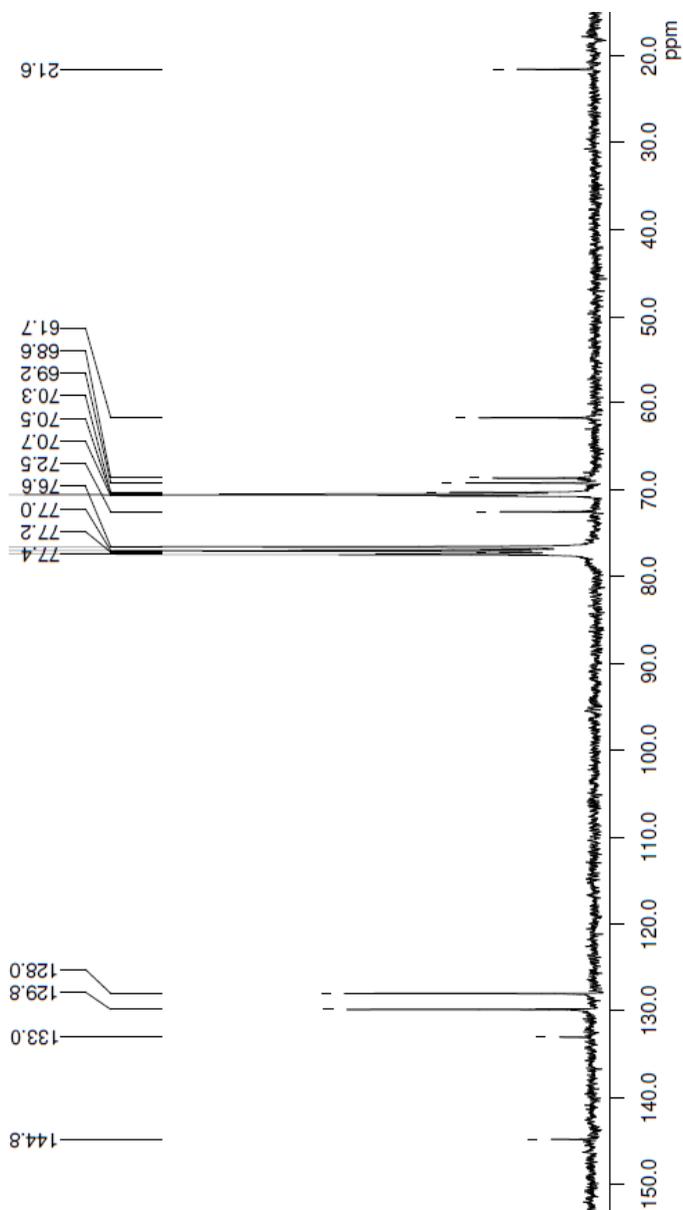
190. Attwood, D.; Florence, A. T., *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology.* 1.ed., Chapman & Hall, London, 1983.
191. Zana, R.; Yiv, S.; Strazielle, C.; Lianos, P., Effect of Alcohol on the Properties of Micellar Systems 1. Critical Micellization Concentration, Micelle Molecular Weight and Ionization Degree, and Solubility of Alcohols in MICellar Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, 80, (1), 208-223.
192. Gouin, S.; Shu, X. X., Fluorescence and NMR studies of the effect of a bile acid dimer on the micellization of bile salts. *Langmuir* **1998**, 14, 4025-4029.
193. McNamee, C. E.; Nilsson, M.; von Corswant, C.; Soderman, O., Physicochemical characterization of PEG1500-12-acyloxy-stearate micelles and liquid crystalline phases. *Langmuir* **2005**, 21, (18), 8146-8154.
194. Malmsten, M.; VanAlstine, J. M., Adsorption of poly(ethylene glycol) amphiphiles to form coatings which inhibit protein adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, 177, (2), 502-512.
195. Vaccaro, M.; von Corswant, C.; Soderman, O., Investigation of the adsorption of PEG1500-12-acyloxystearate surfactants onto phospholipid bilayers: An ellipsometry and Cryo-TEM study. *Biophysical Journal* **2007**, 93, (12), 4300-4306.
196. VanAlstine, J. M.; Malmsten, M., Poly(ethylene glycol) amphiphiles: Surface behavior of biotechnical significance. *Langmuir* **1997**, 13, (15), 4044-4053.
197. Thoren, P. E. G.; Soderman, O.; Engstrom, S.; von Corswant, C., Interactions of novel, nonhemolytic surfactants with phospholipid vesicles. *Langmuir* **2007**, 23, (13), 6956-6965.
198. Zana, R., Ionization of Cationic Micelles: Effect of the Detergent Structure. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, 78, (2), 330-337.
199. Rodriguez-Pulido, A.; Casado, A.; Munoz-Ubeda, M.; Junquera, E.; Aicart, E., Experimental and Theoretical Approach to the Sodium Decanoate-Dodecanoate Mixed Surfactant System in Aqueous Solution. *Langmuir* 26, (12), 9378-9385.
200. Tanford, C., *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes.* 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, **1980**; Vol. 1.

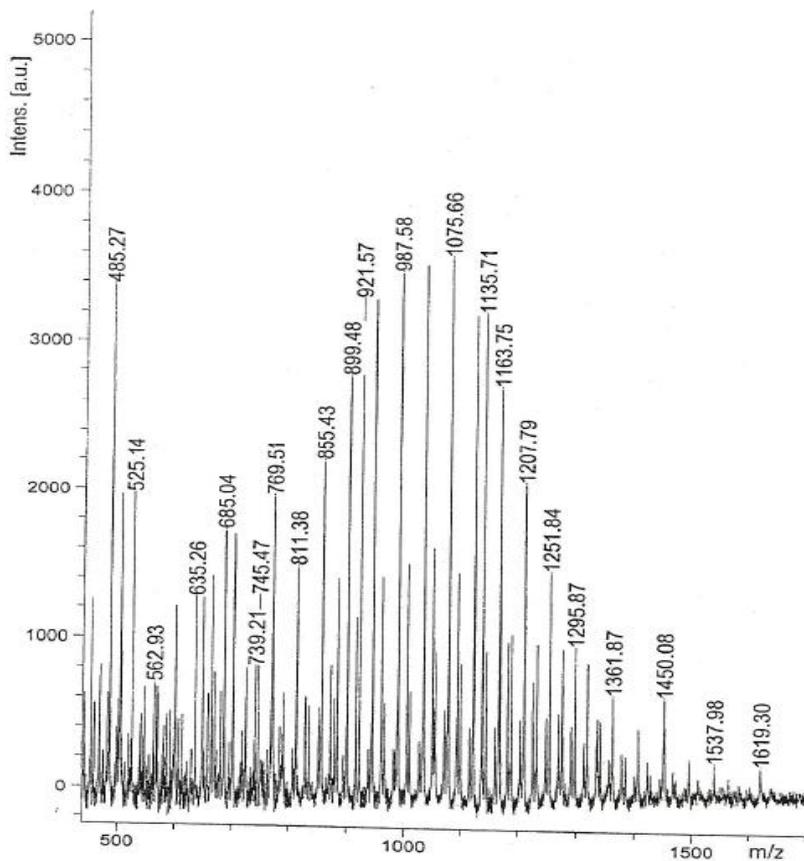
201. Rosen, M. J., Surfactants and Interfacial Phenomena. John Wiley & Sons: New York, 1978; p 304.
202. Tanford, C., Micelle shape and size. *Journal of Physical Chemistry* **1972**, 76, (21), 3020-&.
203. Jang, C. J.; Ryu, J. H.; Lee, J. D.; Sohn, D.; Lee, M., Synthesis and supramolecular nanostructure of amphiphilic rigid aromatic-flexible dendritic block molecules. *Chemistry of Materials* **2004**, 16, (22), 4226-4231.
204. Ryu, J. H.; Hong, D. J.; Lee, M., Aqueous self-assembly of aromatic rod building blocks. *Chemical Communications* **2008**, (9), 1043-1054.
205. Dal Bó, A.; Schweitzer, B.; Felipe, A. C.; Zanette, D.; Björn, L., Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-Sodium Dodecanoate Interaction Investigated by Surface Tension and Electrical Conductivity Techniques. *Colloids Surf.* **2005**, 256, 171-180.
206. Zhang, L. F.; Eisenberg, A., Morphogenic effect of added ions on crew-cut aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers in solutions. *Macromolecules* **1996**, 29, (27), 8805-8815.
207. Discher, D. E.; Eisenberg, A., Polymer vesicles. *Science* **2002**, 297, (5583), 967-973.
208. Pedersen, J. S., Form factors of block copolymer micelles with spherical, ellipsoidal and cylindrical cores. *Journal of Applied Crystallography* **2000**, 33, (1), 637-640.
209. Castelletto, V.; Parras, P.; Hamley, I. W.; Baverback, P.; Pedersen, J. S.; Panine, P., Wormlike micelle formation and flow alignment of a pluronic block copolymer in aqueous solution. *Langmuir* **2007**, 23, (13), 6896-6902.
210. Agrawal, S. K.; Sanabria-DeLong, N.; Tew, G. N.; Bhatia, S. R., Structural characterization of PLA-PEO-PLA solutions and hydrogels: Crystalline vs amorphous PLA domains. *Macromolecules* **2008**, 41, (5), 1774-1784.
211. Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H., Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, (7), 698-725.
212. Pieters, R. J., Maximising multivalency effects in protein-carbohydrate interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, (10), 2013-2025.
213. Goldstein, I. J.; Hughes, R. C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N., What should be called a lectin? *Nature* **1980**, 285, (5760), 66-66.



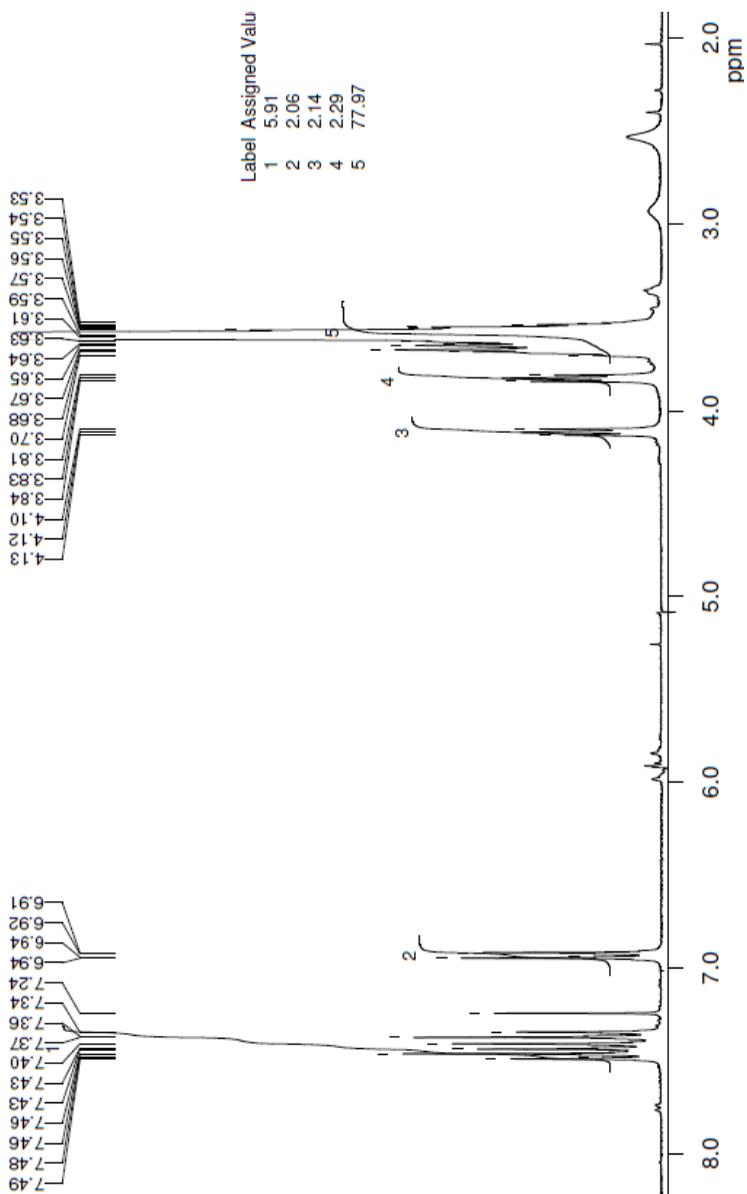
## ANEXOS

Espectro 01. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 1.

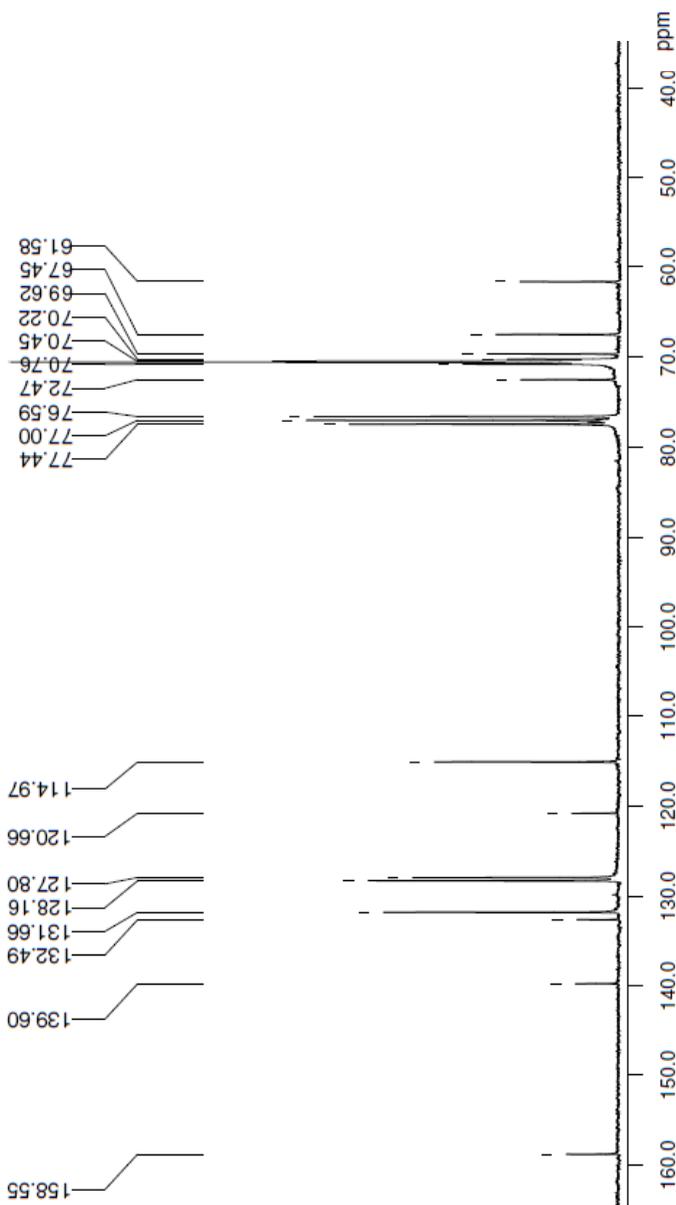
Espectro 02. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) do composto 1.



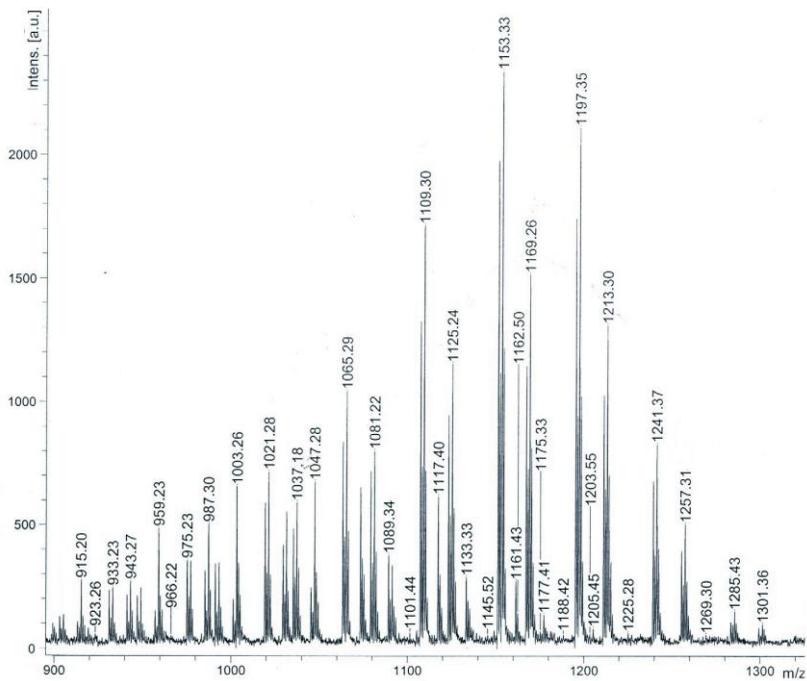
Espectro 03. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 1.



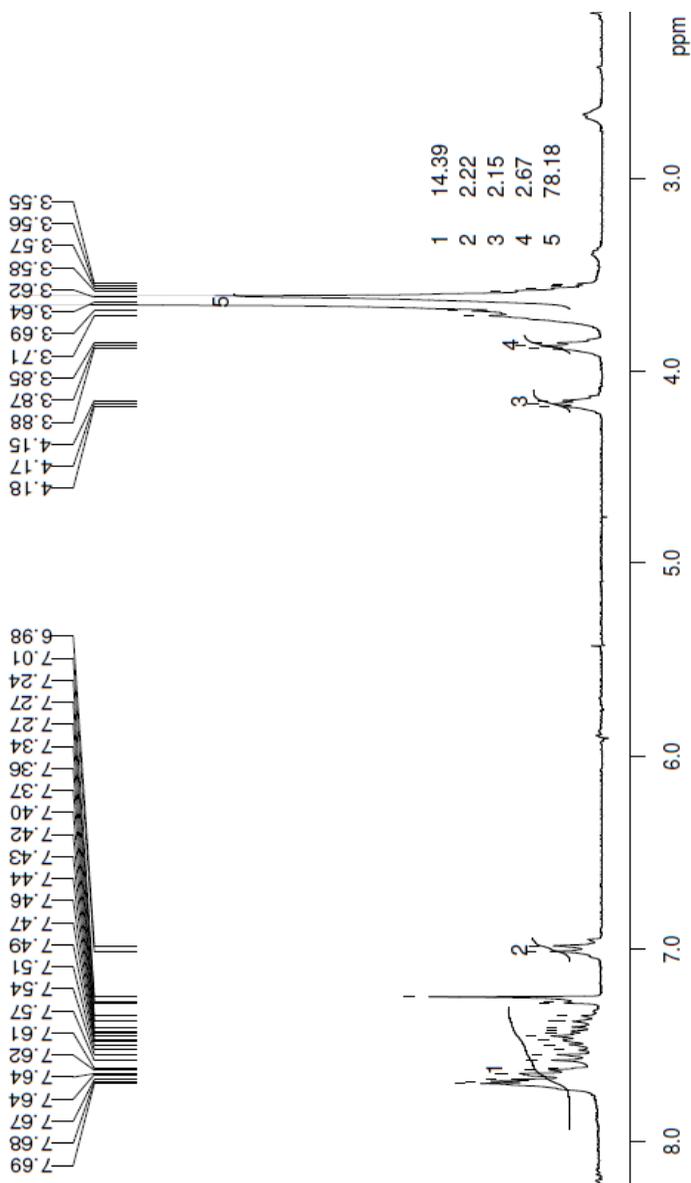
Espectro 04. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 2.



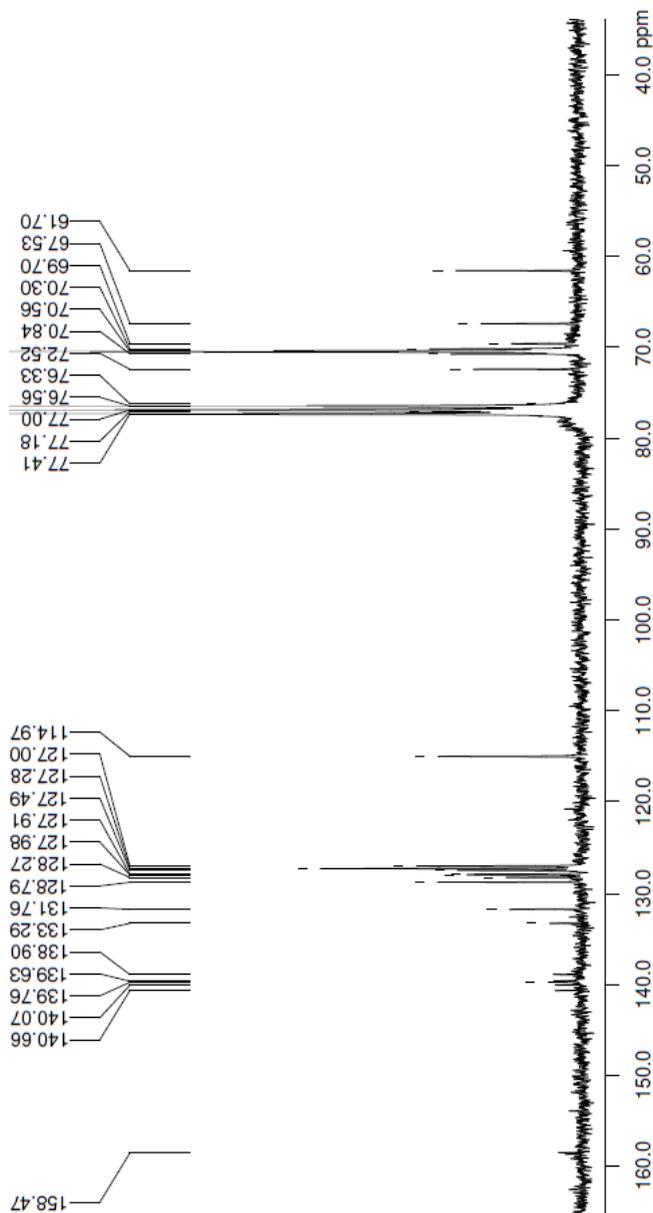
Espectro 05. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 2.



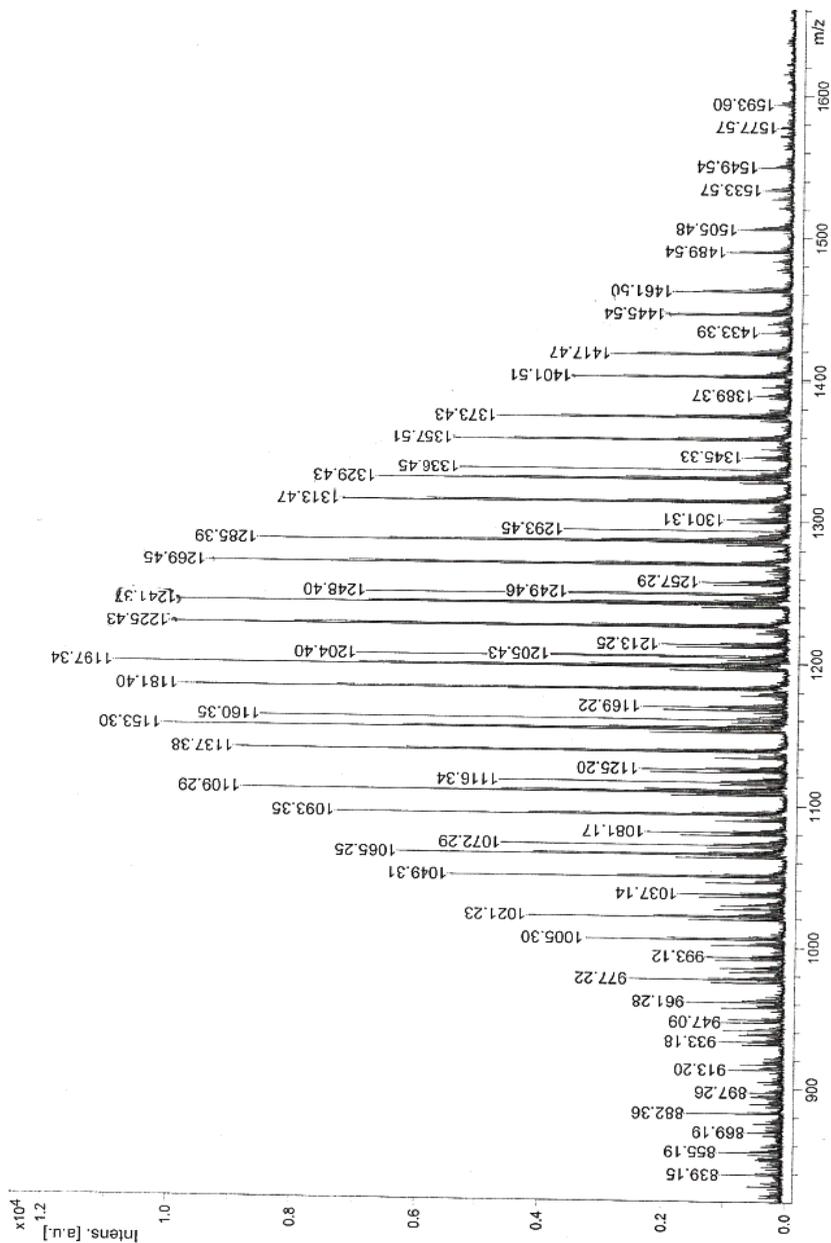
Espectro 06. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 2.



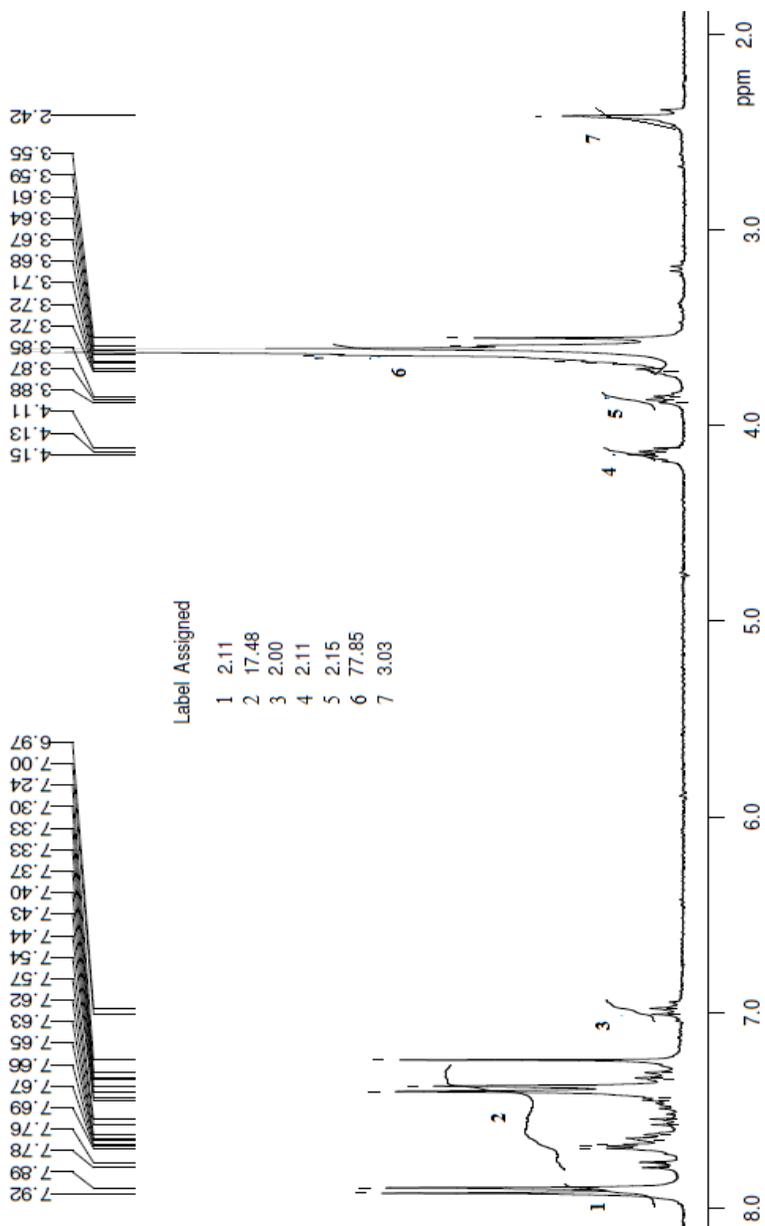
Espectro 07. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do composto 3.

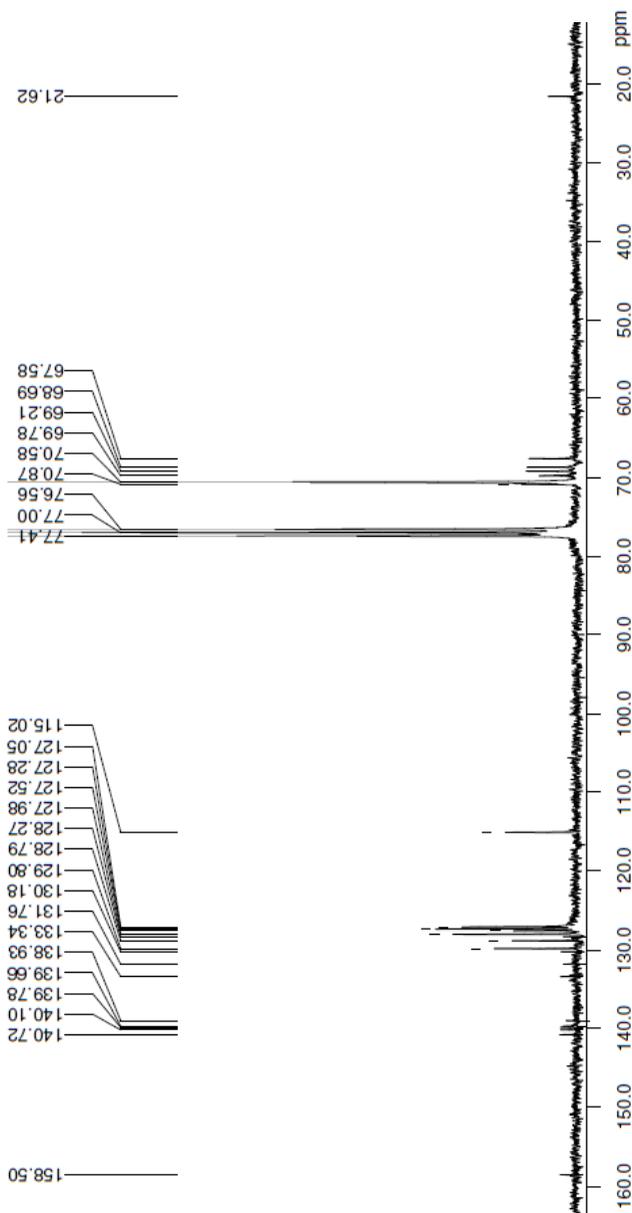


Espectro 08. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 3.

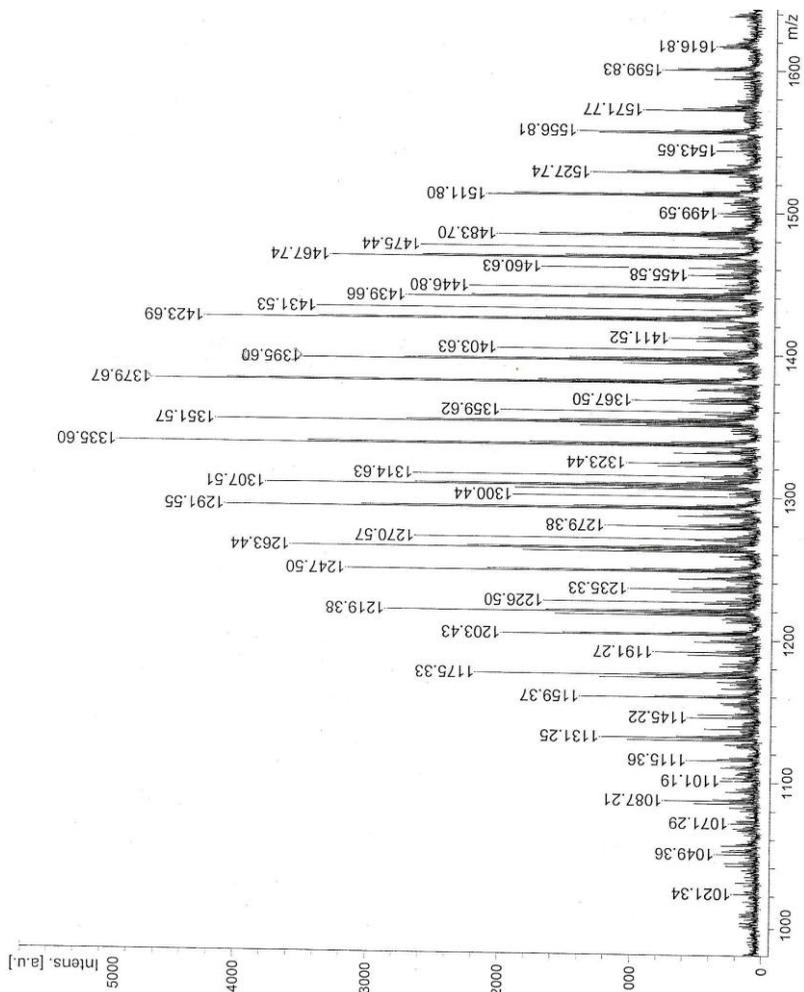


Espectro 09. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 3.

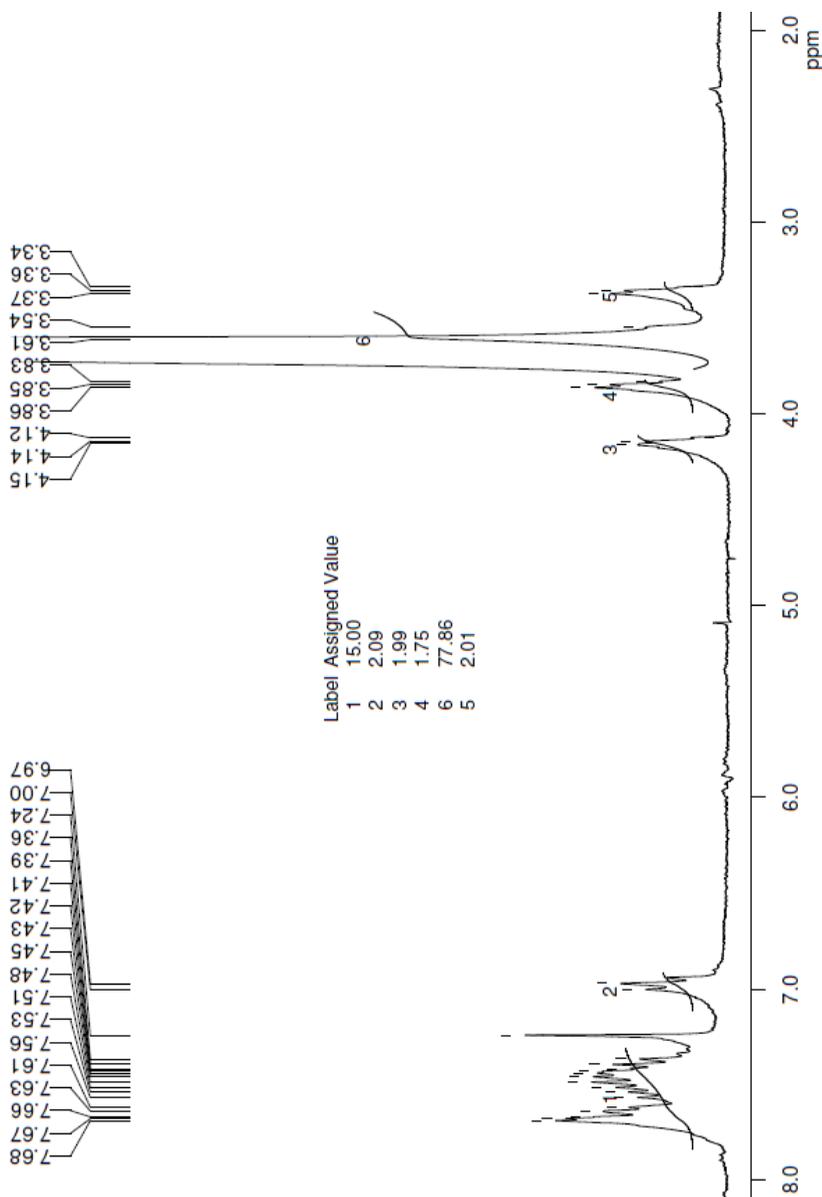
Espectro 10. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do composto 4.



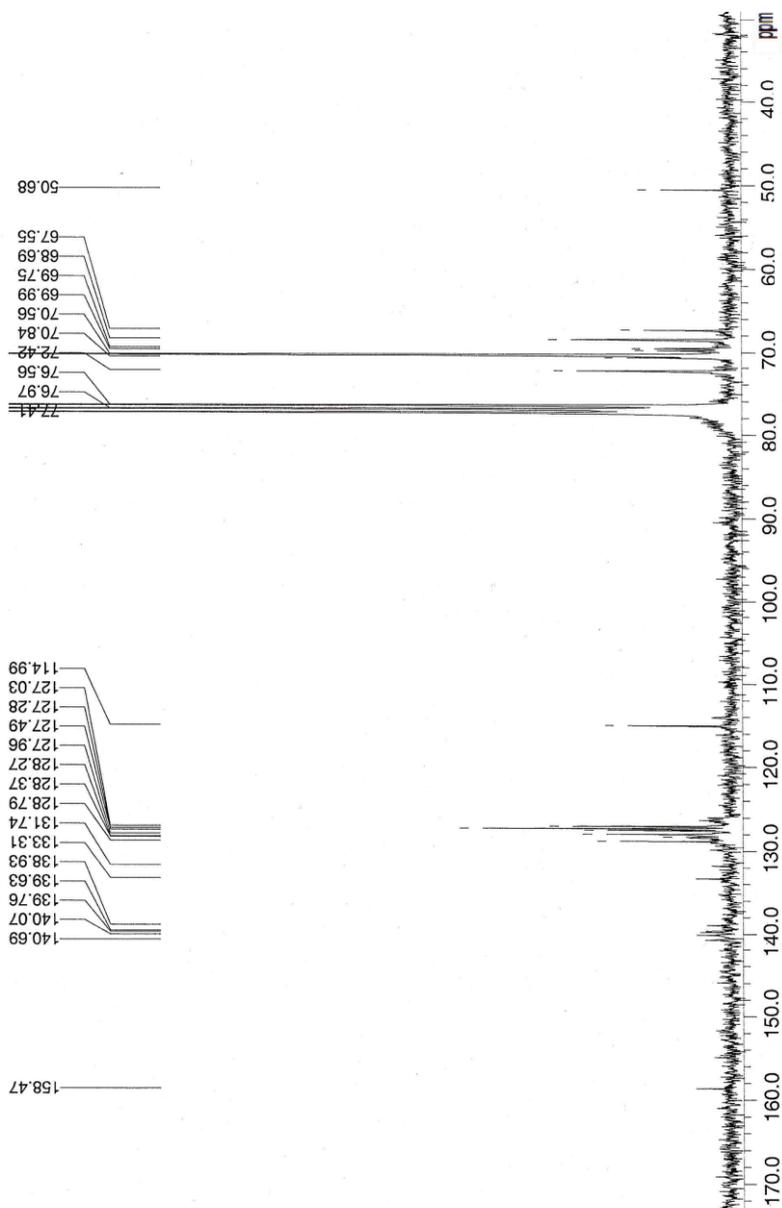
Espectro 11. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 4.



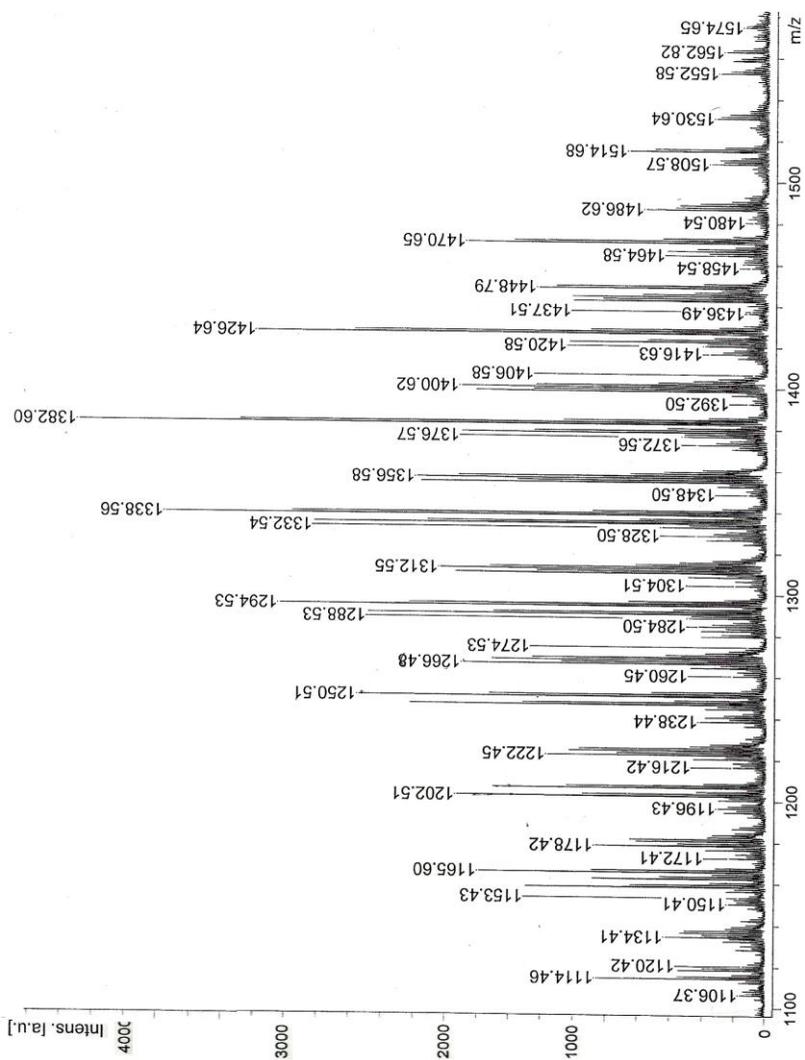
Espectro 12. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 4.



Espectro 13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 5.



Espectro 14. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 5.



Espectro 15. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 5.

## Analysis Info

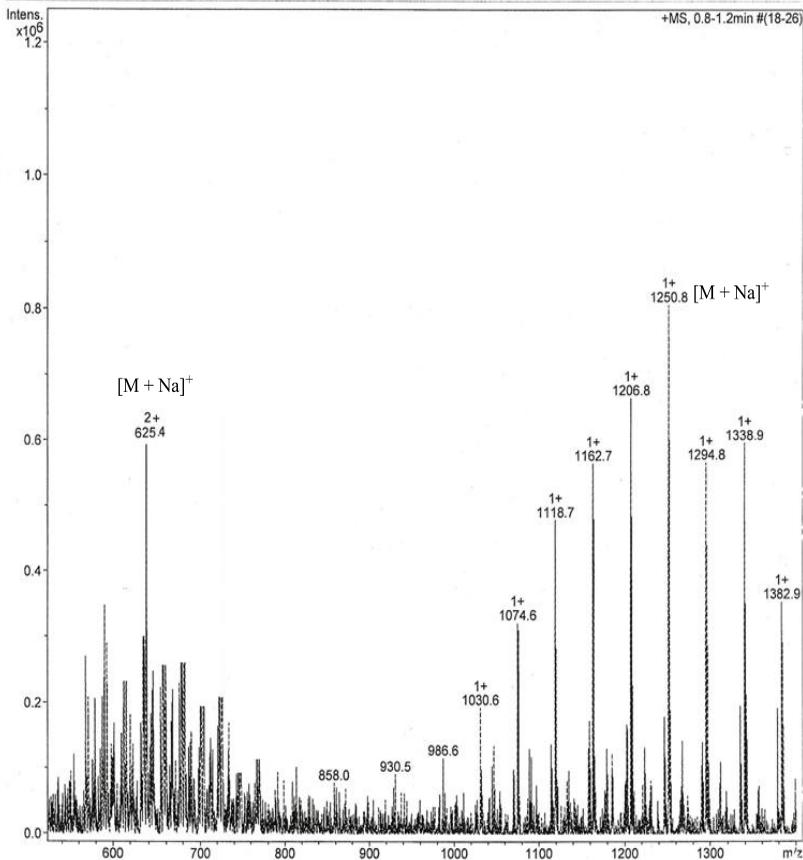
Analysis Name D:\Data\Cermav\Alexandre Gonggalves\_11\_01\_3867.d  
Method 09\_07\_2008\_passeur+masse target mass=800\_3867.m  
Sample Name Alexandre Gonggalves  
Comment TETRAPHENYLPEG600-N3(1227)  
2.2 mg/mL ds CH2Cl2 dilue 1/200 eau/MeOH/CH2Cl2

Acquisition Date 12/14/2009 5:00:23 PM

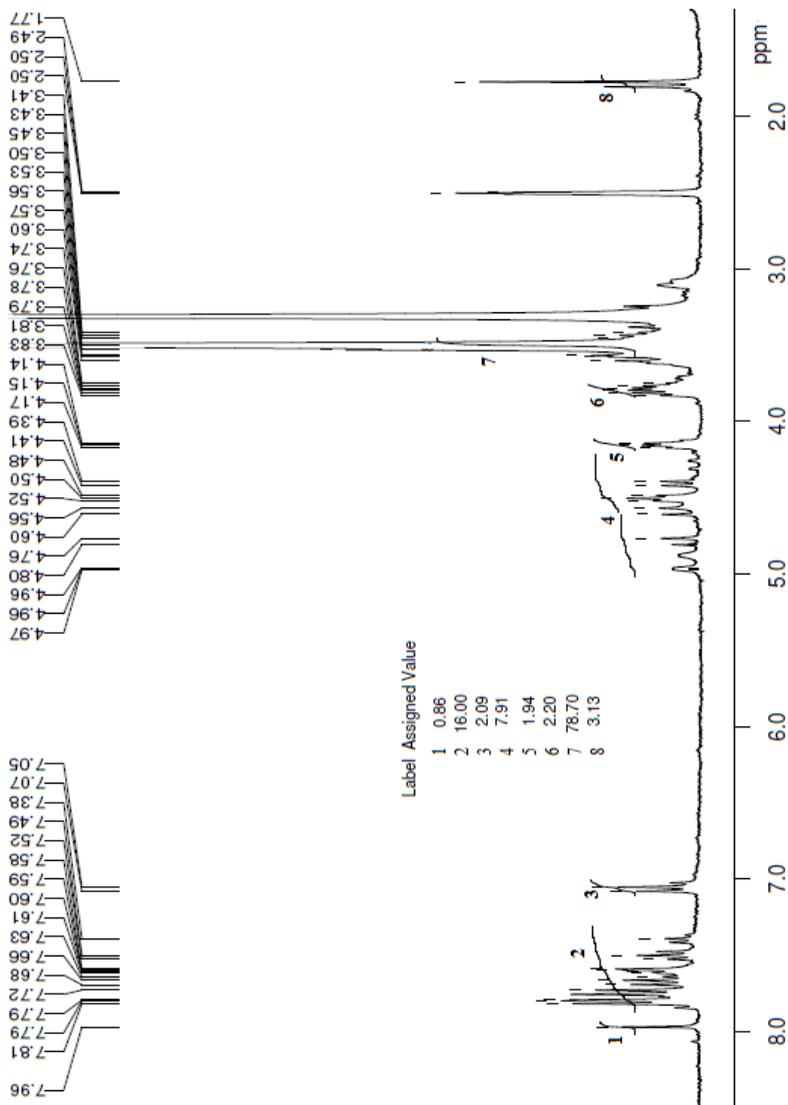
Operator Alexandre Gonggalves  
Instrument esquire3000 plus

## Acquisition Parameter

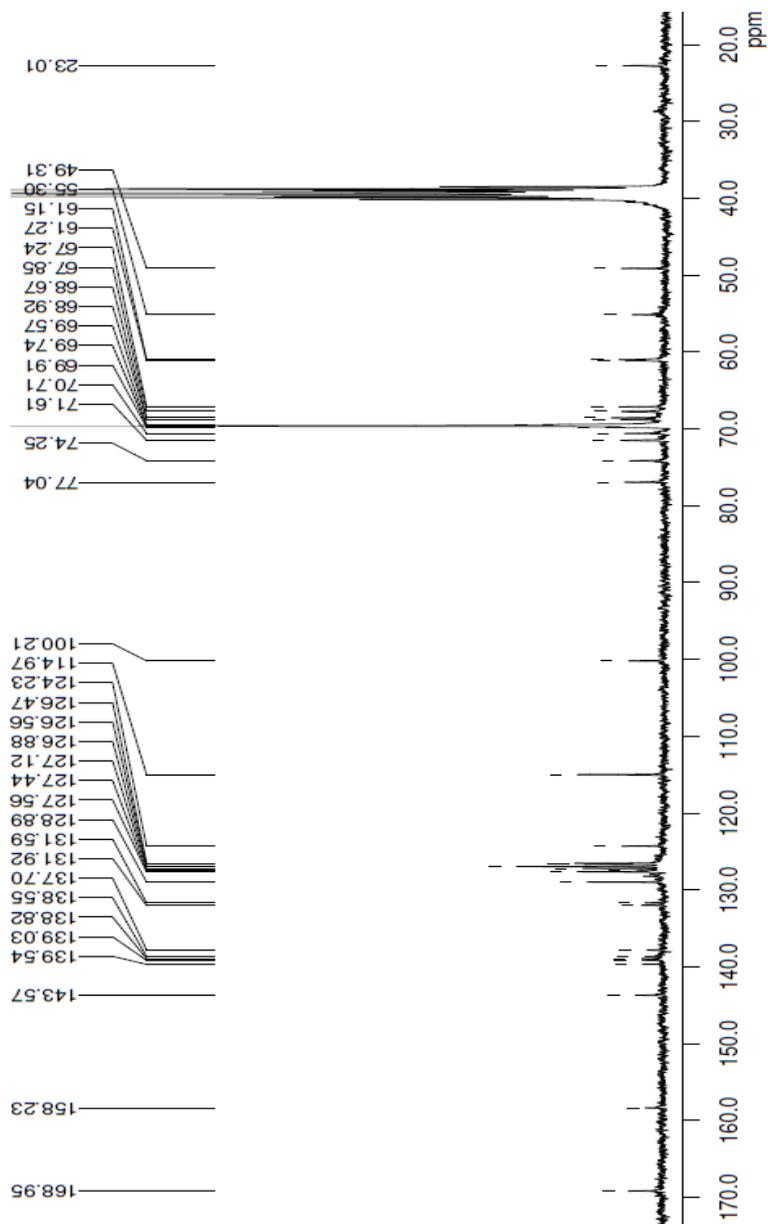
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	120 m/z	Scan End	1400 m/z
Capillary Exit	157.0 Volt	Skim 1	40.0 Volt	Trap Drive	110.8
Accumulation Time	3201 $\mu$ s	Averages	20 Spectra	Auto MS/MS	off



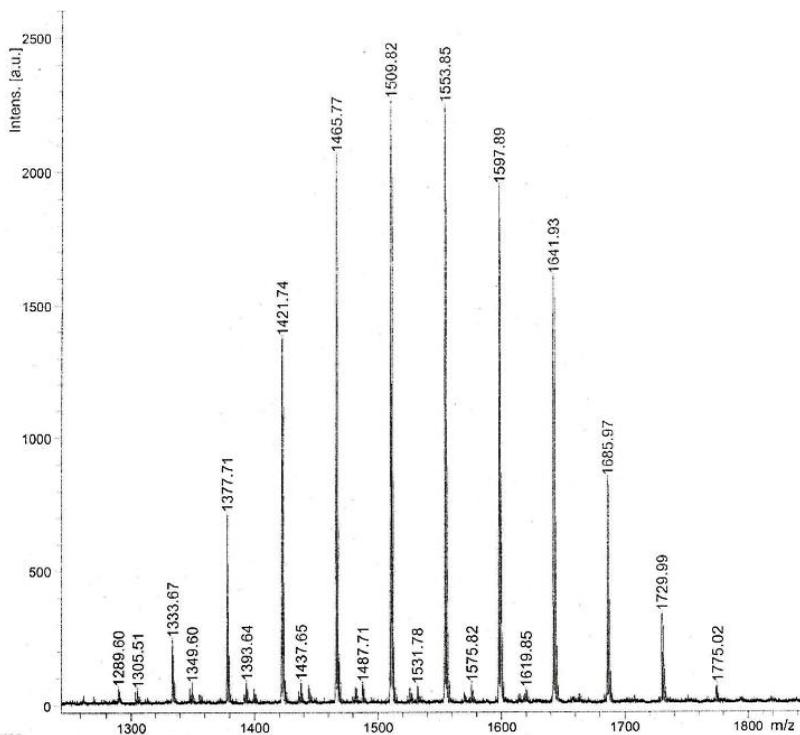
Espectro 16. Espectro de massa ESI do composto 5.



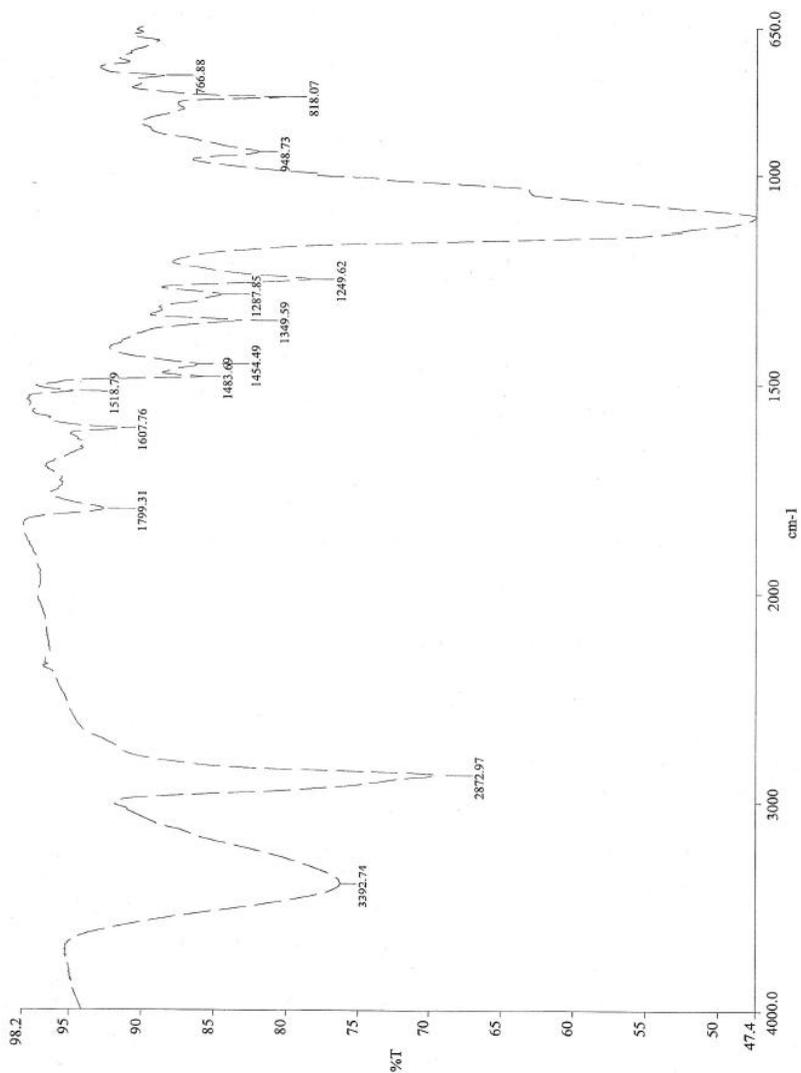
Espectro 17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 6.



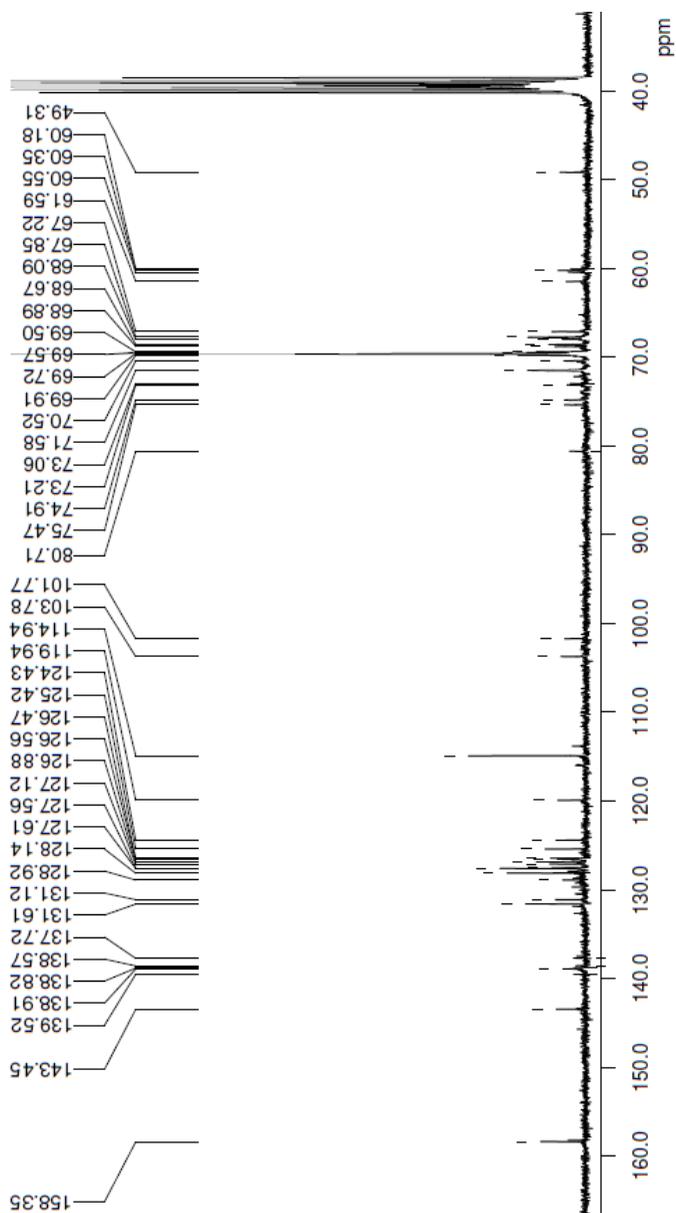
Espectro 18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz) do composto 6.



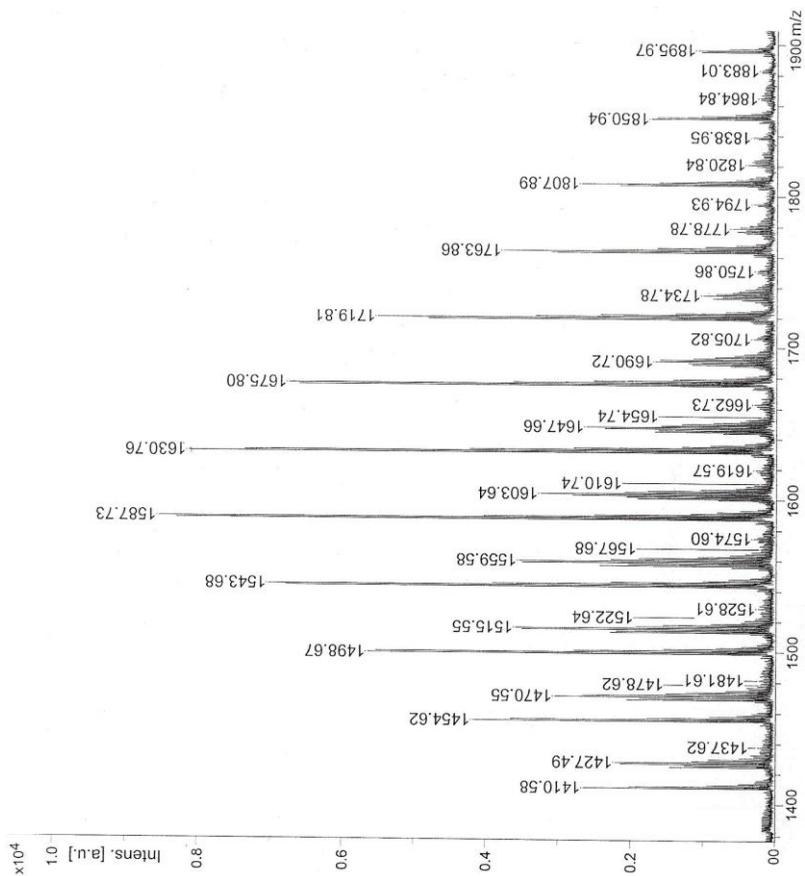
Espectro 19. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 6.



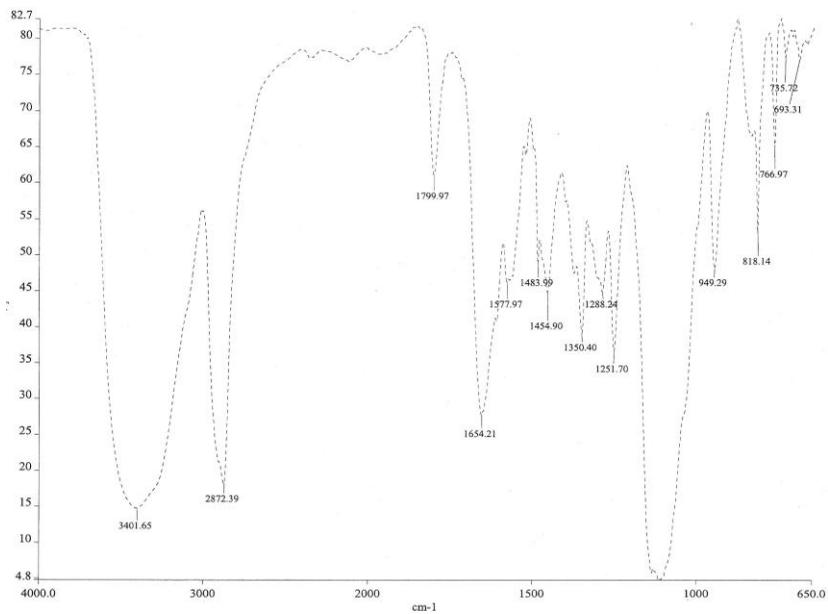
Espectro 20. Espectro de IV (KBr) do composto 6.



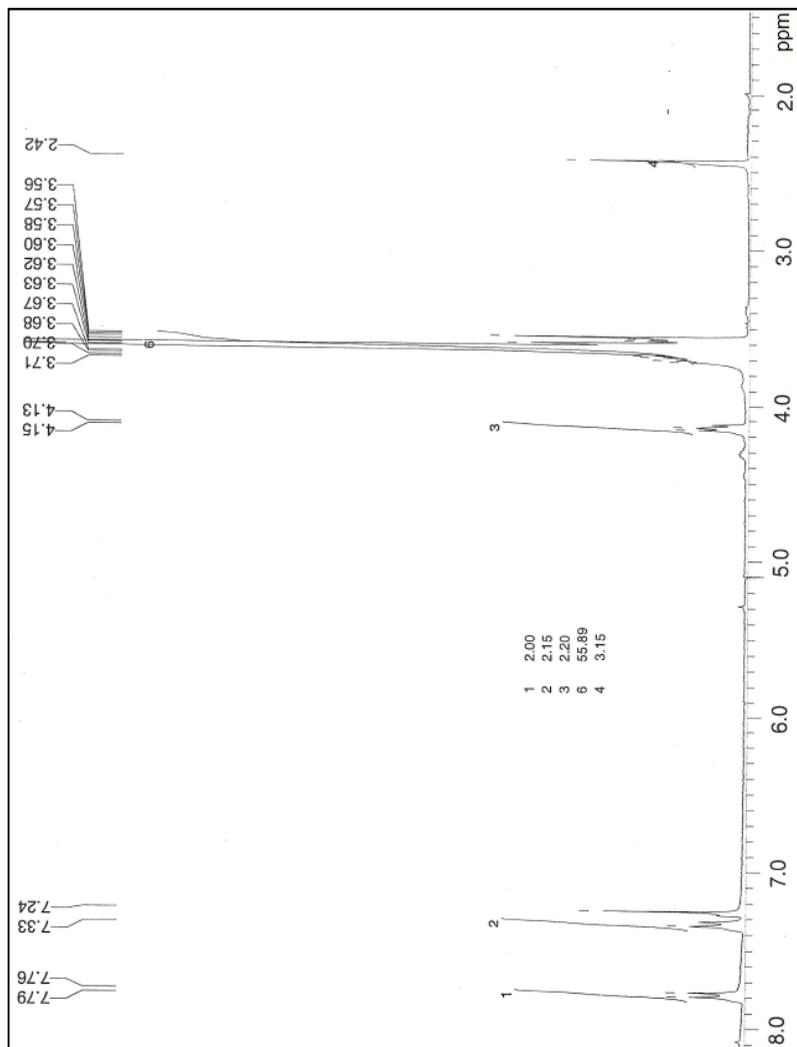
Espectro 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz) do composto 7.



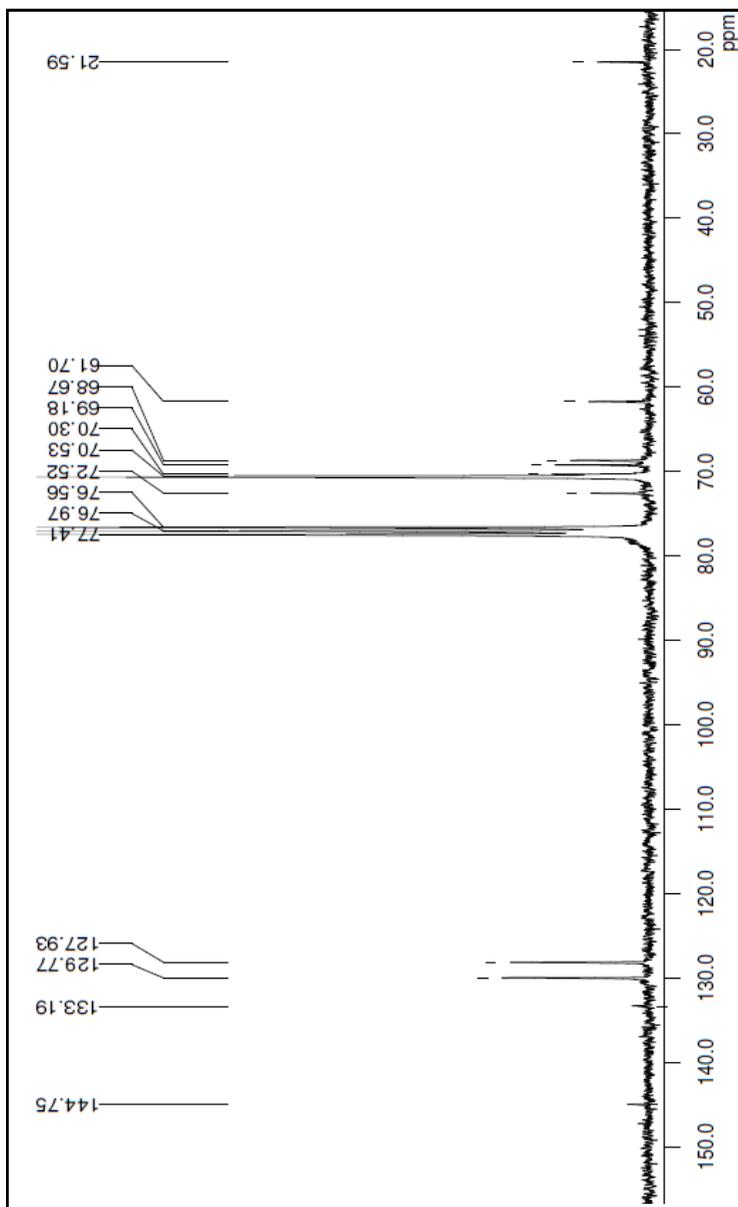
Espectro 22. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 7.



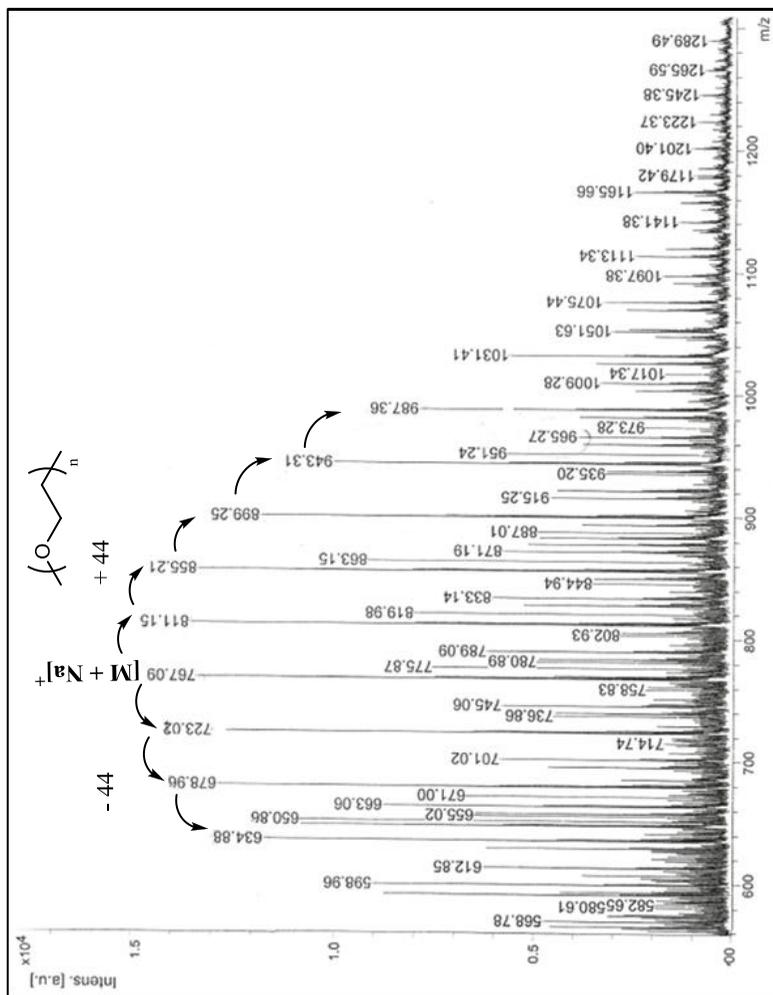
Espectro 23. Espectro de IV (KBr) do composto 7.



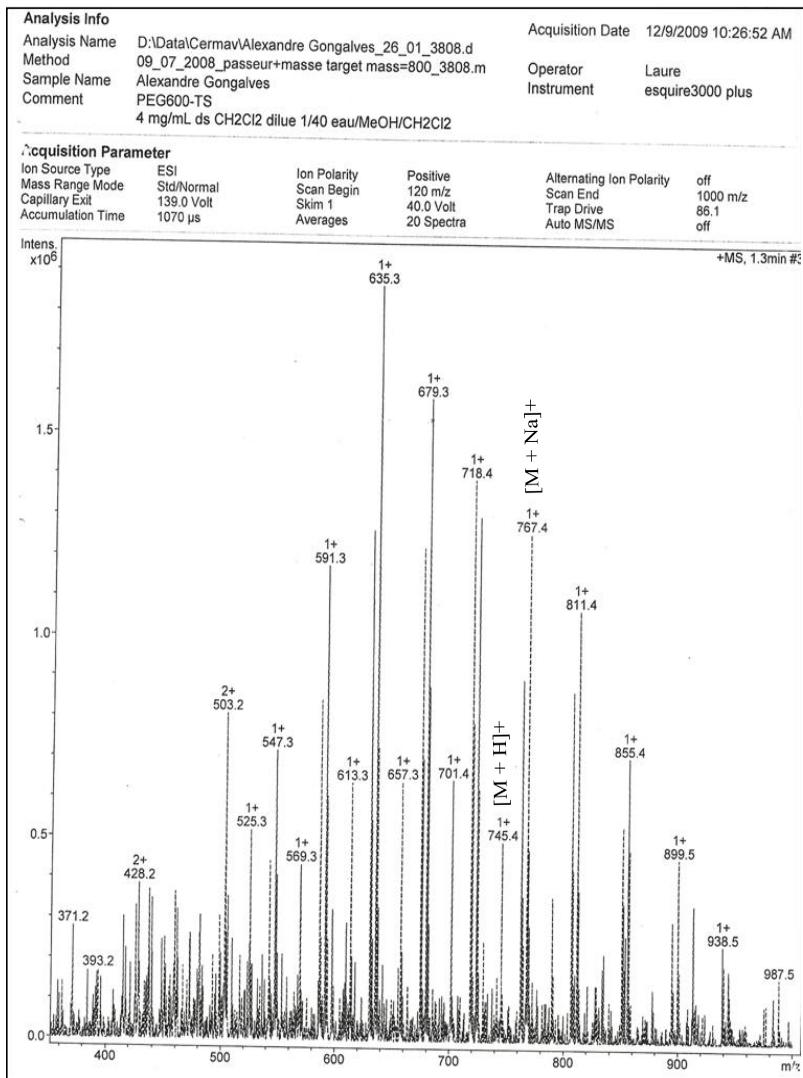
Espectro 24. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 8.



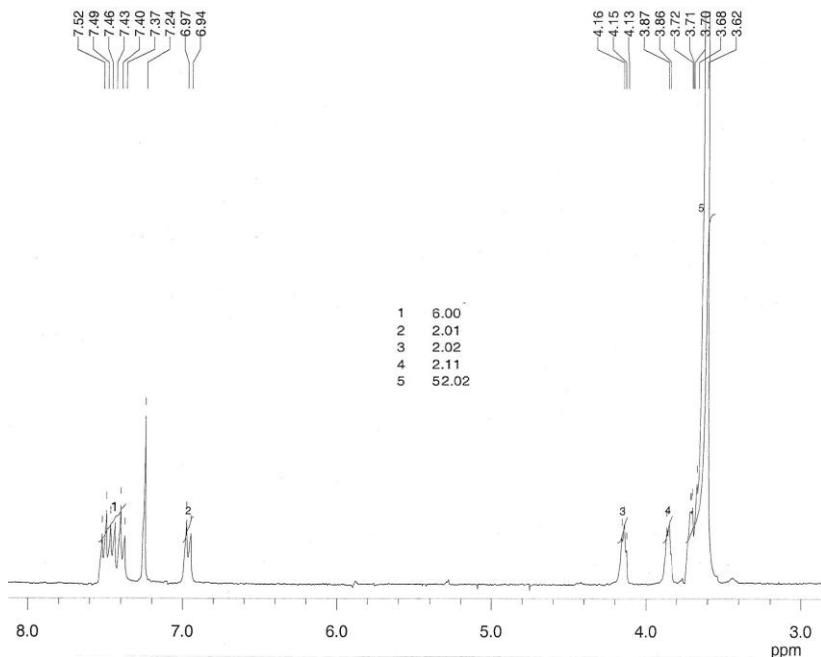
Espectro 25. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 8.



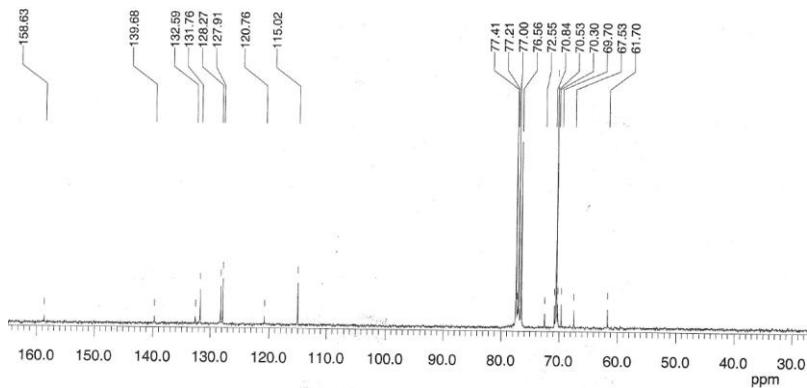
Espectro 26. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 8.



Espectro 27. Espectro de massa ESI do composto 8.

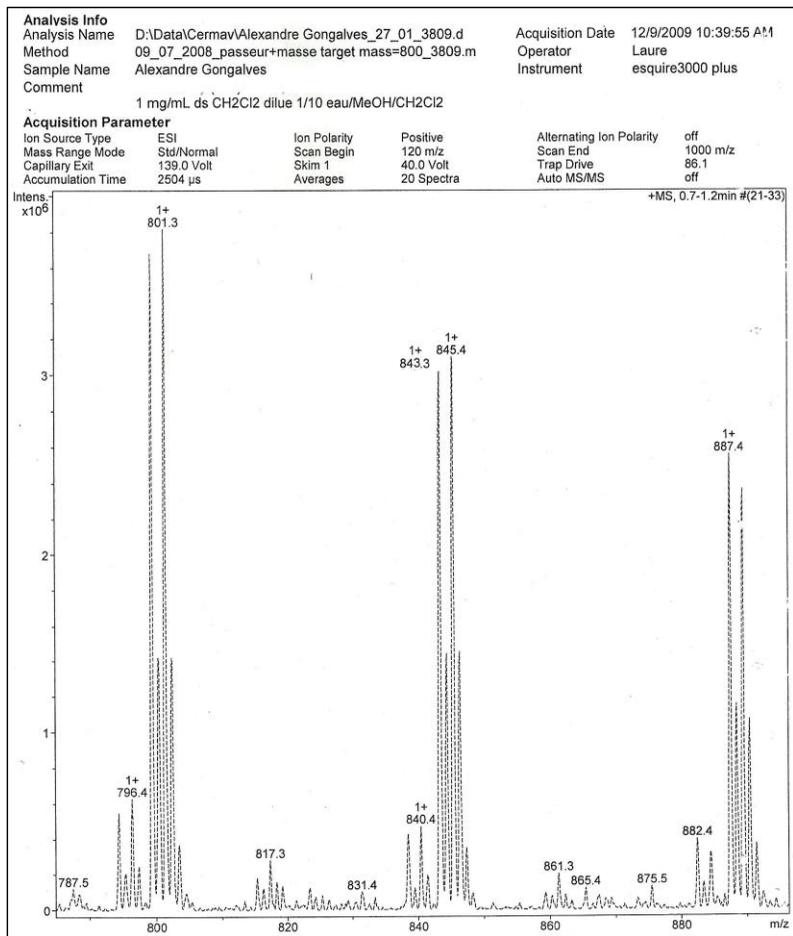


Espectro 28. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 9.

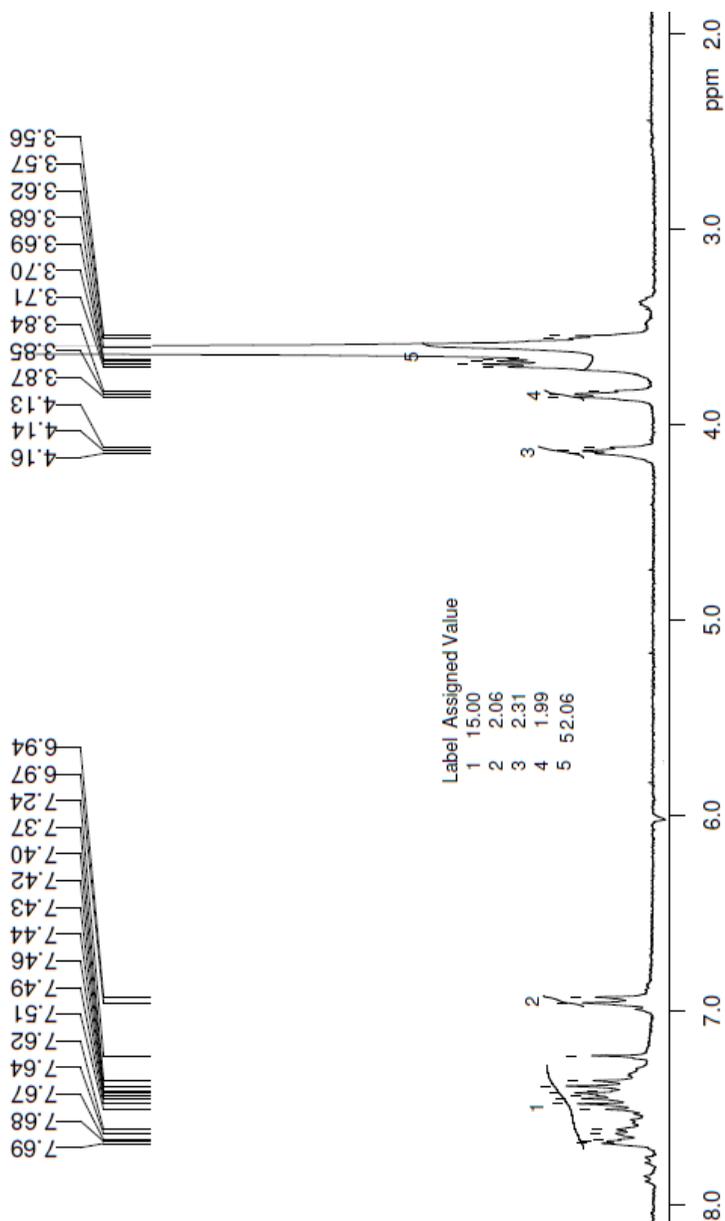


Espectro 29. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 9.

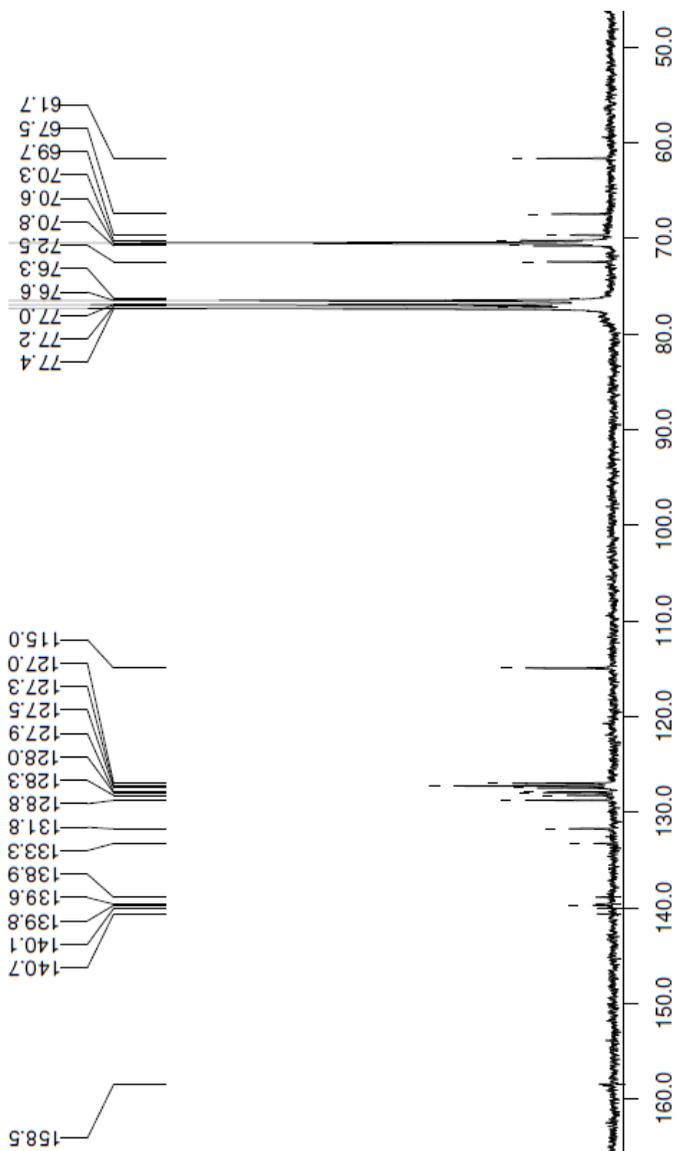




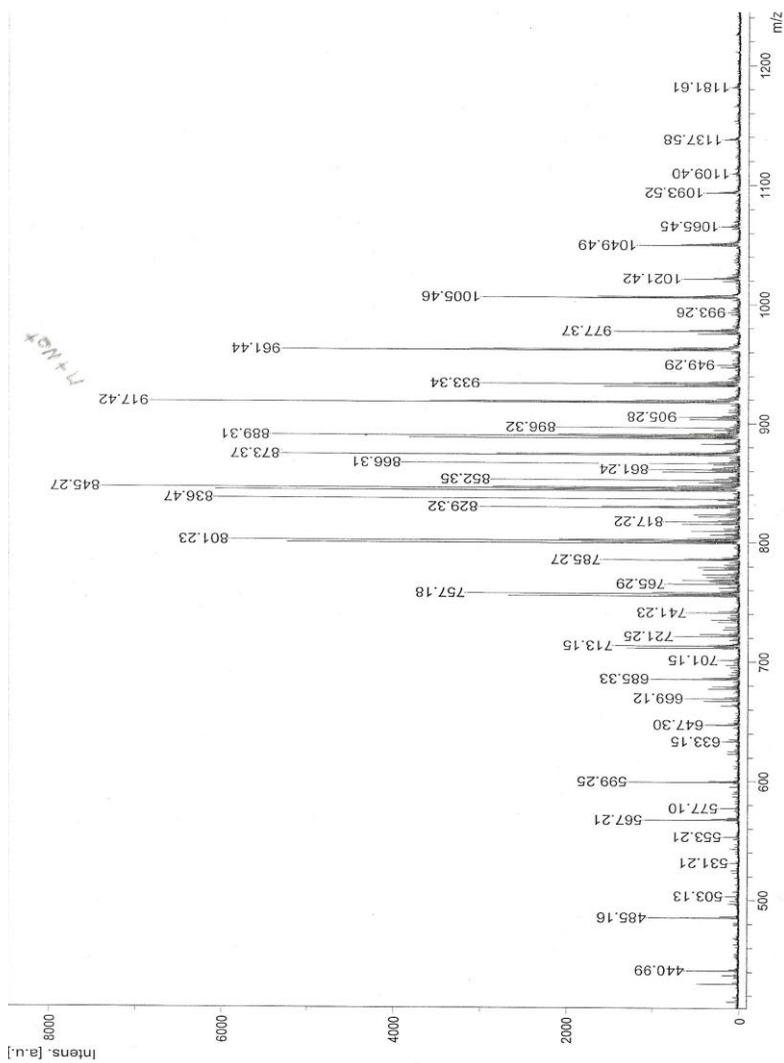
Espectro 31. Espectro de massa ESI do composto 9.



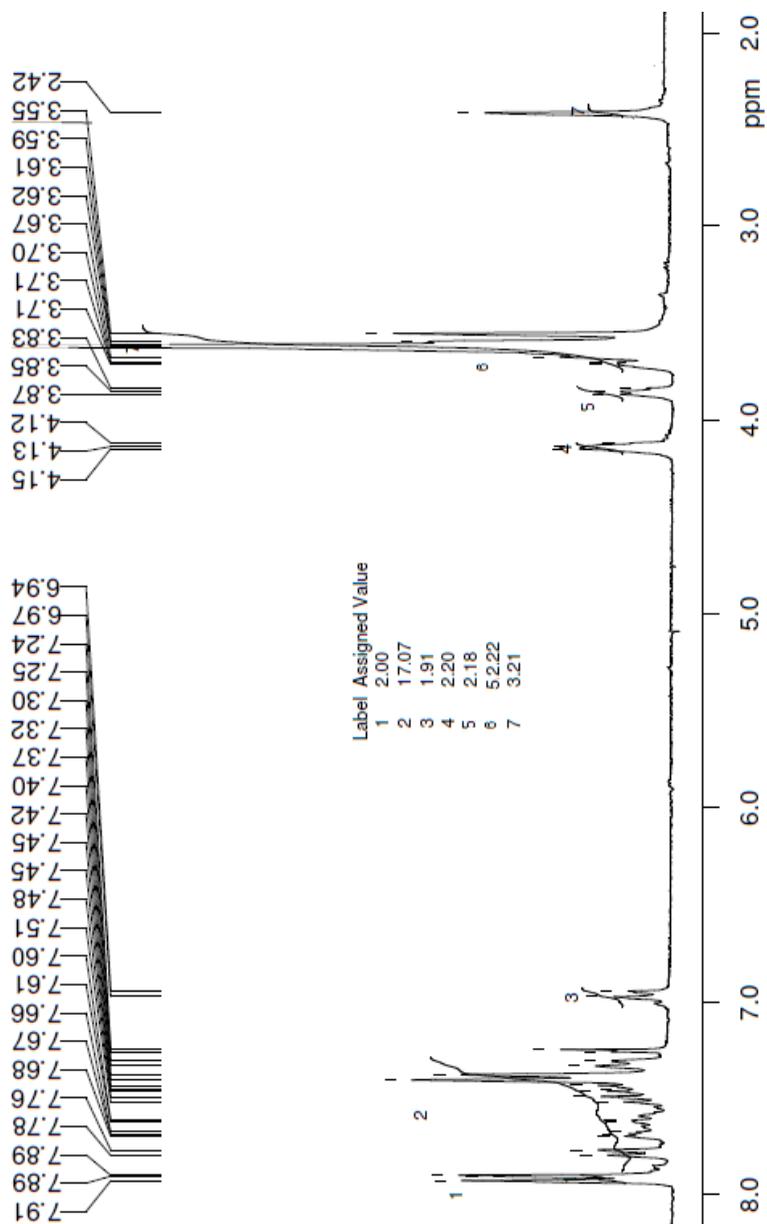
Espectro 32. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 10.



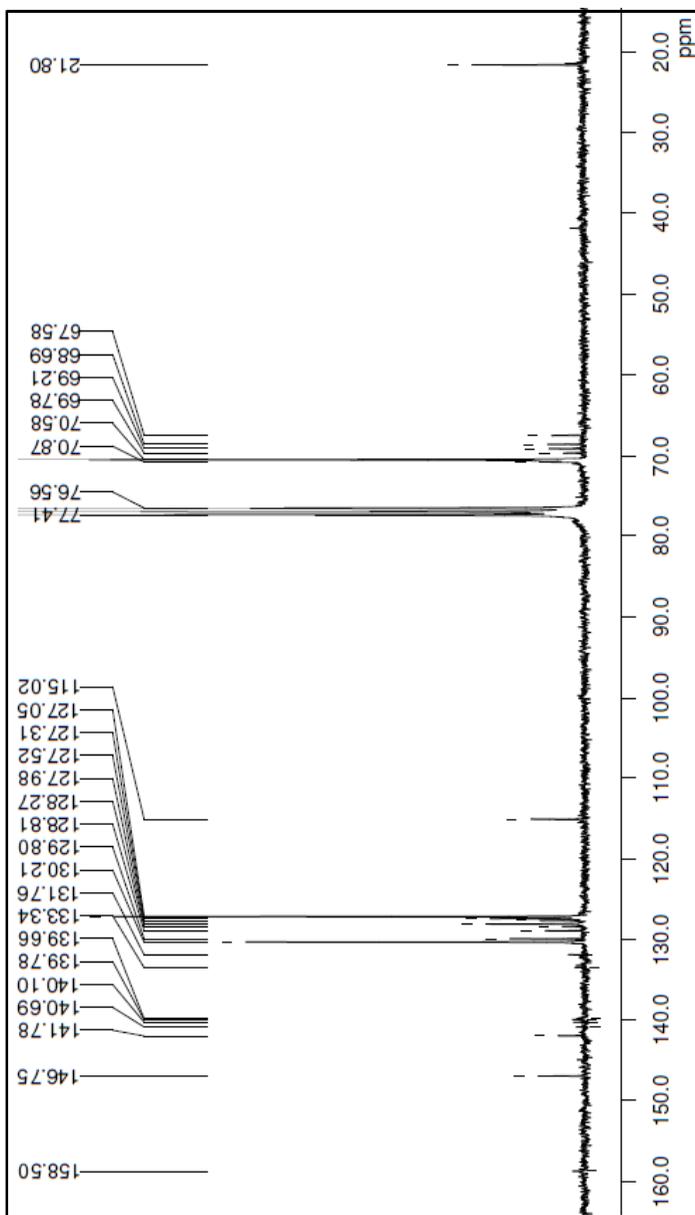
Espectro 33. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 10.



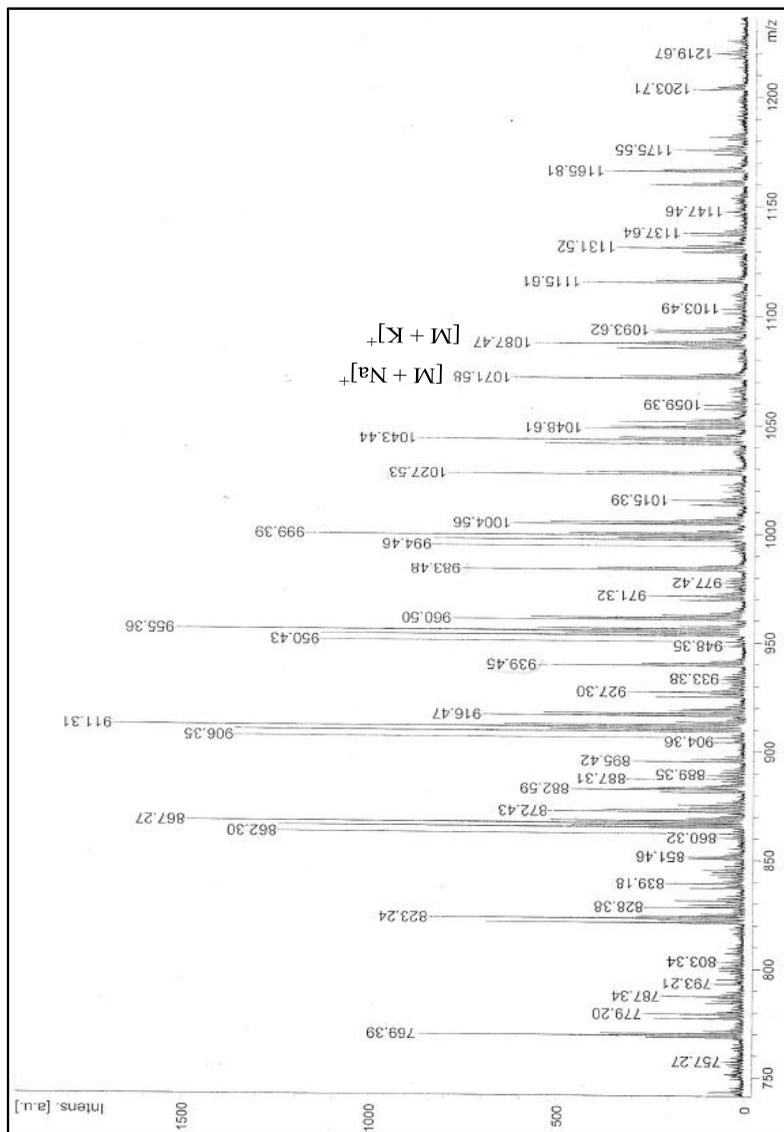
Espectro 34. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 10.



Espectro 35. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do composto 11.

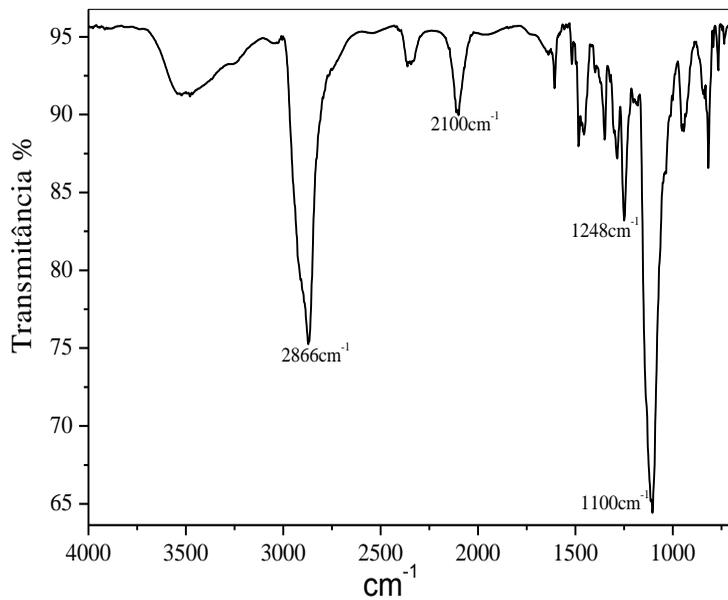


Espectro 36. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 11.

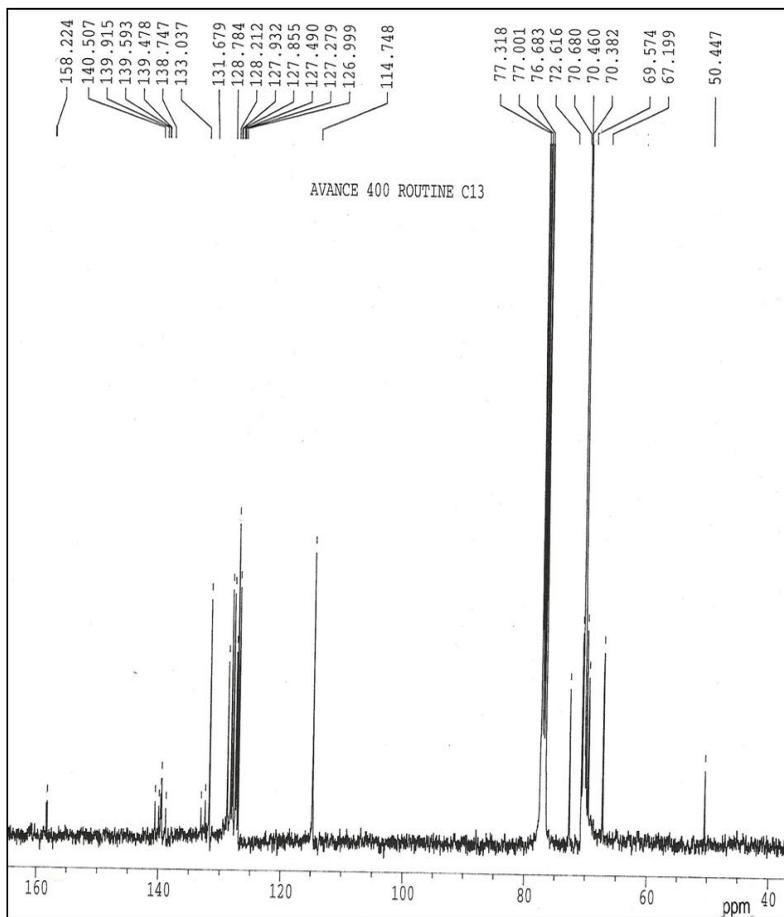


Espectro 37. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 11.

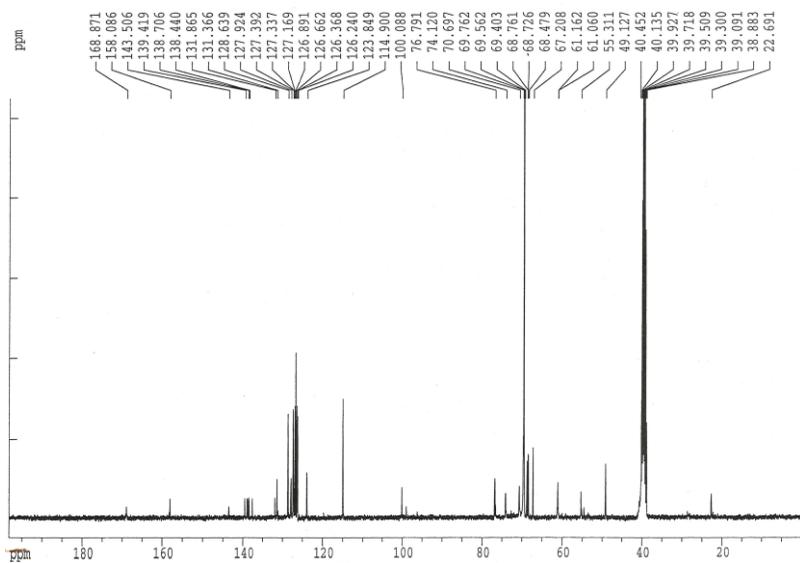




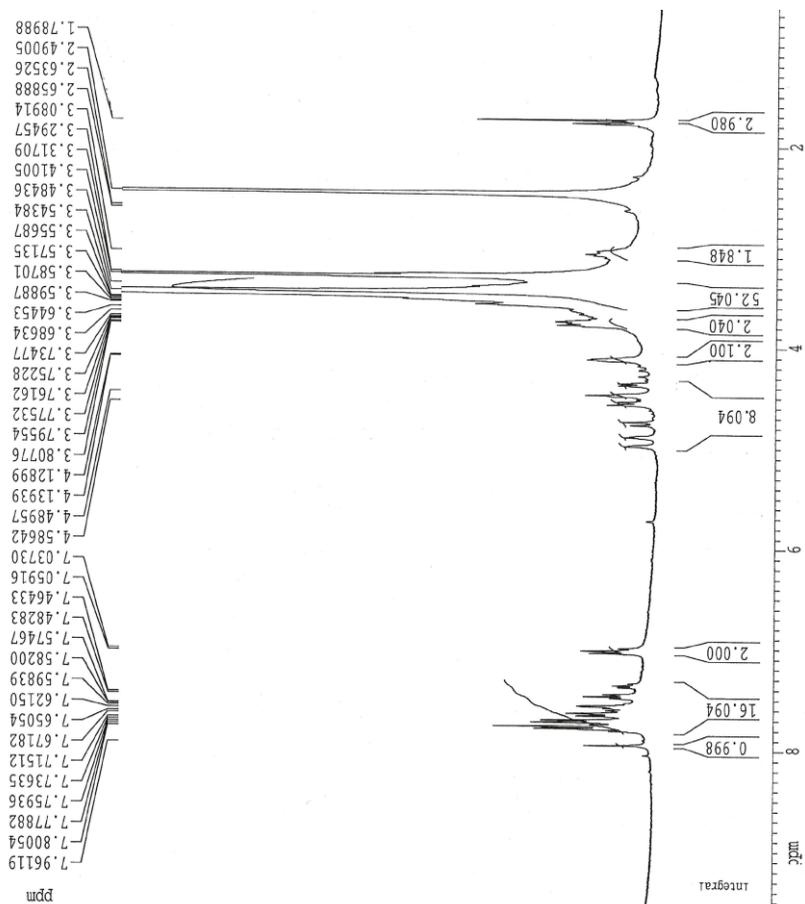
Espectro 39. Espectro de IV (KBr) do composto 12.



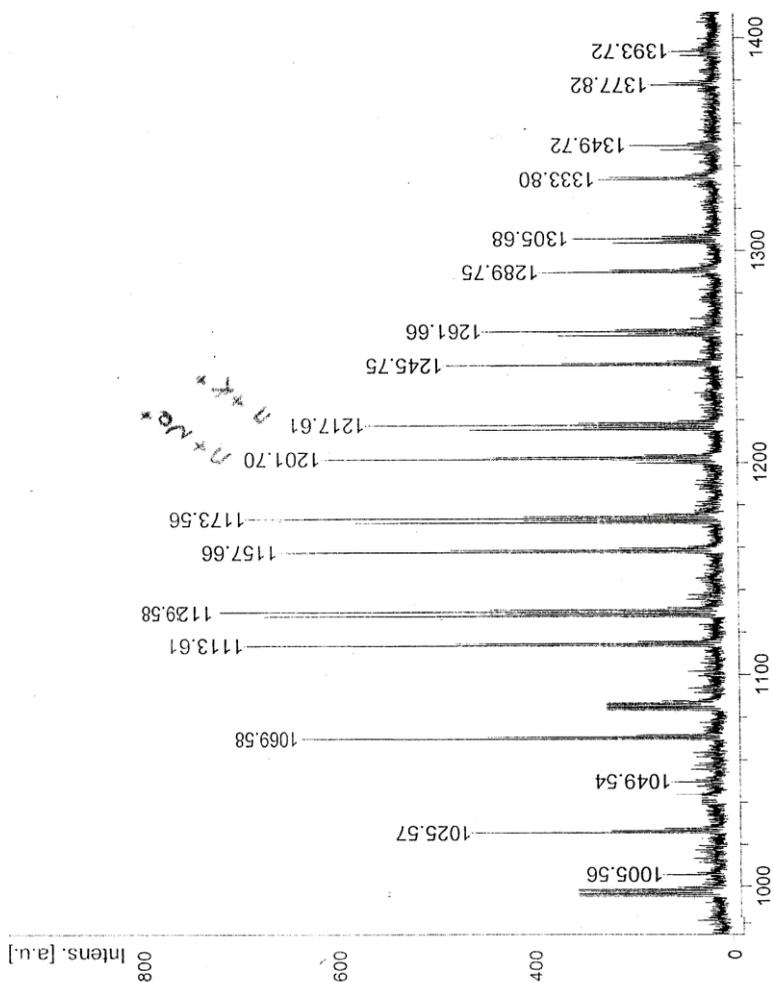
Espectro 40. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) do composto 12.



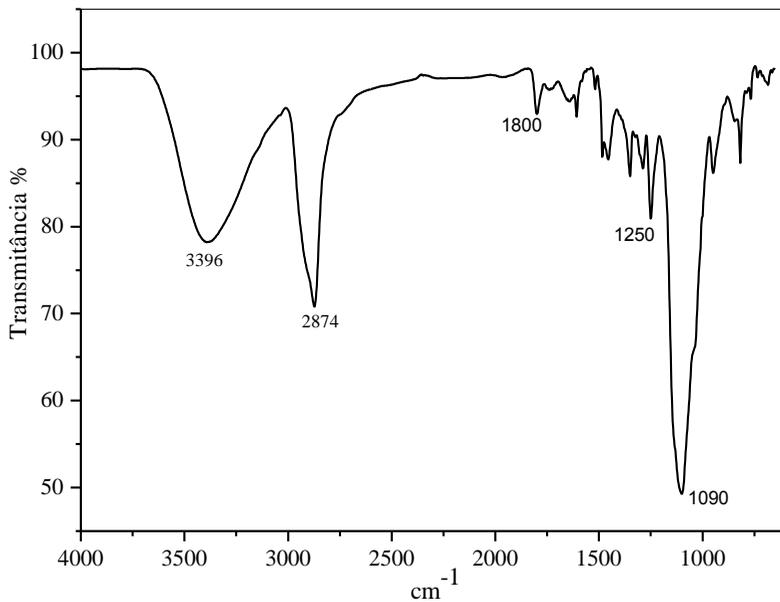
Espectro 41. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) do composto 13.



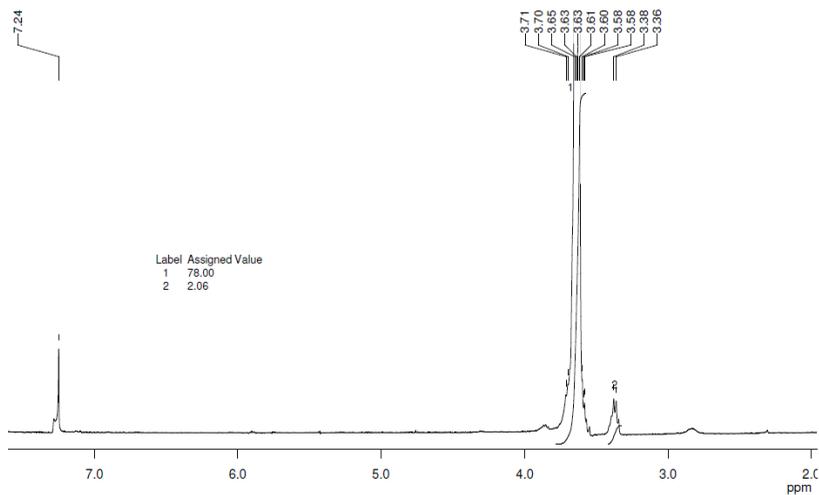
Espectro 42. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) do composto 13.



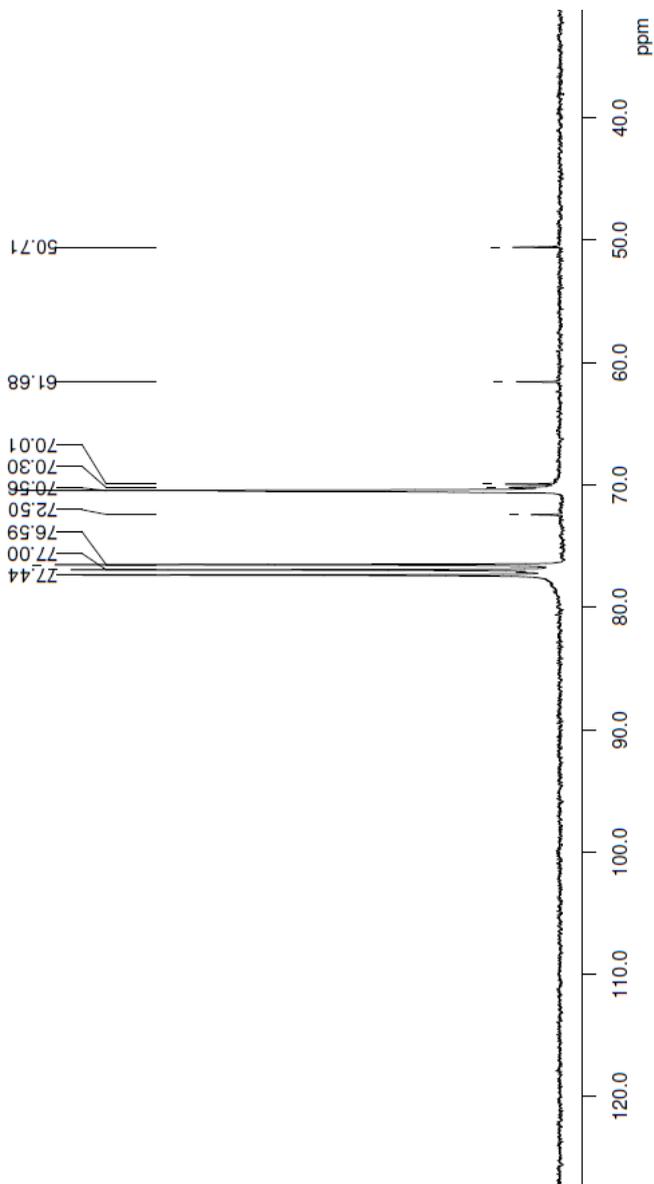
Espectro 43. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 13.



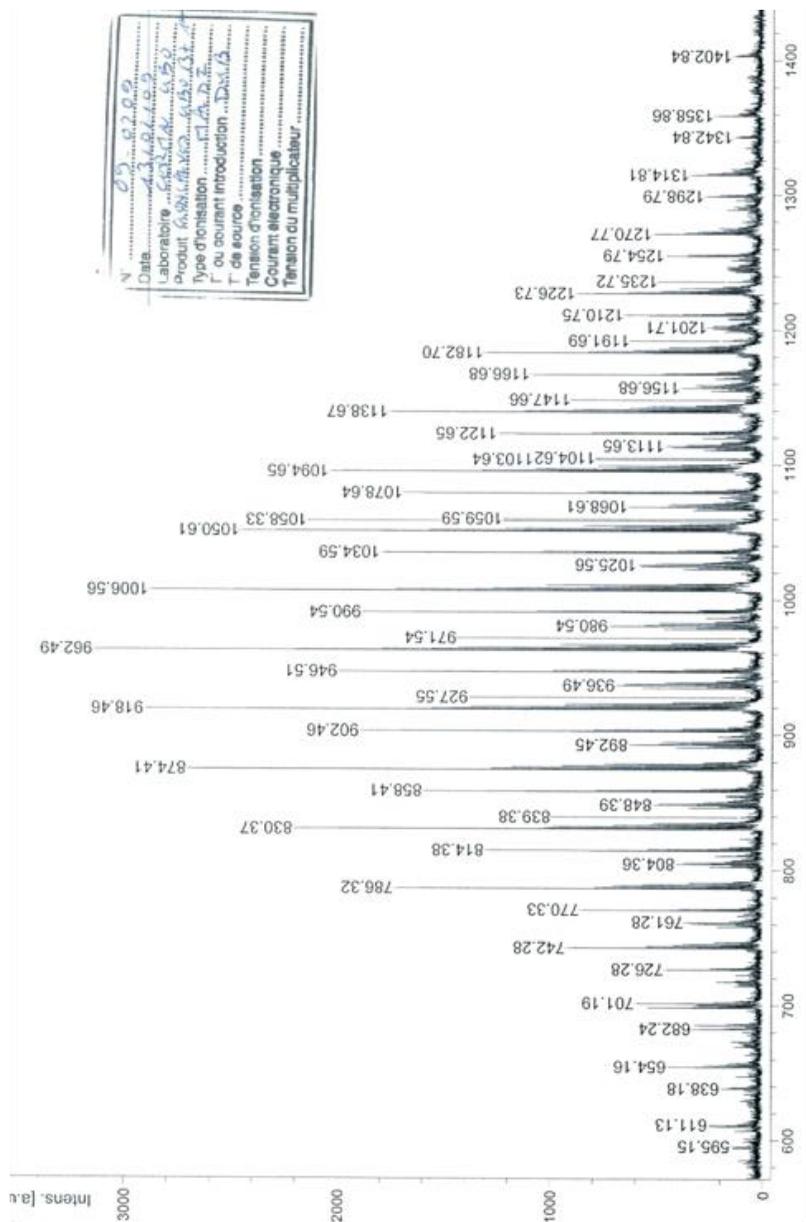
Espectro 44. Espectro de IV (KBr) do composto 13.



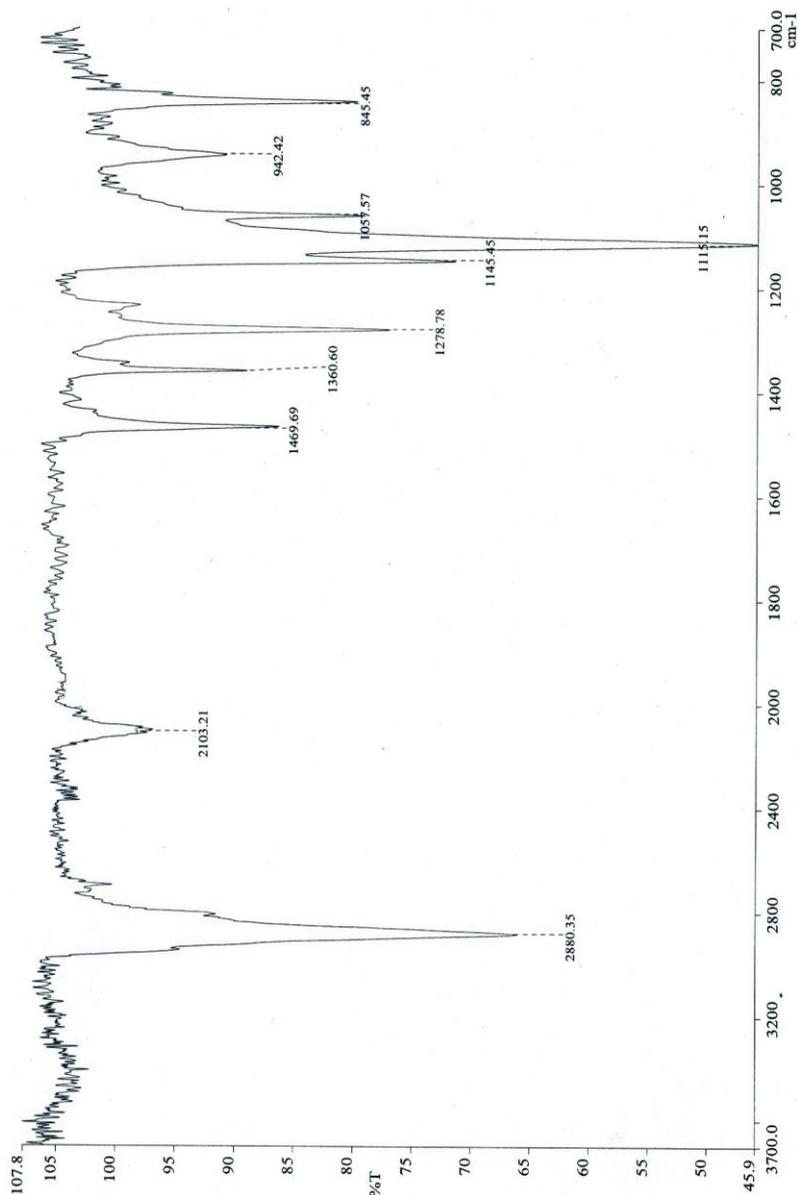
Espectro 45. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do composto 14.



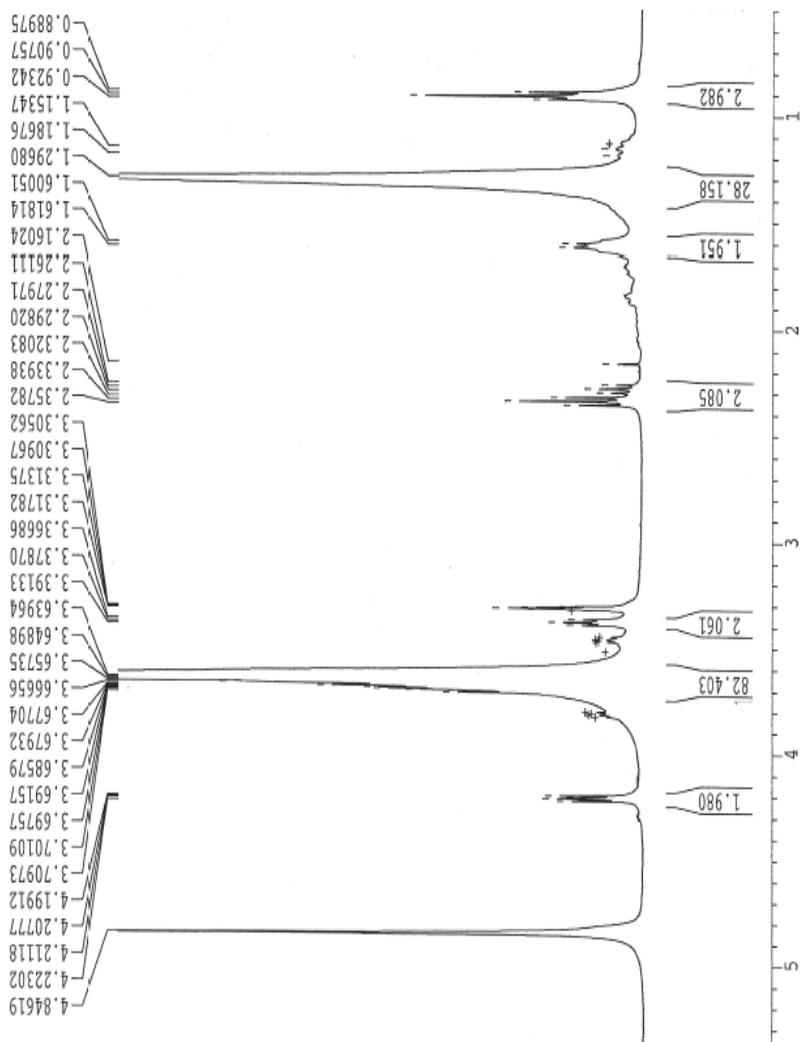
Espectro 46. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 14.



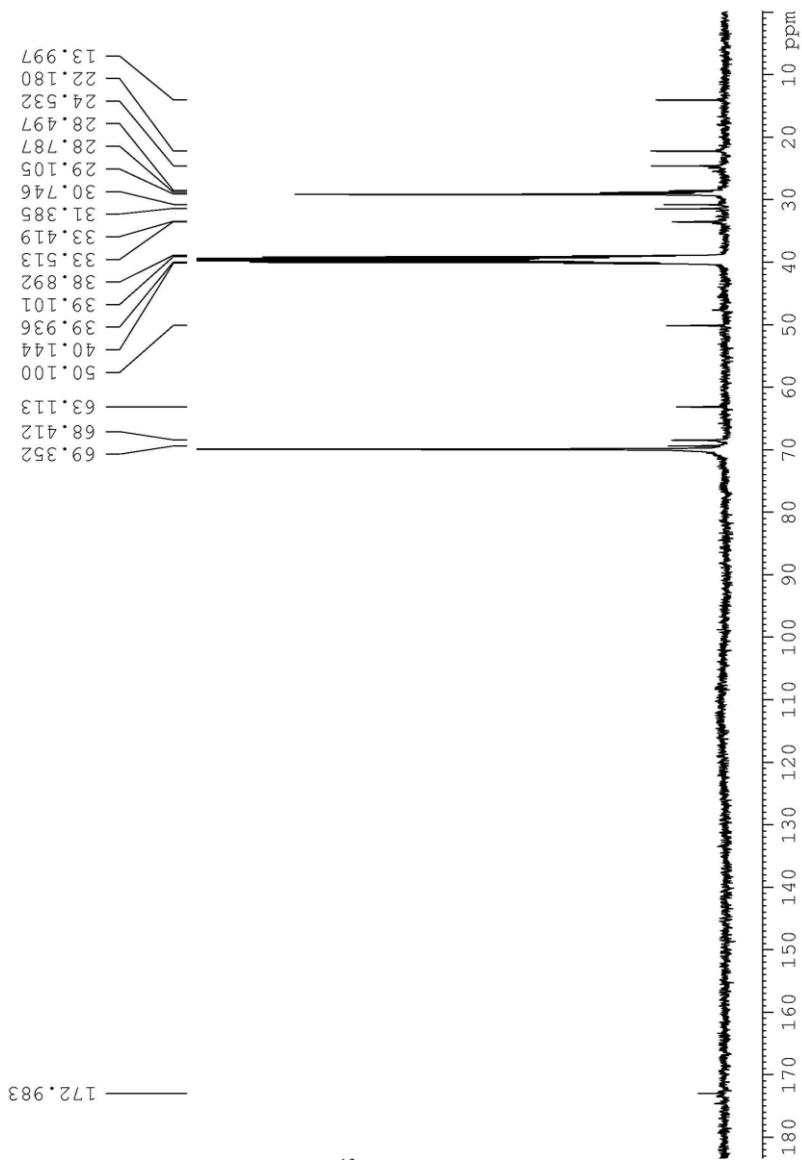
Espectro 47. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 14.



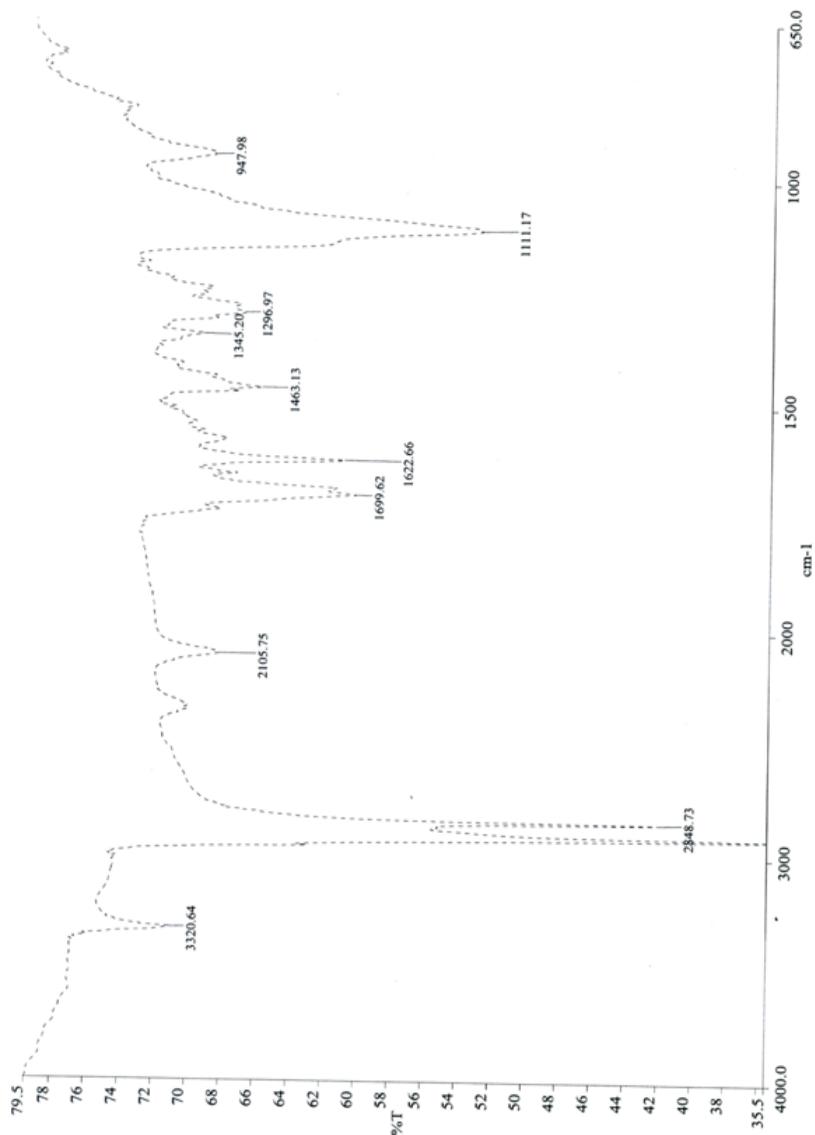
Espectro 48. Espectro de IV (KBr) do composto 14.



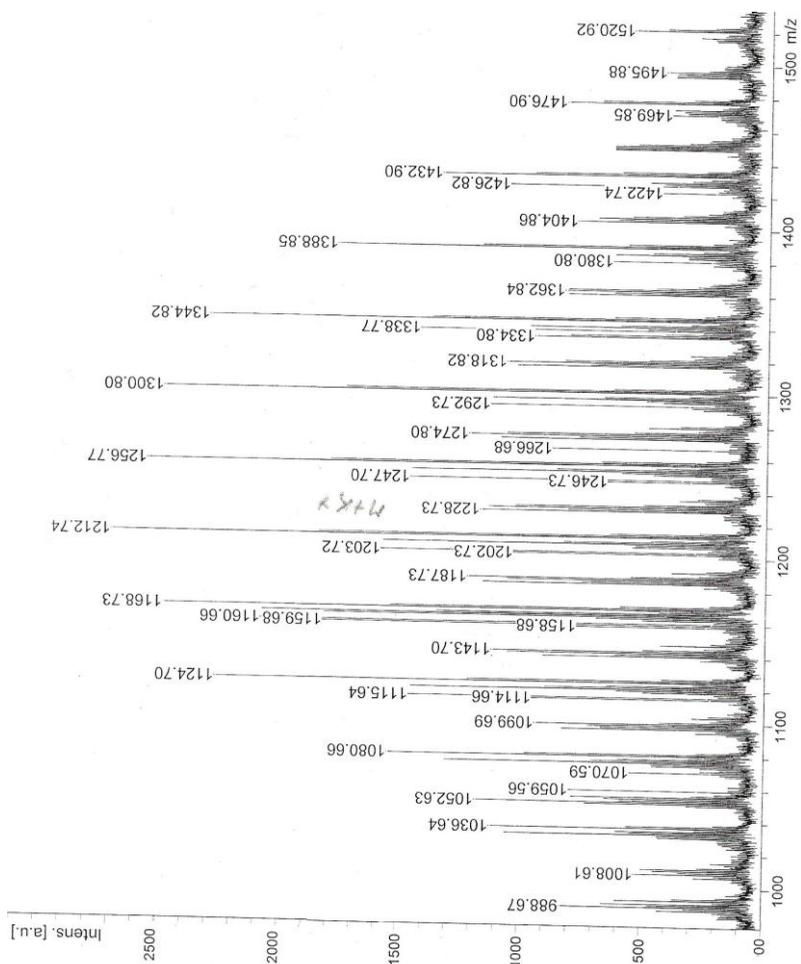
Espectro 49. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MEOD, 400 MHz) do composto 15.



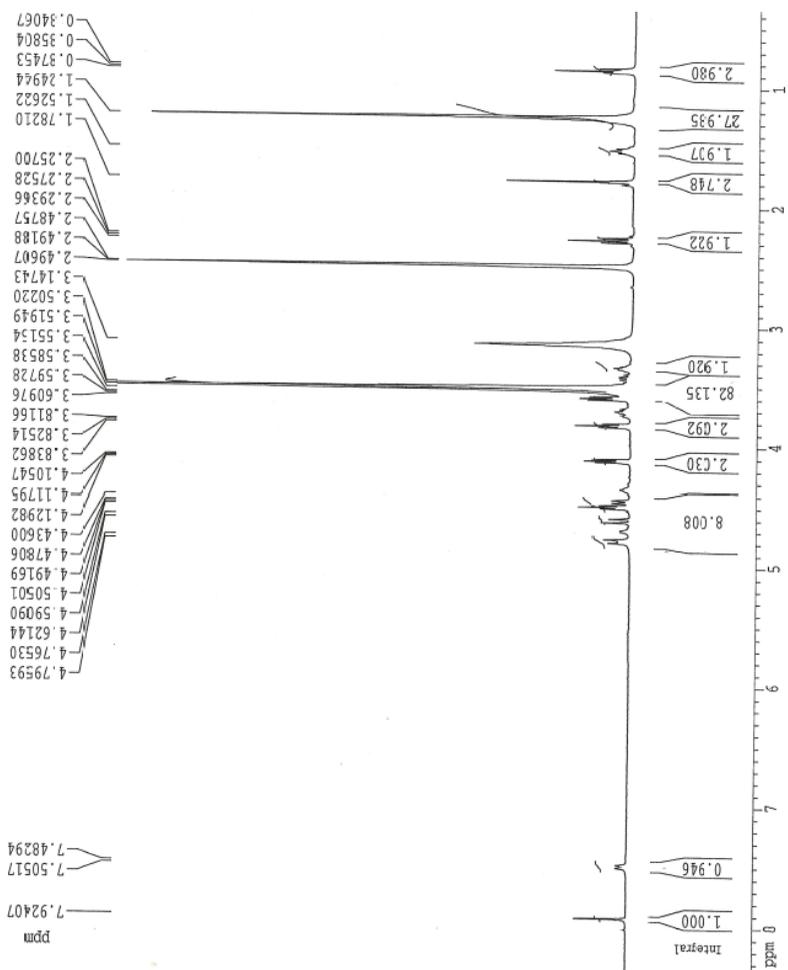
Espectro 50. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (MEOD, 400 MHz) do composto 15.



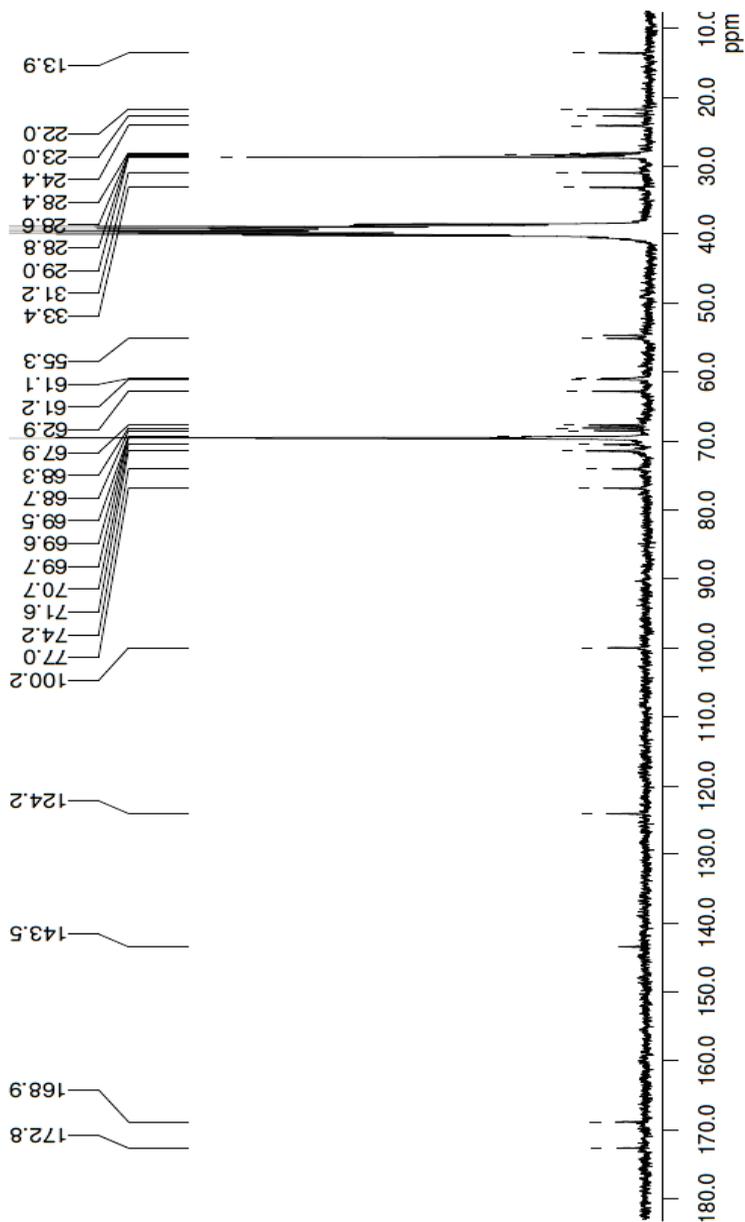
Espectro 51. Espectro de IV (KBr) do composto 15.



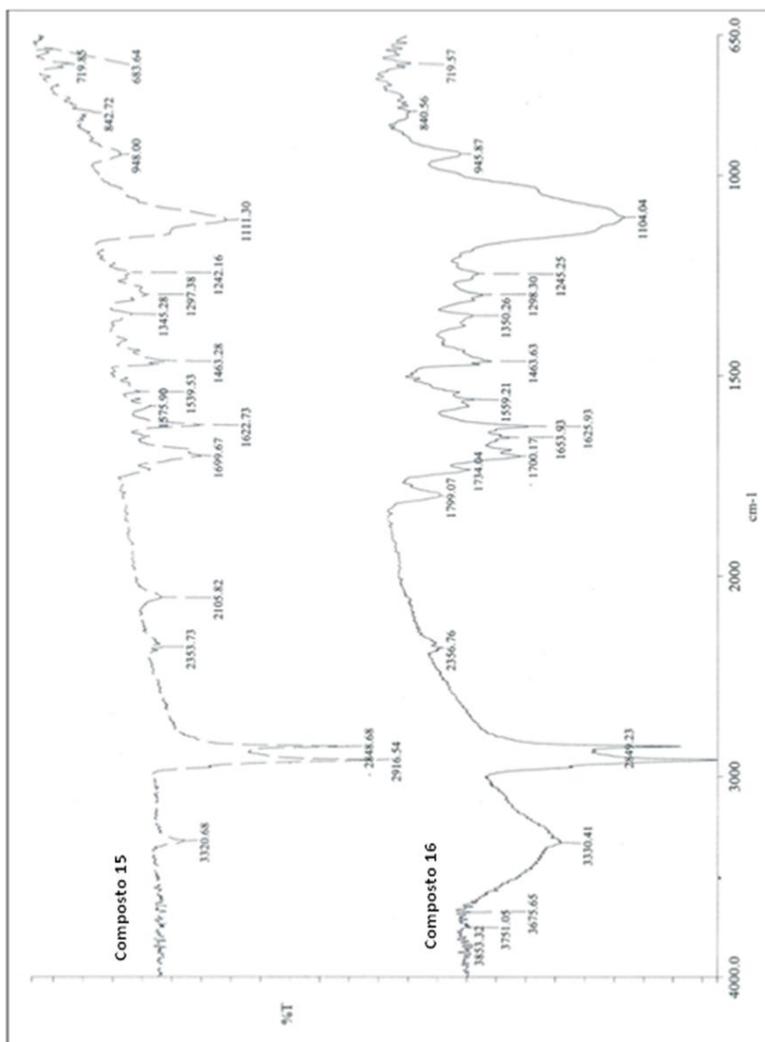
Espectro 52. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 15.



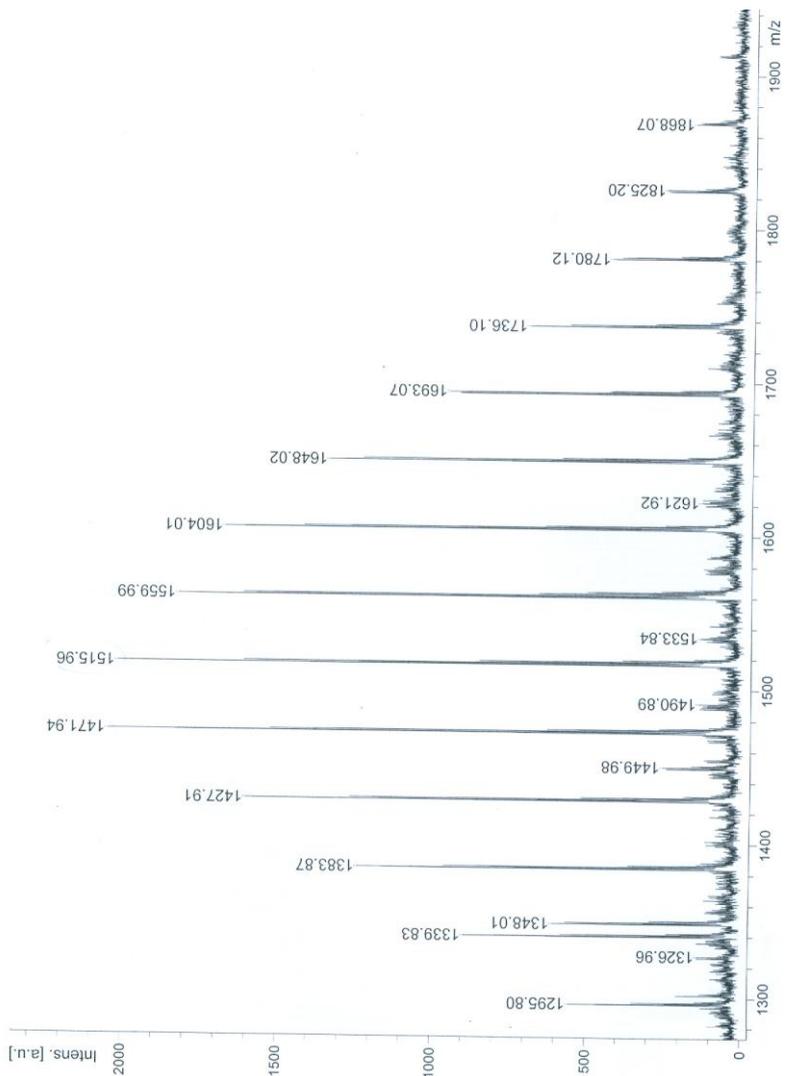
Espectro 53. Espectro de RMN  $^1\text{H}$ (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz) do composto 16.



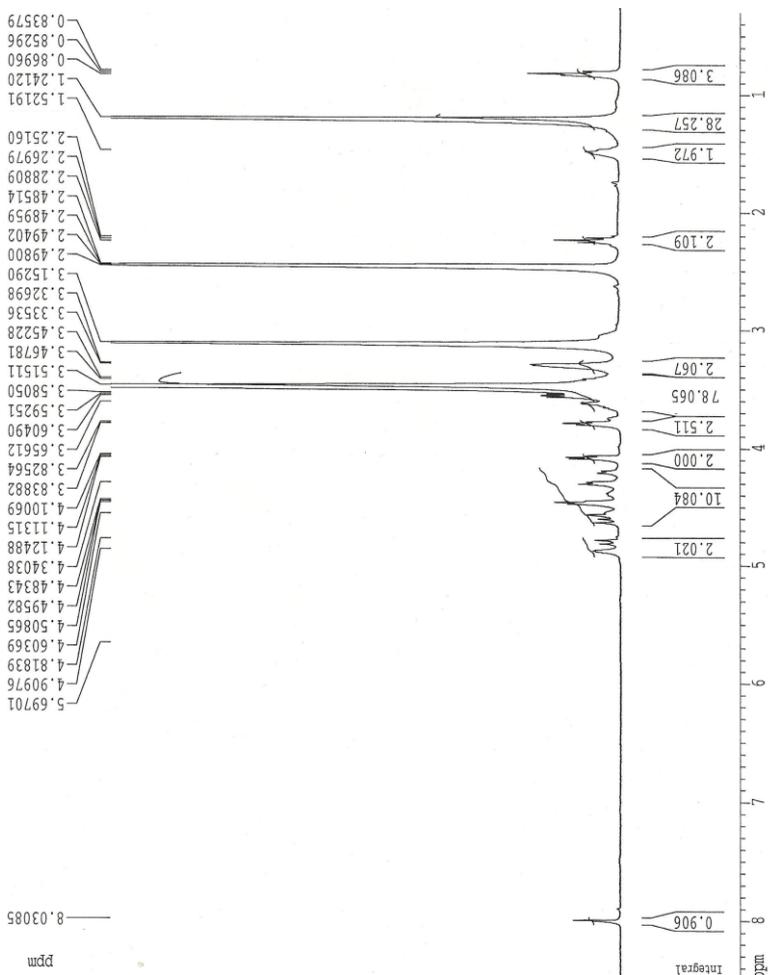
Espectro 54. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz) do composto 16.



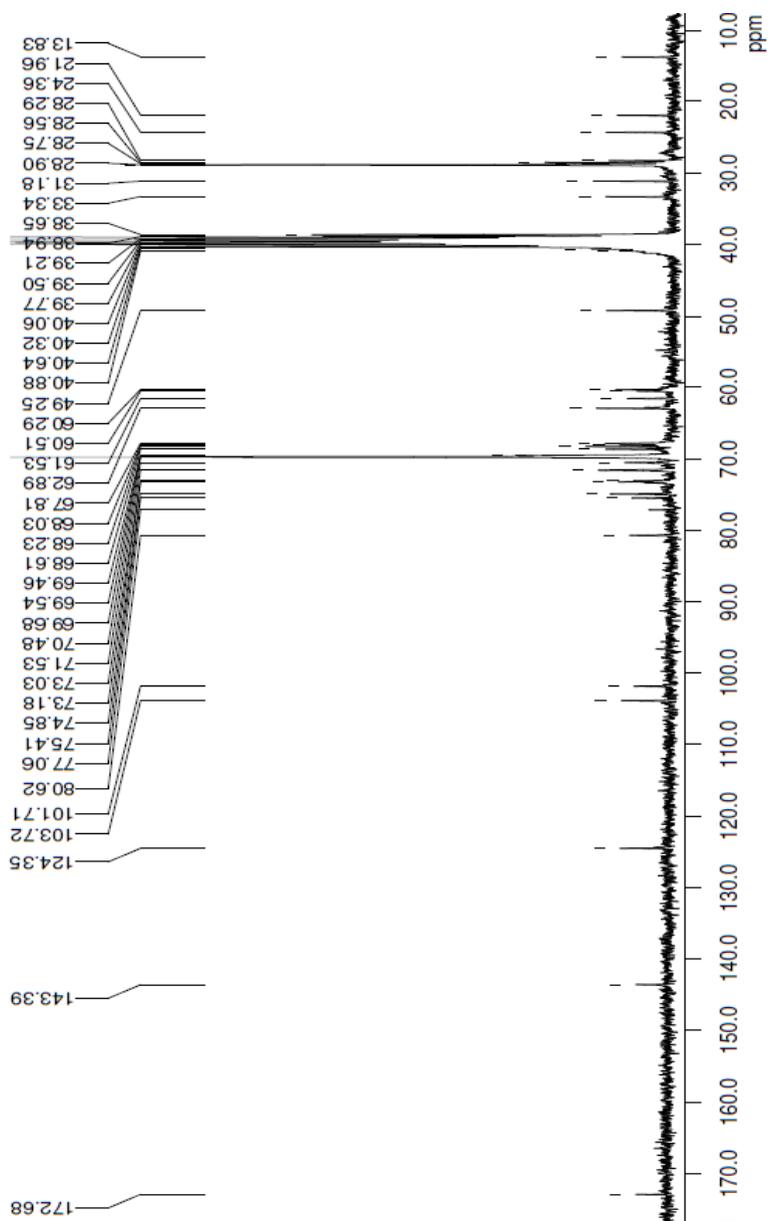
Espectro 55. Espectro de IV (KBr) dos compostos 15 e 16.



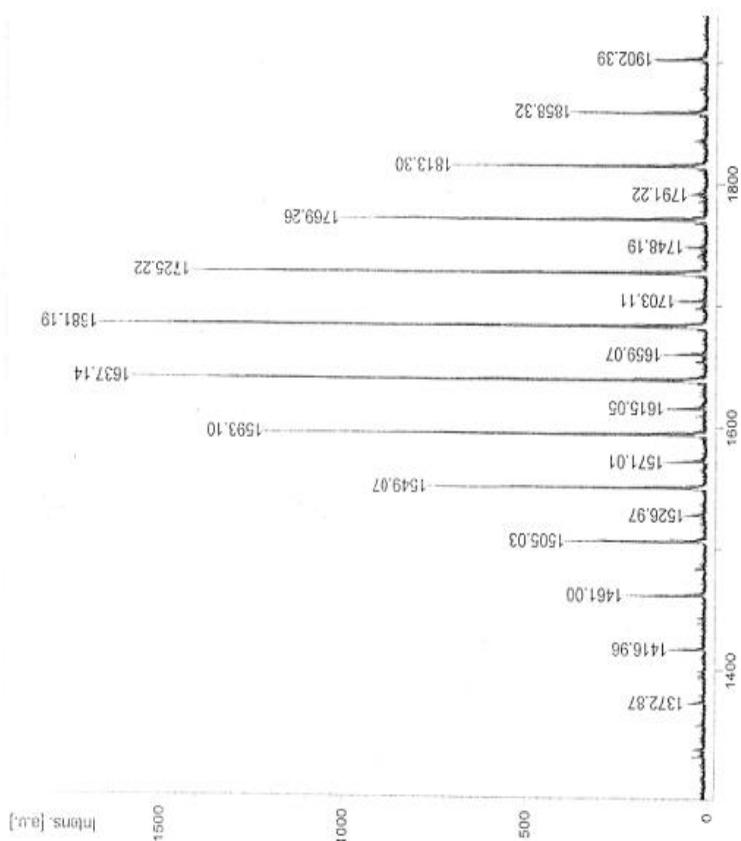
Espectro 56. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 16.



Espectro 57. Espectro de RMN  $^1\text{H}$ (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) do composto 17.



Espectro 58. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ (DMSO-d<sub>6</sub>, 75MHz) do composto 17.



Espectro 59. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 17.

Demande de Résultats

Demande de Résultats

<http://mesures.crimpo.u>

Listing complet	Mini Rapport écrit par l'opérateur de 10	Déconnexion	Votre Compte
-----------------	---	-------------	--------------

Dernière modification : Friday, 17 July 2009, 07H

FORT

AG 1 (14049)

Passage : 15/07/2009  
Source : ESI

Opérateur : Philippe JÉHAN

Structure non affichée

Composé principal

[M +Na]<sup>+</sup>  
(C<sub>75</sub>H<sub>143</sub>N<sub>3</sub>O<sub>33</sub>Na)[M +K]<sup>+</sup>  
(C<sub>75</sub>H<sub>143</sub>N<sub>3</sub>O<sub>33</sub>K)

Masse Théorique : 1636.95016

z = 1 (ou &gt; 3)

m/z Théorique : 1636.95016

m/z Trouvé : 1636.9507 (0 ppm)

Masse Théorique : 1652.92409

z = 1 (ou &gt; 3)

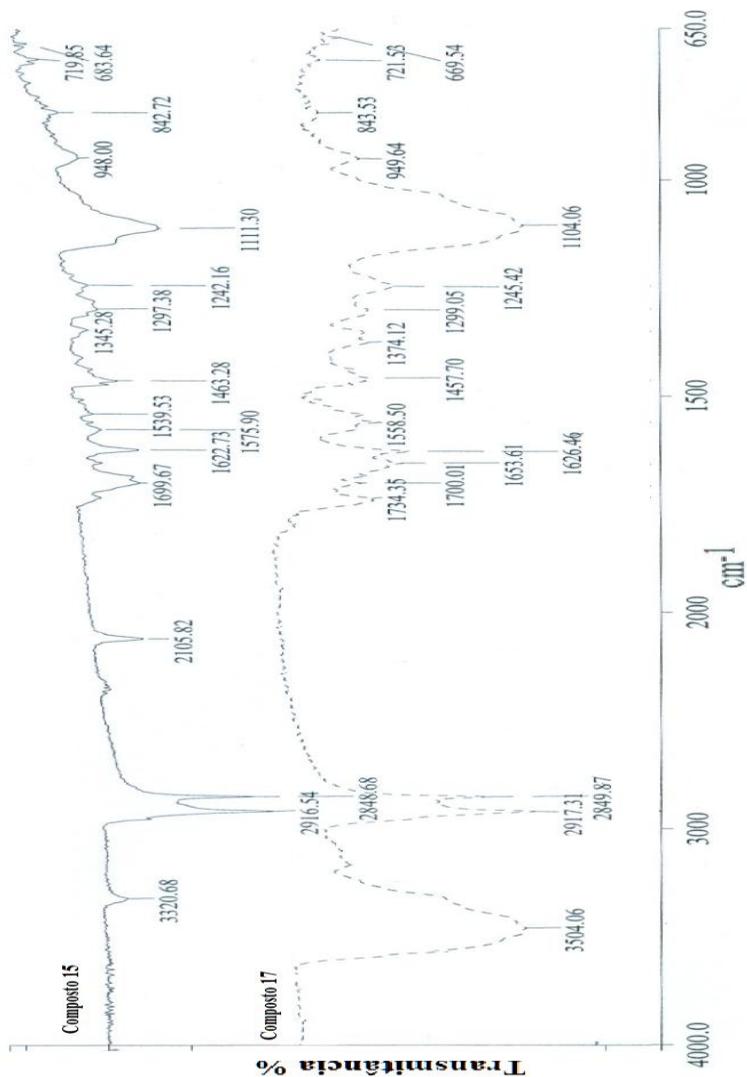
m/z Théorique : 1652.92409

m/z Trouvé : 1652.9298 (4 ppm)

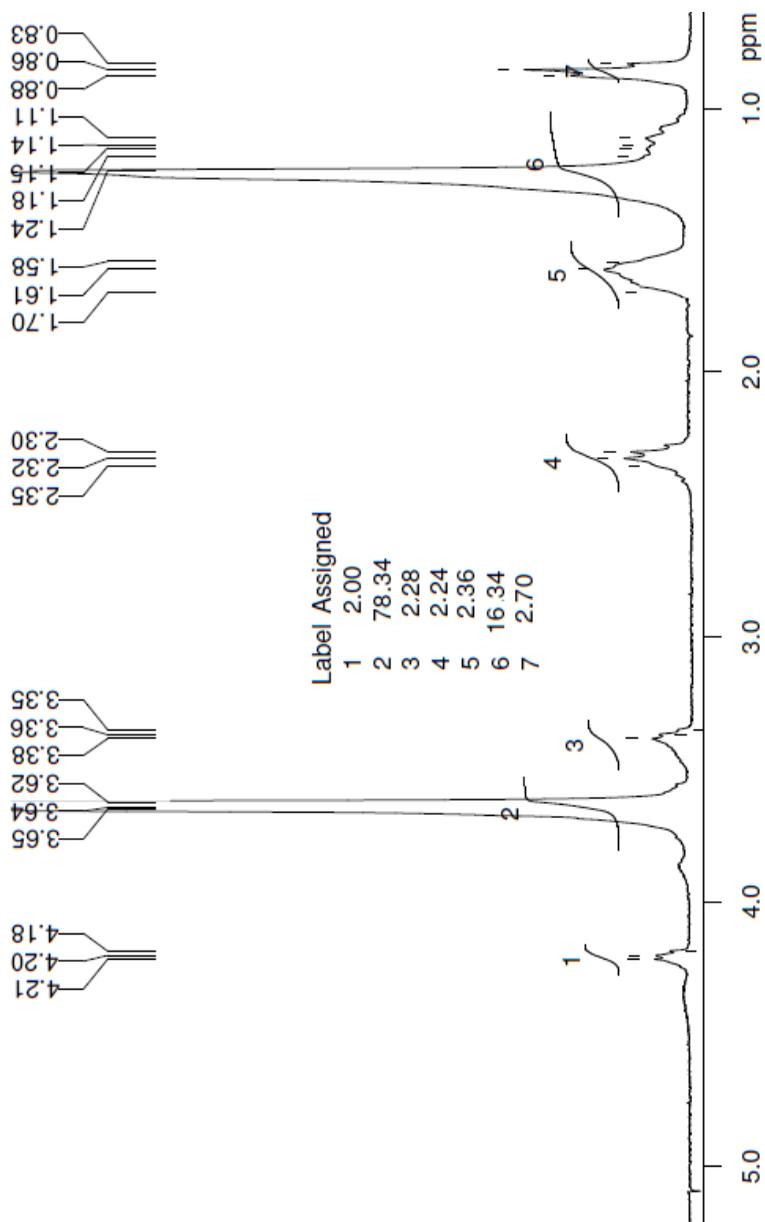
[Retour au tableau global des résultats](#)

Les résultats sont sous réserve de vérification par Philippe JÉHAN responsable du service de spectrométrie de masse.

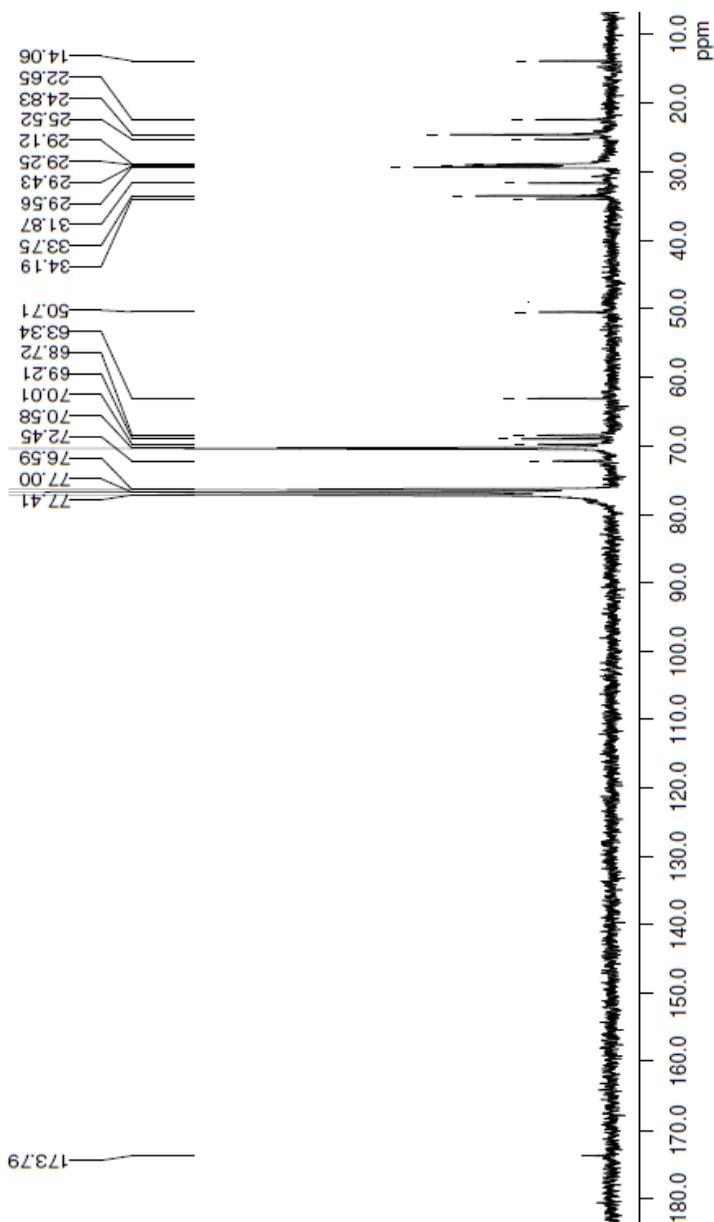
Espectro 60. Resultado da análise da espectometria de massas de alta resolução do composto 17.



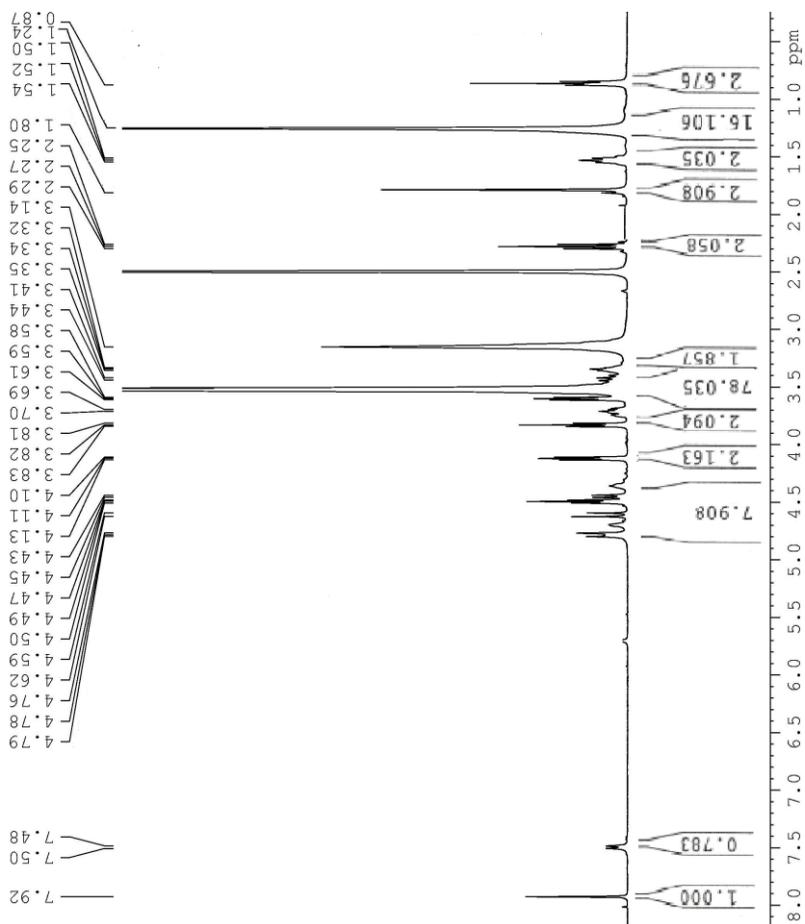
Espectro 61. Espectro de IV (KBr) do composto 15 antes da *click chemistry* e do composto 17 depois da reação de *click chemistry*.



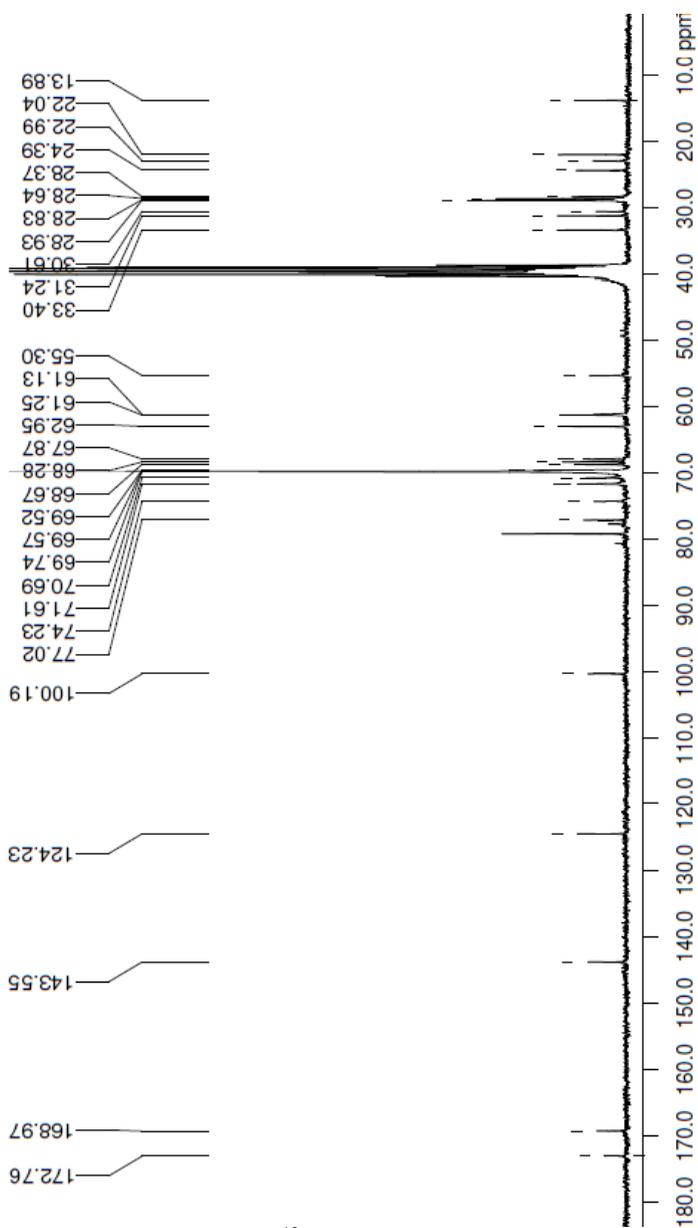
Espectro 62. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do composto 18.



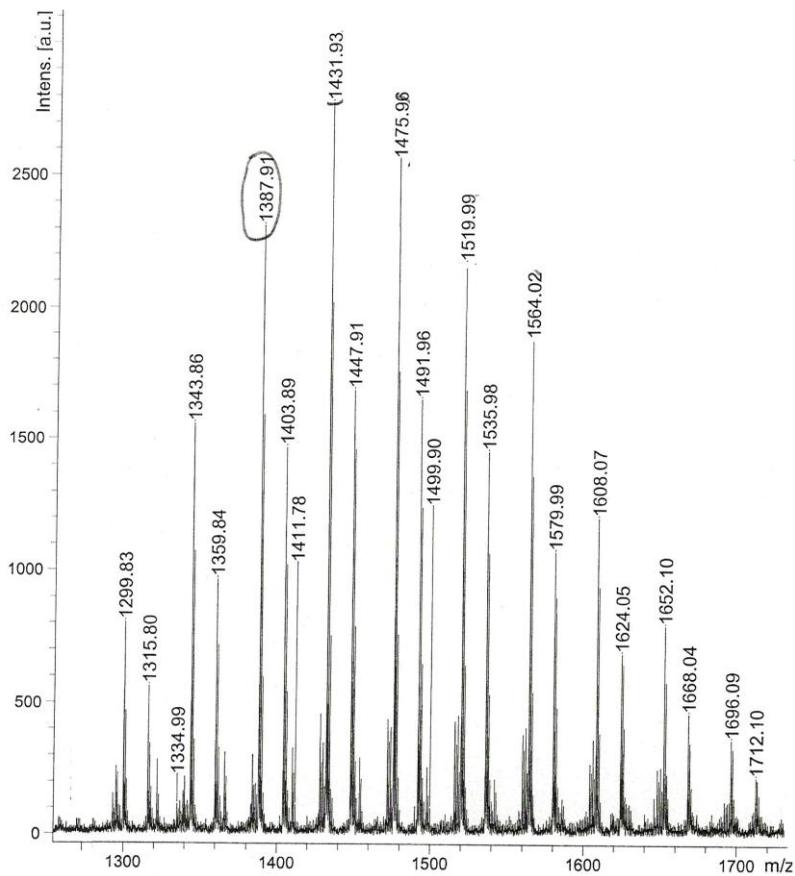
Espectro 63. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 18.



Espectro 64. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100MHz) do composto 19.

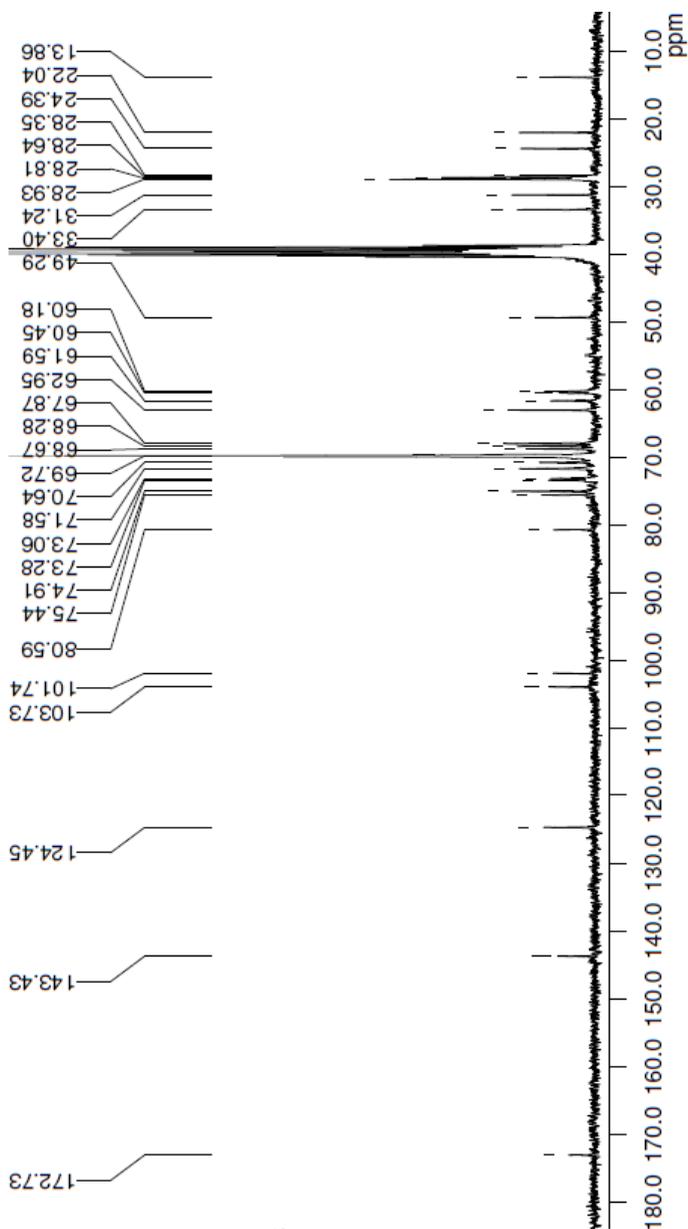


Espectro 65. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 75MHz) do composto 19.

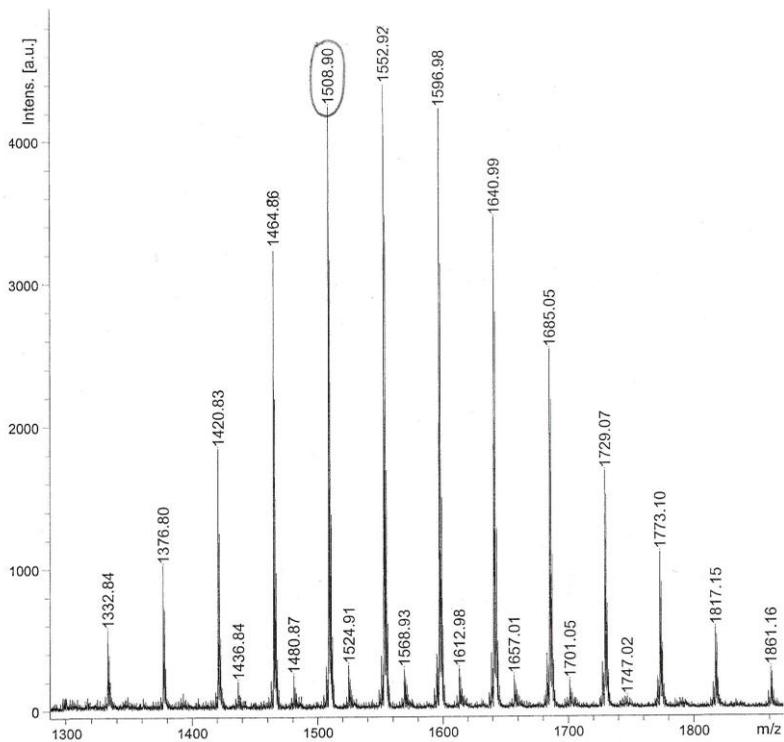


Espectro 66. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 19.

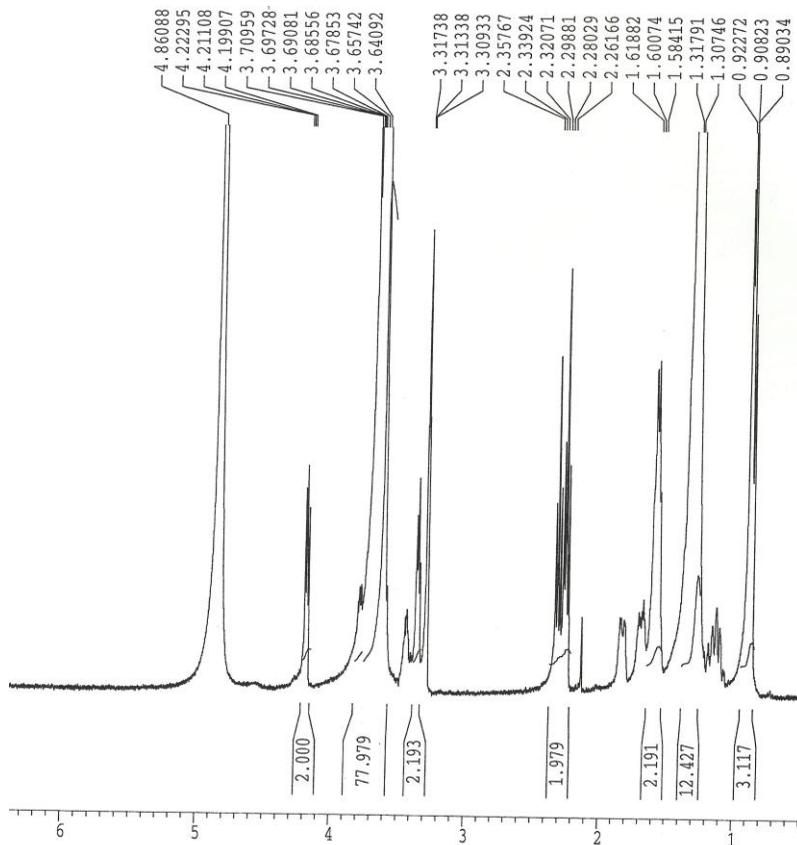




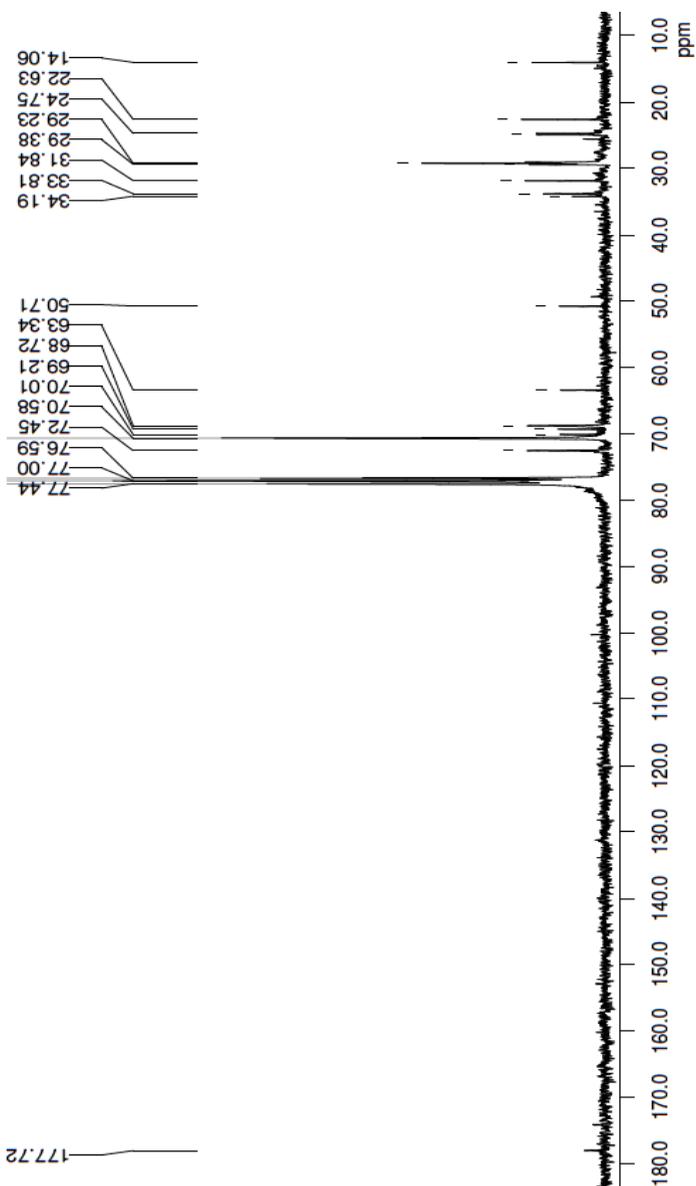
Espectro 68. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 75MHz) do composto 20.



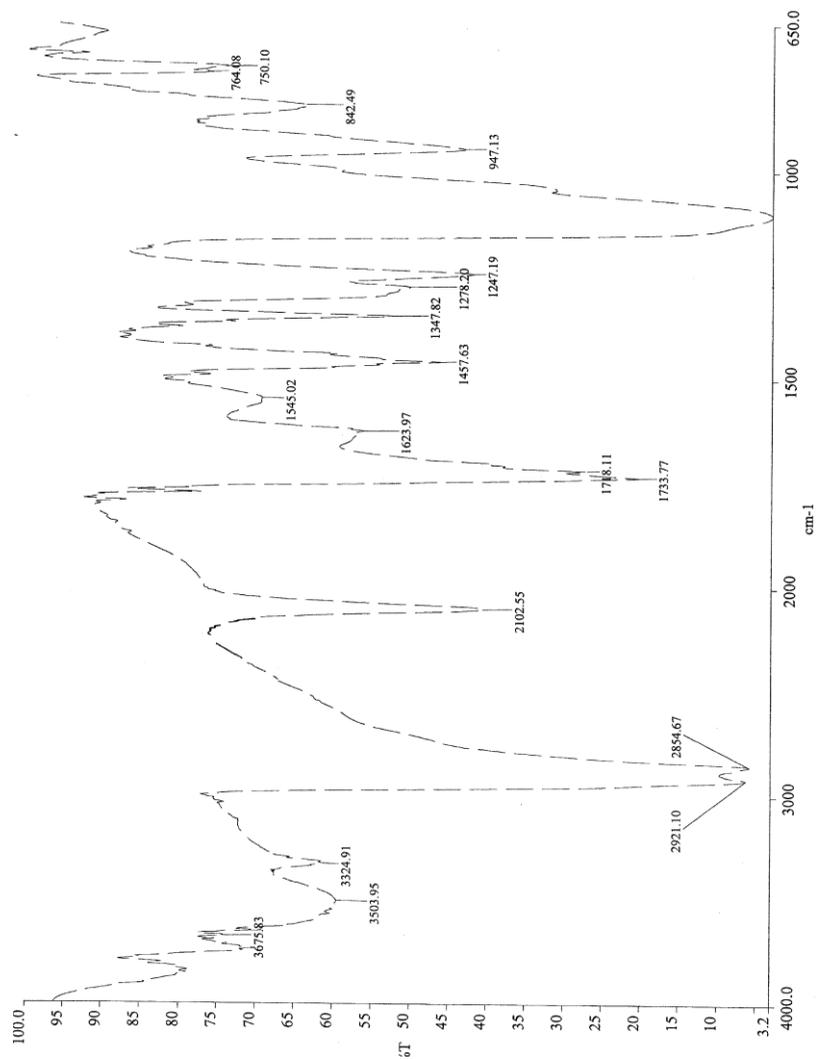
Espectro 69. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 20.



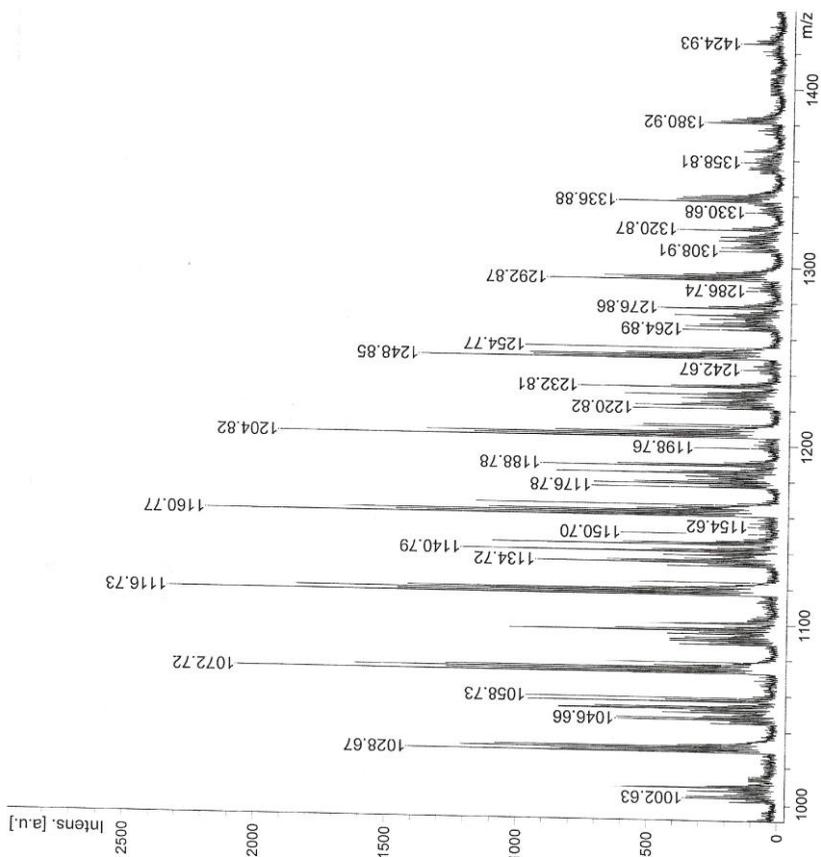
Espectro 70. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MEOD, 400MHz) do composto 21.



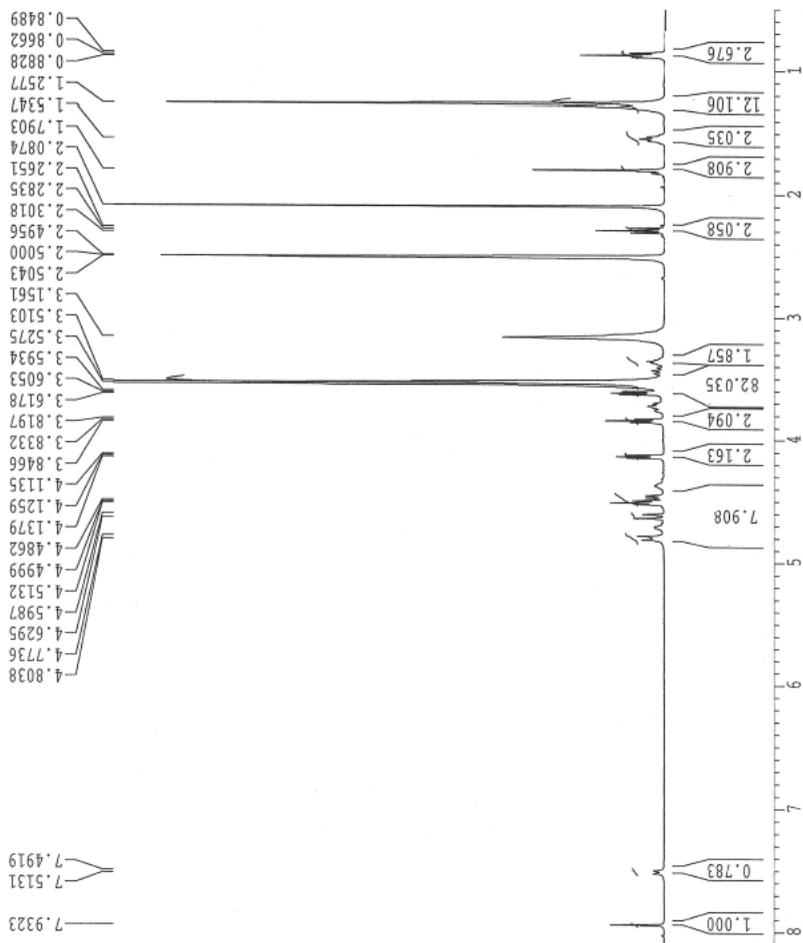
Espectro 71. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) do composto 21.



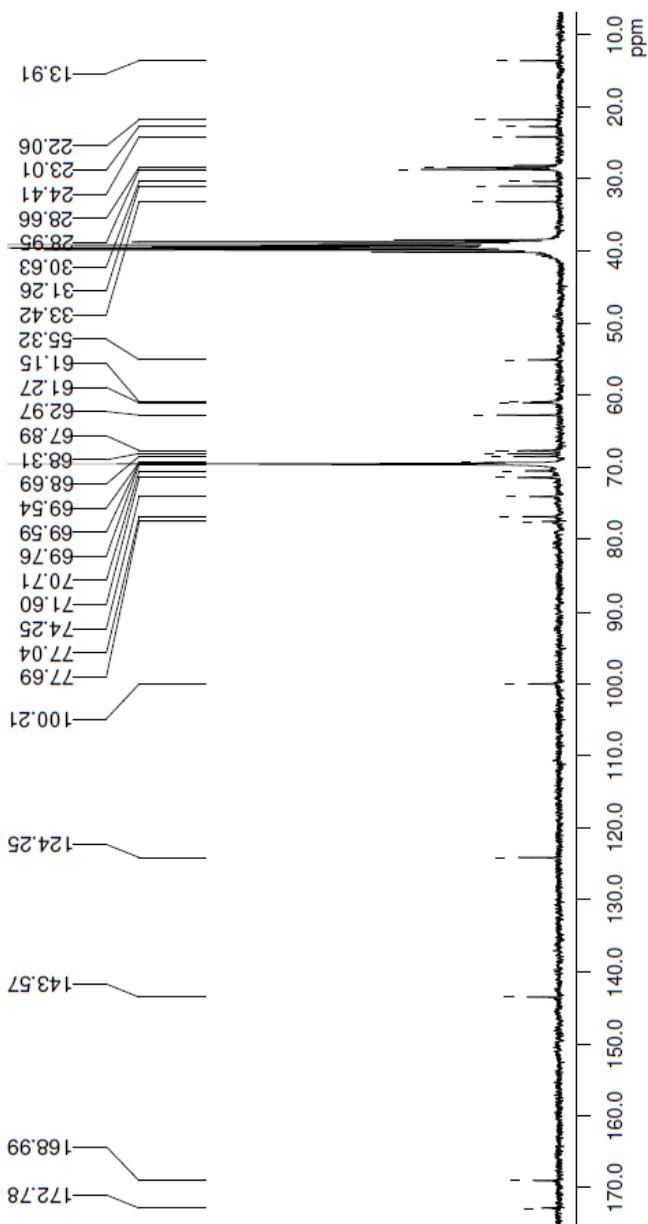
Espectro 72. Espectro de IV (KBr) do composto 21.



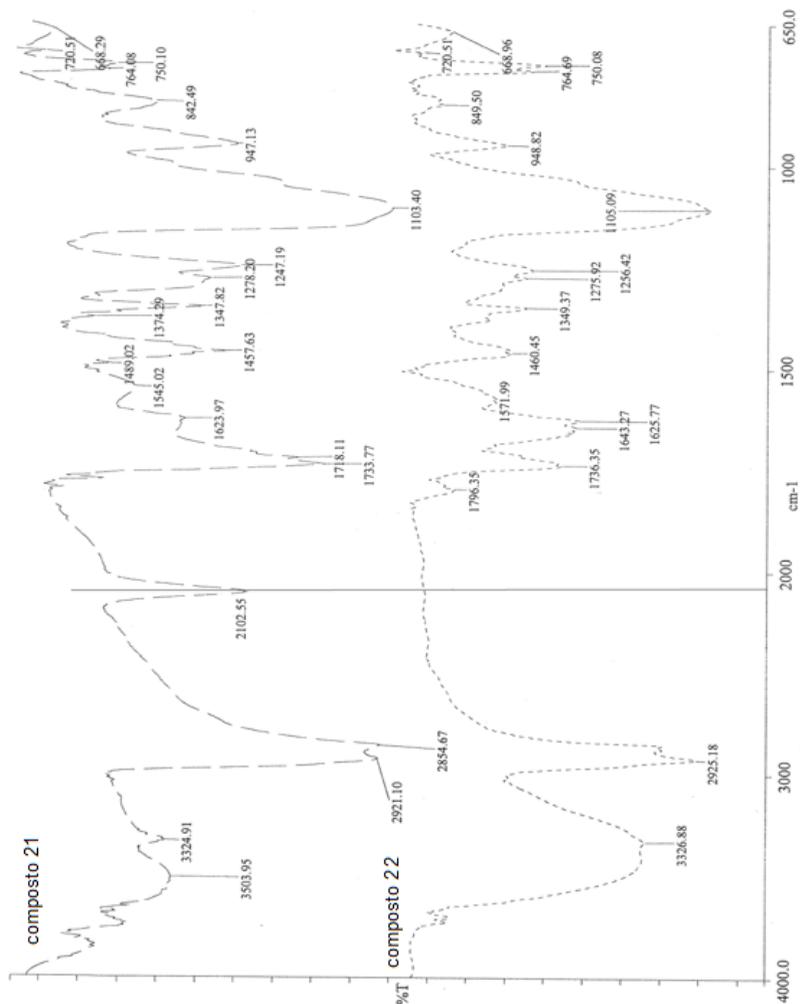
Espectro 73. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 21.



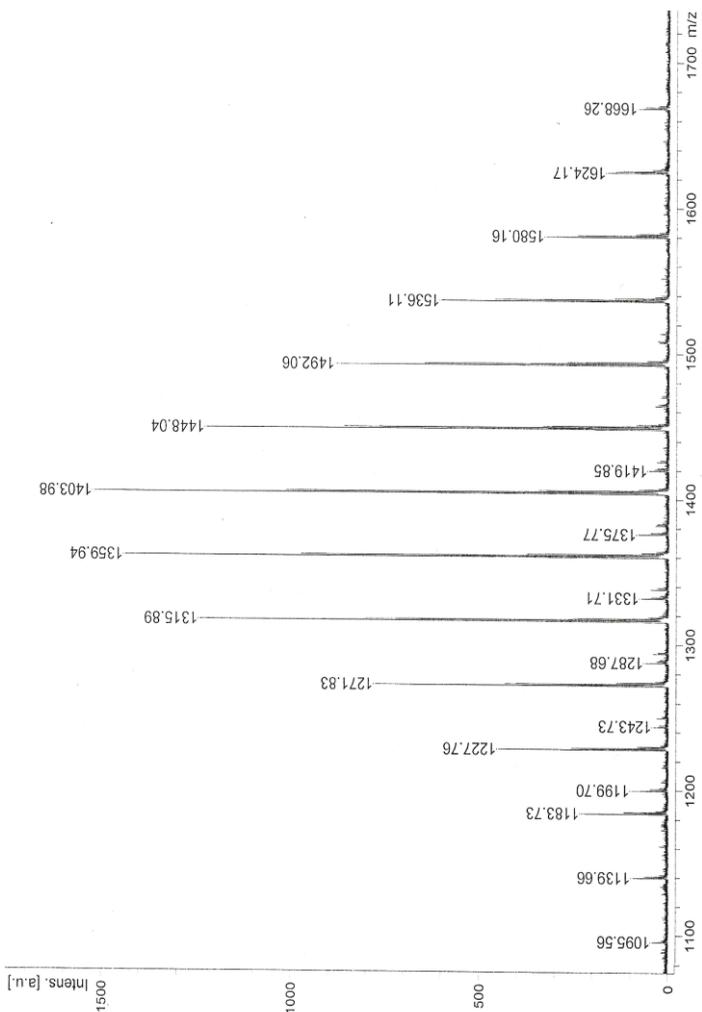
Espectro74. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO-d6, 400MHz) do composto 22.



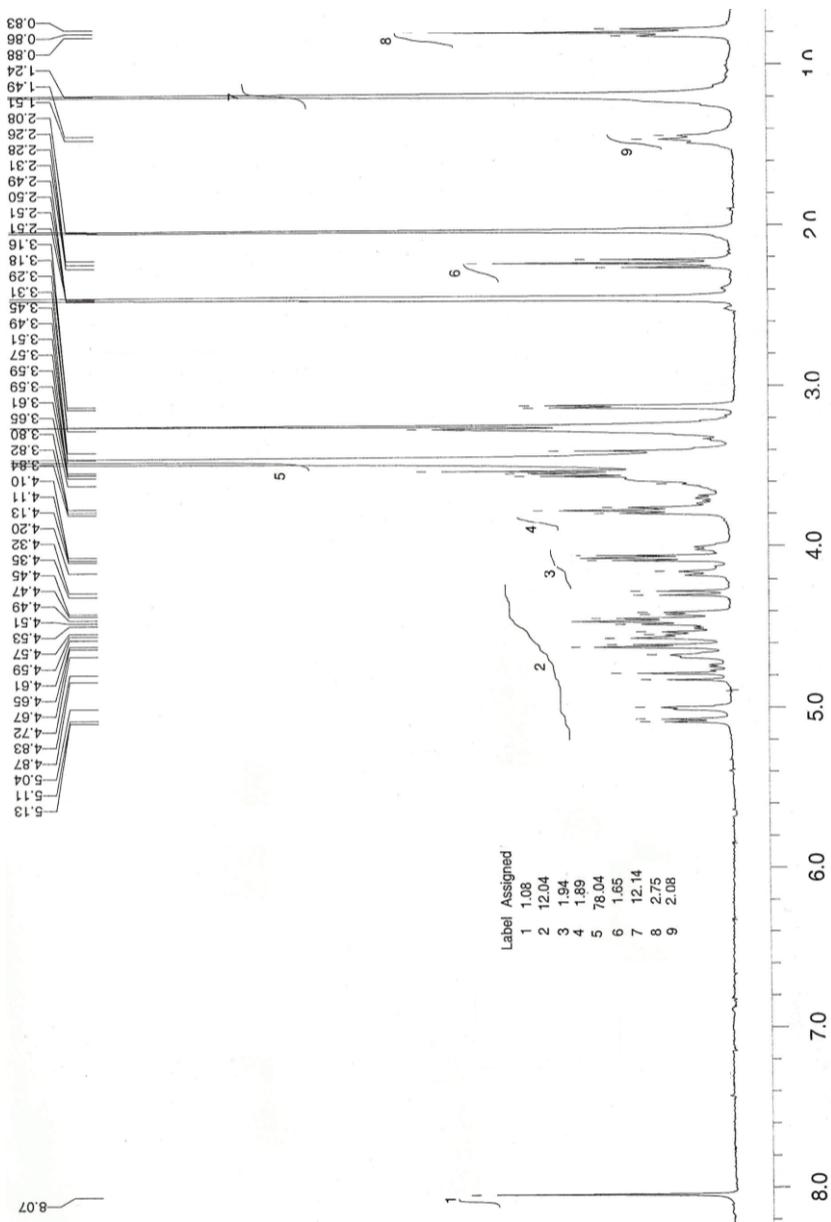
Espectro 75. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75MHz) do composto 22.



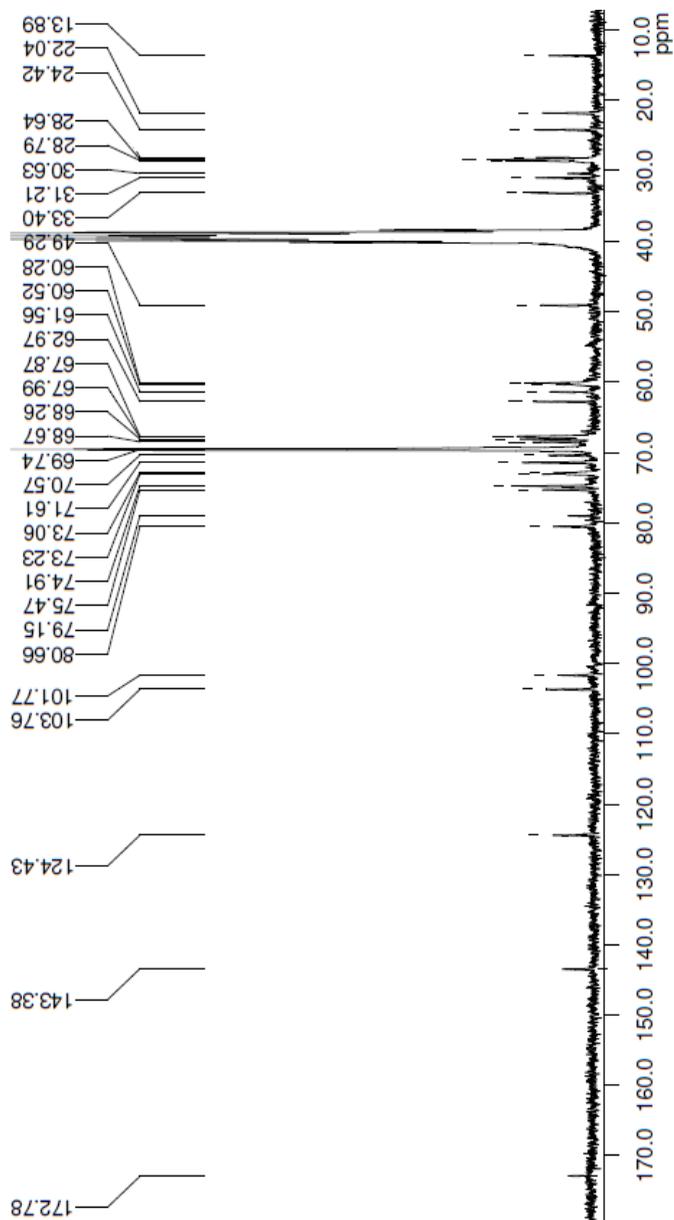
Espectro 76. Espectro de IV (KBr) dos compostos 21 antes da *click chemistry* e do composto 22 depois da reação de *click chemistry*.



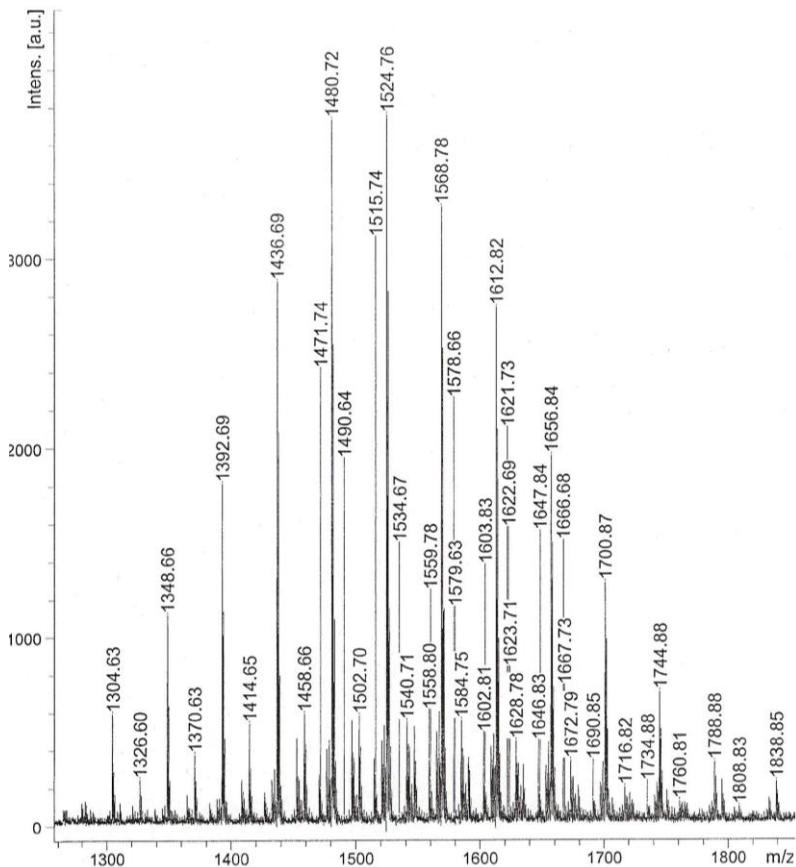
Espectro 77. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 22.



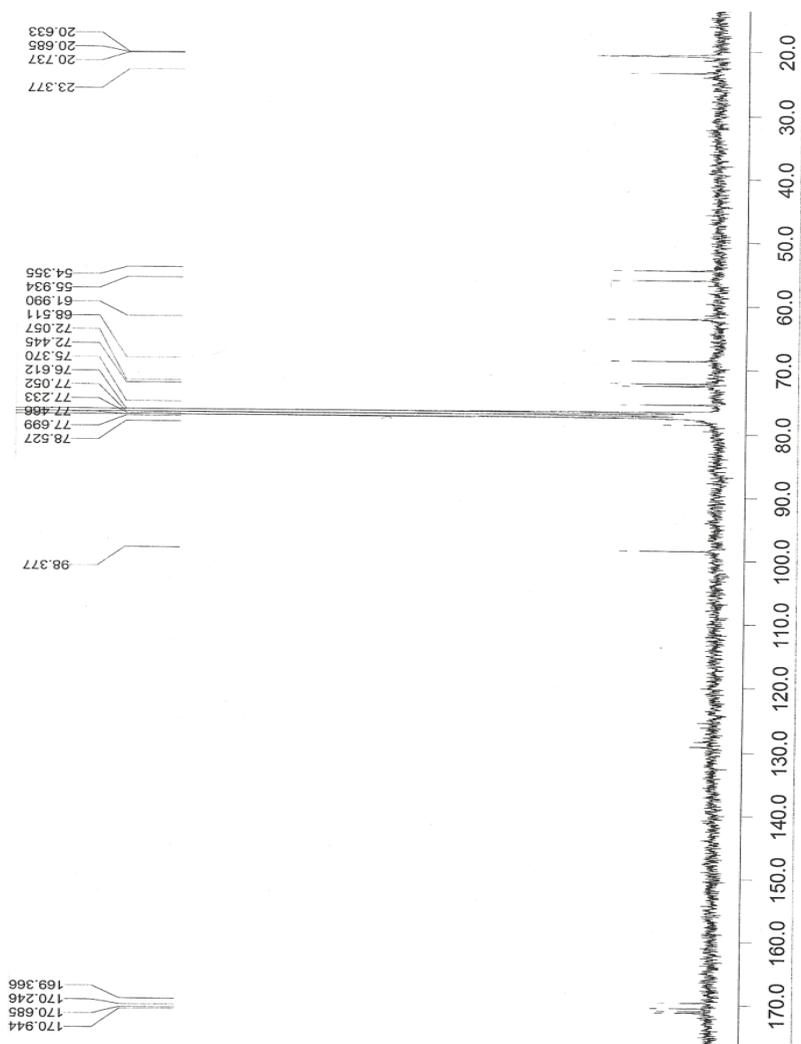
Espectro 78. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300MHz) do composto 23.



Espectro79. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 75MHz) do composto 23.



Espectro 80. Espectro de massa MALDI-TOF do composto 23.



Espectro 81. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) do composto 24.

**Analysis Info**

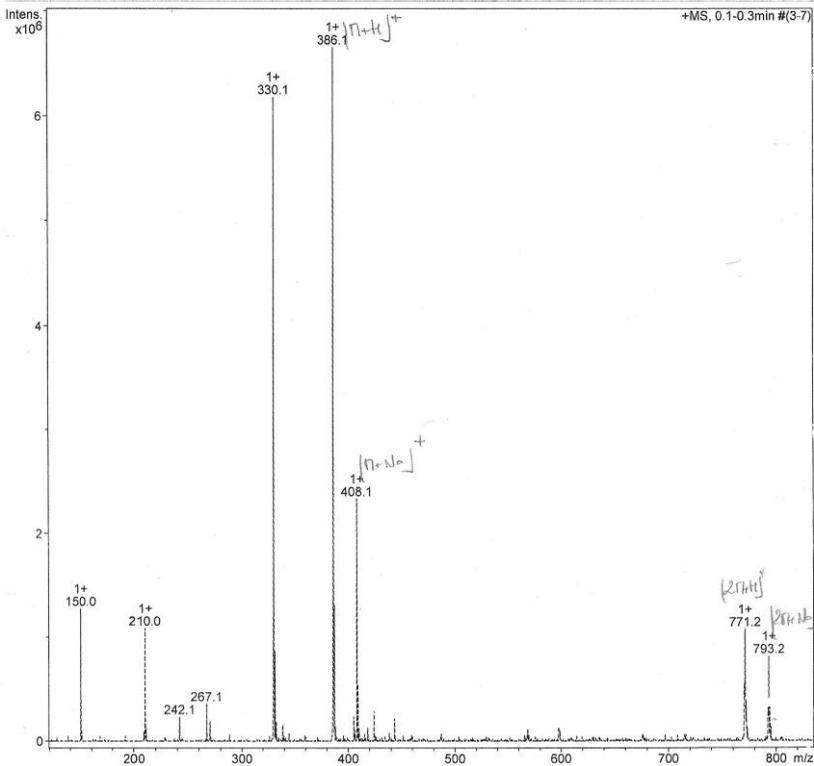
Analysis Name D:\Data\CIREAG 091203.d  
Method 09\_07\_2008\_passeur+masse target mass=800.m  
Sample Name Alexandre Gongalves  
Comment tache 1 sucre(385)  
 $C_{12}H_{22}NO_9$   
1 mg/mL ds H2O dilue 1/10 eau/MeOH/CH2Cl2

Acquisition Date 12/10/2009 3:54:13 P.

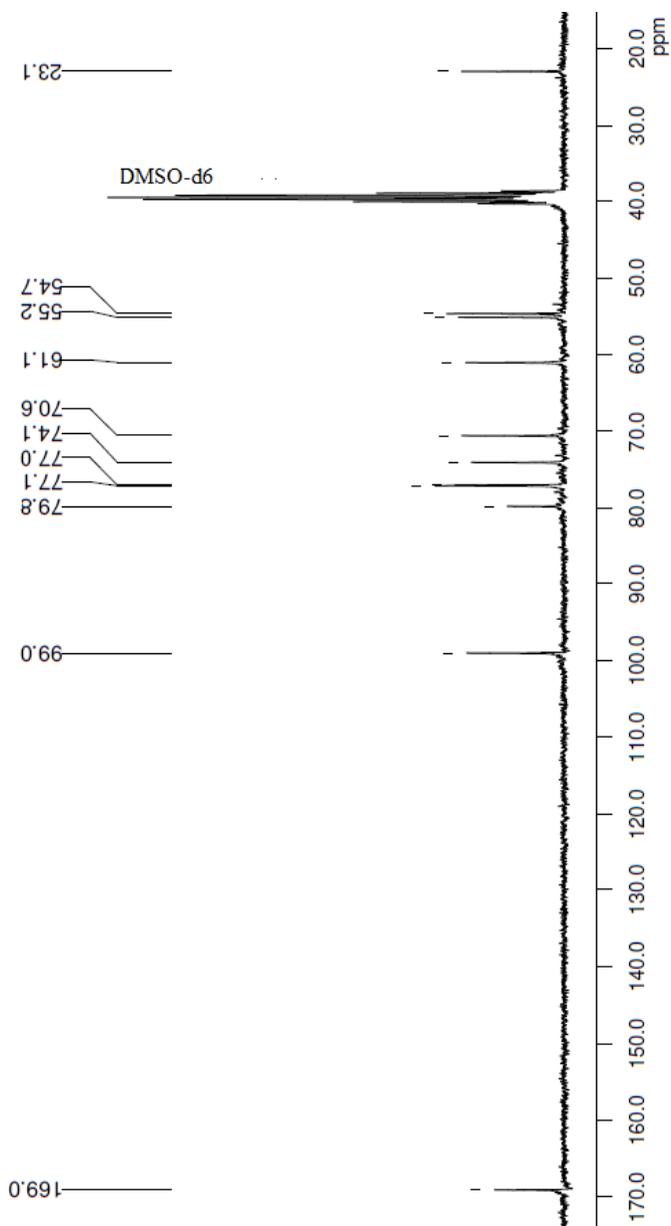
Operator Laure  
Instrument esquire3000 plus

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	120 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	115.0 Volt	Skim 1	40.0 Volt	Trap Drive	53.2
Accumulation Time	94 $\mu$ s	Averages	20 Spectra	Auto MS/MS	off



Espectro 82. Espectro de massa ESI do composto 24.



Espectro 83. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75MHz) do composto 25.

**Analysis Info**

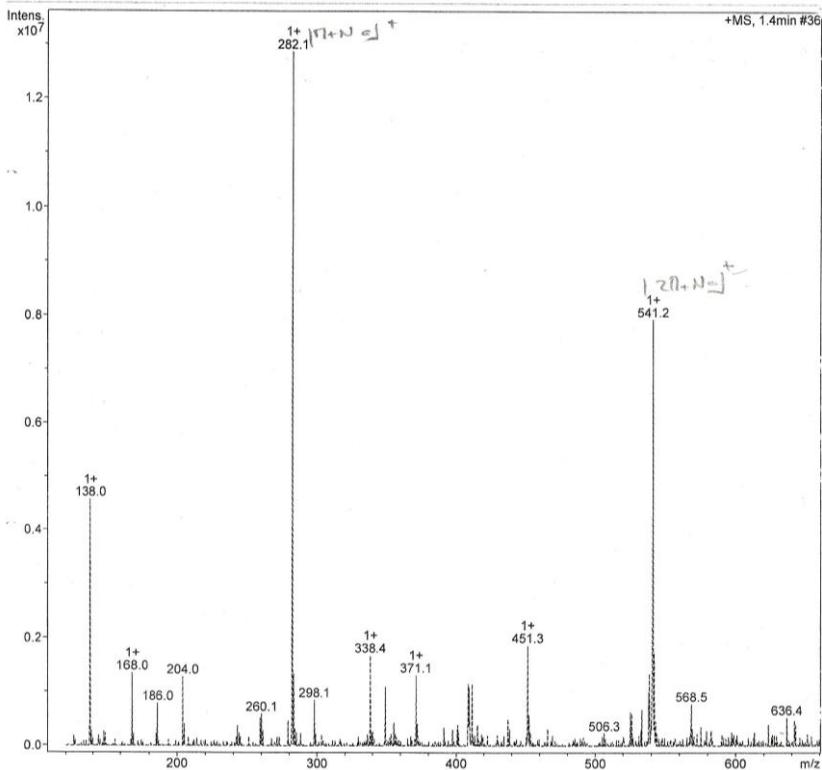
Analysis Name D:\Data\CIREVAG 091202.d  
Method 09\_07\_2008\_passeur+masse target mass=800.m  
Sample Name Alexandre Gongalves  
Comment sucre desac(259)  
C11H17NO6  
1 mg/mL ds H2O dilue 1/10 eau/MeOH/CH2Cl2

Acquisition Date 12/10/2009 3:42:28 PM

Operator Alexandre Gongalves  
Instrument esquire3000 plus

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Std/Normal	Scan Begin	120 m/z	Scan End	1000 m/z
Capillary Exit	139.0 Volt	Skim 1	10.0 Volt	Trap Drive	86.1
Accumulation Time	2230 $\mu$ s	Averages	20 Spectra	Auto MS/MS	off



Espectro 84. Espectro de massa ESI do composto 25.

**Tabela S1.** Parâmetros fixados durante o processo de fitting dos perfis de SAXS dos anfifílicos

<b>C18PEG<sub>900</sub>Lac 40 mg/mL</b>	<b>C18PEG<sub>900</sub>GlcNAc 40 mg/mL</b>
<i>PEG</i> <sub>900</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O – 44g/mol) – N = 20	(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O – 44g/mol) – N = 20
$D_{\text{PEG}} = 1,08 \text{ gcm}^{-3}$	$D_{\text{PEG}} = 1,08 \text{ gcm}^{-3}$
$V_{\text{PEG}} = 6,76 \times 10^{-23} \text{ cm}^3$	$V_{\text{PEG}} = 6,76 \times 10^{-23} \text{ cm}^3$
$\sigma_{\text{PEG}} = 10 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$	$\sigma_{\text{PEG}} = 10 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$
$\sigma_{\text{H}_2\text{O}} = 9,46 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ (electron density: 0,336 A <sup>3</sup> )	$\sigma_{\text{H}_2\text{O}} = 9,46 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ (0,336 A <sup>3</sup> )
$\beta_{\text{chain}} = 7,30 \times 10^{-12} \text{ cm}$ (fixo)	$\beta_{\text{chain}} = 7,30 \times 10^{-12} \text{ cm}$ (fixo)
$d = 1$ (fixo)	$d = 1$ (fixo)
$d_{\text{C18}} = 0,78 \text{ gcm}^{-3}$	$d_{\text{C18}} = 0,78 \text{ gcm}^{-3}$
$V_{\text{C18}} = 4,60 \times 10^{-22} \text{ cm}^3$ (V=M/d,N <sub>A</sub> )	$V_{\text{C18}} = 4,60 \times 10^{-22} \text{ cm}^3$ (V=M/d,N <sub>A</sub> )
$\sigma_{\text{C18}} = 6,63 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$	$\sigma_{\text{C18}} = 6,63 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$
$\sigma_{\text{H}_2\text{O}} = 9,46 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ (electron density: 0,336 A <sup>3</sup> )	$\sigma_{\text{H}_2\text{O}} = 9,46 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ (0,336 A <sup>3</sup> )
$\beta_{\text{core}} = -2,83 \times 10^{-10} \times 4,60 \times 10^{-22} = -1,30 \times 10^{-11}$ (fixo)	$\beta_{\text{core}} = -2,83 \times 10^{-10} \times 4,60 \times 10^{-22} = -1,30 \times 10^{-11}$ (fixo)