

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINE TEIXEIRA MACIEL E SILVA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FURTIVA E
ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM
CARBOIDRATOS CONTENDO DOXORRUBICINA**

Belo Horizonte

2018

ALINE TEIXEIRA MACIEL E SILVA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FURTIVA E
ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM
CARBOIDRATOS CONTENDO DOXORRUBICINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Gilson Andrade Ramaldes

Coorientador: Prof. Ricardo José Alves

Belo Horizonte

2018

S586a Silva, Aline Teixeira Maciel e.
Avaliação das propriedades furtiva e antitumoral de lipossomas revestidos com carboidratos contendo doxorrubicina / Aline Teixeira Maciel e Silva. – 2018.
267 f. : il.

Orientador: Gilson Andrade Ramaldes.
Coorientador: Ricardo José Alves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

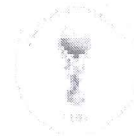
1. Lipossomas – Teses. 2. Lipossomos – Uso terapêutico – Teses. 3. Glicosiltriazóis – Teses. 4. Colesterol – Teses. 5. Doxorrubicina – Teses. I. Ramaldes, Gilson Andrade. II. Alves, Ricardo José. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FURTIVA E ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM CARBOIDRATOS CONTENDO DOXORRUBICINA

ALINE TEIXEIRA MACIEL E SILVA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

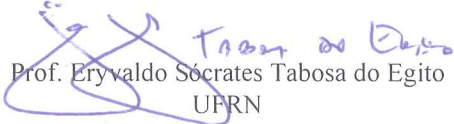
Aprovada em 31 de agosto de 2018, pela banca constituída pelos membros:

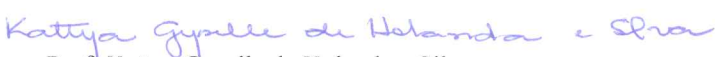

Prof. Gilson Andrade Ramaldes - Orientador
UFMG


Prof. Ricardo José Alves - Coorientador
UFMG


Prof. Valbert Nascimento Cardoso
UFMG


Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG


Prof. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito
UFRN


Prof. Katty Gyselle de Holanda e Silva
UFRJ

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais, Arlinda e Luiz,
minha avó Margarida e minha tia Bernadette,
fontes de incentivo e inspiração na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar os meus passos e me abençoar com muito mais do que preciso e mereço. A Ti, Senhor, toda minha gratidão.

Ao meu pai, Luiz, por todo apoio, amor e incentivo. À minha mãe, Arlinda, pelos conselhos, pelo colo acolhedor e pelas orações que me fortalecem e me fazem acreditar que tudo se torna mais leve quando depositamos nossa confiança em Deus.

À minha avó Margarida e minha tia Bernadette, pelo incentivo incondicional. Sem o apoio de vocês nada disto seria possível.

Aos meus queridos irmãos, André e Camilla, e meus cunhados Cinéia e Leonardo, por toda amizade, carinho e incentivo. Aos meus sobrinhos, Ana, Davi e Heitor, por trazerem leveza e alegria aos meus dias.

Ao professor Gilson, por toda dedicação e ensinamentos durante este período. Obrigada por não desistir. Mesmo em meio a tantas adversidades, você se manteve firme e nunca me deixou desamparada. É difícil expressar toda minha gratidão e admiração. Levarei sempre comigo seu exemplo de honestidade, caráter e profissionalismo.

Ao professor Ricardo, pela imensa contribuição científica e pelos conselhos, tanto profissionais como pessoais, que foram essenciais para o meu amadurecimento durante este trabalho.

À querida Ana Luiza, pela amizade, apoio, incentivo e conselhos. Sua disposição, desde o início, em me ajudar, tornou este trabalho mais leve, tranquilo e alegre.

Ao professor André, pela expressiva colaboração nos experimentos *in vivo* e pelas discussões científicas que contribuíram de forma significativa para este trabalho.

Ao professor Daniel, que me incentivou a realizar este trabalho de doutorado. Agradeço a ajuda e conselhos ao longo deste período.

À doutoranda Juliana, pela boa vontade e disponibilidade em participar do exaustivo trabalho com os animais.

Ao Lucas Lopardi e Flaviano, por me auxiliarem nos experimentos de síntese, pelas enriquecedoras discussões científicas, por toda ajuda na obtenção dos espectros de RMN e por tornarem os dias de trabalho no laboratório mais alegres.

Ao professor Adriano Sabino, por disponibilizar seu laboratório para realização dos ensaios *in vitro*.

À Fernanda Gontijo, pela colaboração nos experimentos de cultivo celular.

Ao professor José Dias, pelas análises de RMN realizadas.

Ao professor Adriano Pimenta, por colaborar na obtenção dos espectros de massas.

Aos examinadores, pela participação na banca de doutorado e por contribuírem para essa tese.

Aos colegas do laboratório de química farmacêutica: Ângela, Bruno, Cristiane, Dayara, Inácio, Luan, Marcela, Marina, Maralise, Raquel, Renata, Saulo, Stefânia, Thaís e Vítor, pelo convívio, companheirismo e amizade.

Aos colegas do laboratório de tecnologia farmacêutica: Aina, Carol, Daniele, Eliza, Fernanda, Gabriel, Heloísa, Izabela, Jaqueline, Liziane, Marcos, Mariana, Marina, Marjorie, Mayara, Renata, Rummenigge, Sáva e Shirleide, pelos momentos de descontração e por todo apoio ao longo deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Produtos Farmacêuticos, Mônica, Lucas, Gisele, Elaine, Marta, Armando e André Faraco, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas e professores do NEPLAM, pela amizade, aprendizado e valores transmitidos a mim, que foram essenciais à minha formação.

À Comunidade Apostólica pelas contínuas orações e por todo carinho.

À Betânia, Letícia, Carol e Bruno, pelo incentivo e amizade de longa data.

À Grasi e ao Vinícius, pelos conselhos, incentivo, apoio, discussões científicas e amizade.

Aos técnicos da Faculdade de Farmácia pela assistência e por possibilitarem o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As formulações lipossomais utilizadas no passado, conhecidas como lipossomas convencionais, possuem tempo de meia vida de circulação de apenas alguns minutos, isso porque são rapidamente absorvidas pelas células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF). Assim, foram desenvolvidos lipossomas conhecidos como furtivos, de longa circulação ou estericamente estabilizados para melhorar o tempo de circulação. Esse objetivo é geralmente alcançado através da incorporação de polímeros hidrofílicos como o PEG e seus derivados. Entretanto, observa-se que esses lipossomas também apresentam uma alta taxa de captação pelos tecidos ricos em macrófagos, mesmo sendo utilizados polímeros derivados do PEG. Além disso, estudos recentes mostram que, ao serem administrados em intervalos sequenciais de tempo, os lipossomas PEGuilados passam a ter uma redução no tempo de circulação e um aumento na acumulação hepática e esplênica. Tais características representam uma barreira para a pesquisa de formulações lipossomais e para sua utilização clínica. Desta forma, no presente trabalho foi proposto o revestimento de lipossomas com derivados de carboidratos visando obter nanoestruturas com maior tempo de circulação. Para isto, foi realizada a síntese de três glicosiltriázóis triméricos derivados de D-glicose, D-galactose, e N-acetilglicosamina os quais foram acoplados ao 3-O-(2-aminoetil)colesterol via formação de amida. Os lipossomas obtidos apresentaram alta encapsulação de doxorubicina, liberação sustentada do fármaco e boa estabilidade de armazenamento. O complexo ^{99m}Tc -colesterol-DTPA também foi obtido e utilizado em experimentos de radiomarcagem com altos rendimentos e estabilidade radioquímica. Verificamos através de estudos de depuração sanguínea que os lipossomas glicosilados apresentaram tempo de meia vida de circulação superior aos lipossomas peguilados. Também foi observado direcionamento hepático para os lipossomas galactosilados. Estudos de viabilidade celular utilizando a linhagem de câncer de mama 4T1 demonstraram maior citotoxicidade para os lipossomas contendo carboidratos na superfície quando comparados a lipossomas peguilados. Os estudos de atividade antitumoral *in vivo* indicaram aumento da eficácia dos lipossomas revestidos com glicose contendo doxorubicina em comparação com lipossomas peguilados e doxorubicina livre. Também foram observados indícios de redução de toxicidade para os lipossomas glicosilados. Os resultados obtidos sugerem que uso de carboidratos na superfície de nanoestruturas pode ser uma alternativa promissora para aumentar o tempo de circulação das vesículas, direcionar lipossomas a locais específicos e, como consequência, aumentar a eficiência do tratamento, com redução da toxicidade.

ABSTRACT

Liposomal formulations used in the past, known as conventional liposomes, have circulating half-life time of only a few minutes, because they are rapidly absorbed by the Monocytic Phagocytic System (SMF) cells. Thus, liposomes known as stealth, long-circulating or sterically stabilized were developed to improve circulation time. This purpose is generally achieved by the incorporation of hydrophilic polymers such as PEG and its derivatives. However, it is observed that these liposomes also present a high uptake rate by macrophages rich tissues, even though PEG-derived polymers are used. In addition, recent studies show that, when administered at sequential time intervals, PEGylated liposomes have a reduction in circulation time and an increase in the hepatic and splenic accumulation. These characteristics represent a barrier for the research of liposomal formulations and their clinical use. Thus, in the present work the coating of liposomes with carbohydrate derivatives was proposed in order to obtain nanostructures with longer circulation time. For this, synthesis of three trimeric glycosyltriazaoles, derived from D-glucose, D-galactose, and *N*-acetylglicosamine were generated, and were coupled to 3-*O*-(2-aminoethyl)cholesterol via amide formation. The produced liposomes showed high encapsulation of doxorubicin, sustained release profile of the drug and good storage stability. The ^{99m}Tc -cholesterol-DTPA complex was also obtained and used in radiolabeling experiments with high yields and radiochemical stability. It was verified through clearance studies that the glycosylated liposomes presented a half-life of circulation superior to the pegylated liposomes. Hepatic targeting was also observed for galactosylated liposomes. Cell viability studies using 4T1 breast cancer cell line demonstrated higher cytotoxicity to carbohydrate-coated liposomes compared to pegylated liposomes. *In vivo* antitumor activity studies indicated increased efficacy of glucose-coated liposomes containing doxorubicin compared to pegylated liposomes and free doxorubicin. Indications of toxicity reduction for glycosylated liposomes were also observed. All these results together suggest that use of carbohydrates on the surface of the nanostructures can be a promising alternative to increase the vesicle circulation time to target liposomes to specific sites and, as a consequence, to increase the efficiency of the treatment with reduction of the toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ – Deslocamento químico

4T1 – Células de adenocarcinoma mamário murino

°C – Graus Celsius

ANOVA – Análise de variância

AcOEt – Acetato de etila

ASC – Área sob a curva

AscONa – Ascorbato de sódio

ATR – *Attenuated Total Reflection* (Reflectância Total Atenuada)

CARPA – Pseudo Alergia Relacionada à Ativação do Complemento (do inglês, *complement activation-related pseudoallergy*)

CEBIO – Centro de bioterismo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CHEMS – Hemissuccinato de coleslerila

CHOL – Colesterol (do inglês *cholesterol*)

CLAE / HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatographic*)

d – Duplete

dd – Duplete duplo

DEPT-135 – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135*

DSPE-PEG₂₀₀₀ – Diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol₂₀₀₀

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DMAP – 4-Dimetilaminopiridina

DOX – Doxorrubicina

DNR – Daunorrubicina

DPR – Desvio padrão relativo

DTPA – Ácido dietilentriaminopentaacético

Efeito ABC – Efeito depuração sanguínea acelerada (do inglês. *accelerated blood clearance*)

EPG – Fosfatidilglicerol (do inglês, *egg phosphatidyl glycerol*)

EPR – Permeabilidade e retenção aumentados (do inglês, *enhanced permeability and retention*)

ESI-MS – Espectrometria de massas com ionização electrospray (do inglês, *electrospray ionisation mass spectrometry*)

FF – Faixa de fusão

FM – Fórmula molecular

GalL – Lipossomas revestidos por galactose

GlcL – Lipossomas revestidos por glicose

GlcNAcL – Lipossomas revestidos por *N*-acetilglicosamina

Hex – Hexano

HSQC – Correlação heteronuclear única quântica (do inglês, *heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*)

HSPC – Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (do inglês, *hydrogenated soybean phosphatidylcholine*)

IC – Inibição do Crescimento

IV – Infravermelho

IP – Índice de polidispersão

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

J – Constante de acoplamento

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

m – Multiplete

MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês *matrix-assisted laser desorption ionization*)

MM – Massa molar

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

ppm – Partes por milhão

PEG – Polietilenoglicol

PegL – Lipossomas peguilados

r – Coeficiente de correlação

r^2 – Coeficiente de determinação

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – Simpleto

sl – Sinal largo

SMF – Sistema Monocítico Fagocitário

t – Tripleto

$t_{1/2}$ – Tempo de meia vida

t.a – Temperatura ambiente

Tc – Temperatura de transição de fase (do inglês *chain melting temperature*)

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ – Tecnécio-99 metaestável

TMS – Tetrametilsilano

USP – Universidade de São Paulo

VRT – Volume relativo do tumor

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Proposta de síntese do núcleo contendo três alcinos terminais.	37
Esquema 2	Proposta de síntese do 3- <i>O</i> -(2-aminoetil)colesterol.	37
Esquema 3	Proposta de síntese das azidas derivadas da D-glicose e D-galactose.	38
Esquema 4	Proposta de síntese da azida derivada da <i>N</i> -acetilglicosamina.	38
Esquema 5	Proposta de síntese dos derivados 1,2,3-triazólicos.	39
Esquema 6	Proposta de síntese de amidas a partir dos derivados triazólicos 23, 24 e 25 e do derivado 2-aminoetila do colesterol.	39
Esquema 7	Proposta de síntese alternativa para obtenção das amidas 26, 27 e 28 .	40
Esquema 8	Proposta de desproteção dos glicosídeos.	40
Esquema 9	Proposta de rearranjo para obtenção do composto 7 .	71
Esquema 10	Proposta de mecanismo para substituição nucleofílica unimolecular.	73
Esquema 11	Proposta de mecanismo para reação “click”.	77
Esquema 12	Proposta de mecanismo da reação de acoplamento utilizando-se EDAC e DMAP.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de lipossomas (A) unilamelares e (B) multilamelares.	23
Figura 2	Representação esquemática das diferentes estratégias de direcionamentos lipossomais.	26
Figura 3	Representação dos eventos que levam a indução do efeito ABC após administração de lipossomas PEGuilados.	29
Figura 4	Estrutura dos derivados potietilenoglicol PEG-CHMC (A) e PEG-CHEMS (B).	30
Figura 5	Esquema do derivado clivável do polietilenoglicol (PEG-Hz-CHEMS).	30
Figura 6	Estrutura do ácido siálico e seus principais derivados.	31
Figura 7	Estrutura química dos monossilangliosídeos.	32
Figura 8	Estrutura química das substâncias doxorubicina (DOX) e daunorrubicina (DNR).	33
Figura 9	Síntese do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (4).	67
Figura 10	Espectros no infravermelho dos compostos 1, 2, 3 e 4.	68
Figura 11	Síntese do 3- <i>O</i> -(2-aminoetil)colesterol (10).	69
Figura 12	Síntese das glicosilazidas derivadas da D-glicose (14) e D-galactose (18).	72
Figura 13	Efeito eletrônico nos anômeros α e β .	74
Figura 14	Efeito anomérico (hiperconjugação) nos anômeros α e β .	74
Figura 15	Espectros no infravermelho dos compostos 12, 13 e 14.	75
Figura 16	Síntese da glicosilazida derivada da <i>N</i> -acetilglicosamina (22)	75
Figura 17	Efeitos estéricos e eletrônicos em haletos da <i>N</i> -acetilglicosamina.	76
Figura 18	Espectros no infravermelho dos compostos 20, 21 e 22.	76
Figura 19	Síntese dos glicosiltriazóis 23 e 24.	78
Figura 20	Síntese da amida 29.	81
Figura 21	Curva analítica média obtida (1,0 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$) para determinação de DOX por CLAE.	91
Figura 22	Encapsulação de DOX pelo método de gradiente de sulfato de amônio.	97
Figura 23	Efeito da temperatura na permeabilidade dos fosfolipídeos	98
Figura 24	Imagem dos lipossomas brancos [GlcL (a), GalL (b), GlcNAcL (c), PegL (d)] obtidas por MET.	99

Figura 25	Variação do diâmetro médio (barra) e índice de polidispersão (ponto) avaliado durante o período de armazenamento de 180 dias dos lotes de GlcL, GalL, GlcNAcL e PegL. Asterisco representa diferença significativa em relação ao dia 0 (n = 3).	100
Figura 26	Variação do potencial zeta durante o armazenamento por 180 dias dos lotes de GlcL, GalL, GlcNAcL e PegL (n=3).	101
Figura 27	Perfil de retenção de DOX durante o período de armazenamento de 180 dias. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao dia 0 (n = 3).	101
Figura 28	Liberação <i>in vitro</i> de doxorubicina dos lipossomas GlcL, GalL, GlcNAcL e PegL em PBS (pH 7,4).	103
Figura 29	Síntese do derivado CHOL-DTPA (33).	110
Figura 30	Espectros no infravermelho dos compostos DTPA dianidrido, 10 e 33 .	111
Figura 31	Estabilidade <i>in vitro</i> dos lipossomas radiomarcados em solução salina 0,9% (p/v) (quadrado) e em plasma de camundongo (círculo).	113
Figura 32	Curva de depuração sanguínea dos lipossomas radiomarcados avaliado em camundongos BALB/c sadios (n = 5).	114
Figura 33	Comparação entre as curvas de depuração sanguínea obtidas para a primeira e segunda dose de lipossomas radiomarcados avaliado em camundongos BALB/c sadios (n = 5).	116
Figura 34	Perfil de biodistribuição dos lipossomas em animais BALB/c sadios.	118
Figura 35	Imagens cintilográficas de camundongos BALB/c sadios obtidas 1 hora (A) e 4 horas (B) após administração de diferentes formulações lipossomais.	119
Figura 36	Viabilidade celular mediada pelo ensaio do MTT para DOX Livre, GlcL-DOX, GalL-DOX, GlcNAcL-DOX e PegL-DOX em células das linhagens tumorais 4T1.	129
Figura 37	Perfil de morte das células 4T1 coradas com Anexina-V FITC e solução PI em amostras não tratadas (A) e após o tratamento com DOX livre (B), GlcL-DOX (C), GalL-DOX (D), GlcNAcL-DOX (E) e PegL-DOX (F).	131
Figura 38	Avaliação do crescimento tumoral em função do tempo. O tratamento constituiu-se de 4 doses de 5 mg/kg. N = 8; Média ± DP. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas entre as formulações	134

	GlcL-DOX e PegL-DOX.	
Figura 39	Avaliação da variação do peso corpóreo dos animais em função do tempo e do tipo de tratamento. N = 8; Média ± DP. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas entre as formulações GlcL-DOX e PegL-DOX comparadas a DOX livre.	135
Figura 40	Aspecto dos pulmões dos animais do grupo controle (A) e após tratamento com GlcL-DOX (B). As setas indicam a presença de metástases.	136
Figura 41	Representação esquemática dos lipossomas revestidos com carboidratos.	140
Figura 42	Preparação, caracterização, perfil de liberação e estabilidade de lipossomas peguilados e revestidos por carboidratos contendo doxorubicina.	140
Figura 43	Estudos de depuração sanguínea, avaliação do efeito ABC, biodistribuição e imagens cintilográficas de lipossomas peguilados e revestidos por carboidratos	141
Figura 44	Estudos de <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da atividade antitumoral de lipossomas peguilados e revestidos por carboidratos frente ao modelo tumoral 4T1.	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulações de lipossomas aprovadas e em fase de teste para o tratamento do câncer.	25
Tabela 2	Rendimentos globais obtidos para os glicosiltriazóis sintetizados.	82
Tabela 3	Composição lipídica e razão molar para as formulações propostas.	86
Tabela 4	Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de DOX por CLAE, em triplicata.	90
Tabela 5	Resultados da regressão linear.	91
Tabela 6	Resultados da precisão intra-dia para determinação de DOX por CLAE, em triplicata.	92
Tabela 7	Dados das características físico-químicas dos lipossomas em função da composição e concentração lipídica.	94
Tabela 8	Estabilidade dos lipossomas revestidos por glicose (GlcL).	95
Tabela 9	Distribuição do diâmetro das vesículas em termos de volume dos lotes de GlcL, GalL, GlcNaCl e PegL.	96
Tabela 10	Caracterização físico-química dos lipossomas e influência da temperatura na eficiência de encapsulação (n=3).	97
Tabela 11	Rendimentos de marcação obtidos para os diferentes lipossomas testados. Valores expressos como média \pm DP, n=4.	112
Tabela 12	Parâmetros físico-químicos obtidos para as formulações de lipossomas radiomarcados. Valores expressos em média \pm DP, n=3.	112
Tabela 13	Parâmetros farmacocinéticos após injeção intravenosa de diferentes formulações lipossomais.	115
Tabela 14	Biodistribuição hepática dos lipossomas nos tempos de 1h e 4h em animais BALB/c sadios.	119
Tabela 15	Valores de IC ₅₀ obtidos para linhagem de células 4T1	129
Tabela 16	Valores de Volume Relativo do Tumor (VRT) e Inibição do Crescimento (IC) dos grupos em função do tratamento.	134
Tabela 17	Parâmetros bioquímicos avaliados em animais tratados com tampão (controle), DOX livre, GlcL-DOX e PegL-DOX. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.	137

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	REVISAO DA LITERATURA	22
	<i>2.1 Lipossomas como alternativa terapêutica para o câncer</i>	22
	<i>2.2 Uso de polímeros sintéticos e suas limitações</i>	27
	<i>2.3 Carboidratos</i>	31
	<i>2.4 Terapia do câncer com antraciclinas</i>	33
	<i>2.4.1 Doxorrubicina</i>	34

CAPÍTULO I: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS GLICOSILTRIAZÓIS DERIVADOS DA D-GLICOSE, D-GALACTOSE E N-ACETILGLICOSAMINA

1	Introdução	36
2	Proposta de trabalho	36
3	Parte experimental	41
	<i>3.1 Materiais e métodos</i>	41
	<i>3.1.1 Secagem e purificação dos solventes e reagentes</i>	42
	<i>3.1.2 Soluções reveladoras</i>	42
	<i>3.2 Sínteses</i>	42
	<i>3.2.1 Síntese dos derivados do ácido gálico</i>	42
	<i>3.2.1.1 Síntese de 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila (2)</i>	43
	<i>3.2.1.2 Síntese de 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoato de metila (3)</i>	43
	<i>3.2.1.3 Síntese de ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (4)</i>	44
	<i>3.2.2 Síntese dos derivados do colesterol</i>	45
	<i>3.2.2.1 Síntese de 3-β-[(p-toluenossulfonil)oxi]colest-5-eno (6)</i>	45
	<i>3.2.2.2 Síntese de 3-β-[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (7)</i>	46
	<i>3.2.2.3 Síntese de 3-β-[2[(p-toluenossulfonil)oxi]etoxi]colest-5-eno (8)</i>	47
	<i>3.2.2.4 Síntese de 3-β-(2-azidoetoxi)colest-5-eno (9)</i>	48
	<i>3.2.2.5 Síntese de 3-β-(2-aminoetoxi)colest-5-eno (10)</i>	49

3.2.3 Síntese das azidas dos carboidratos	49
3.2.3.1 Procedimento geral da síntese dos derivados per-O-acetilados 12 e 16	49
3.2.3.1.1 Síntese de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-glicopiranosose (12)	50
3.2.3.1.2 Síntese de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- β -D-galactopiranosose (16)	50
3.2.3.2 Síntese de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (20)	51
3.2.3.3 Procedimento geral da síntese dos derivados bromados 13 e 17	51
3.2.3.3.1 Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (13)	52
3.2.3.3.2 Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-galactopiranosila (17)	52
3.2.3.4 Síntese de cloreto de 2-acetamido-1,2-didesoxi-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-glicopiranosila (21)	53
3.2.3.5 Procedimento geral da síntese das azidas 14, 18 e 22	53
3.2.3.5.1 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopiranosose (14)	54
3.2.3.5.2 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranosose (18)	54
3.2.3.5.3 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopiranosose (22)	55
3.2.4 Síntese dos glicosiltriazóis	55
3.2.4.1 Procedimento geral para síntese dos glicosiltriazóis 23, 24	55
3.2.4.1.1 Glicosiltriazol 23	56
3.2.4.1.2 Galactosiltriazol 24	57
3.2.5 Síntese das amidas	57
3.2.5.1 Procedimento geral para síntese das amidas 26, 27	57
3.2.5.1.1 Amida 26: obtida pela reação do glicosiltriazol 23 com o 3-O-(2-aminoetil)colesterol (10)	58
3.2.5.1.2 Amida 27: obtida pela reação do	59

	<i>galactosiltriazol 24 com o 3-O-(2-aminoetil)colesterol</i>	
	<i>(10)</i>	
	<i>3.2.5.2 Síntese de 29</i>	60
	<i>3.2.5.3 Procedimento geral para síntese das amidas 26, 27, 28 a partir do derivado 29</i>	61
	<i>3.2.5.3.1 Amida 26: obtida pela reação da glicosilazida 14 com o derivado 29</i>	61
	<i>3.2.5.3.2 Amida 27: obtida pela reação da glicosilazida 18 com o derivado 29</i>	62
	<i>3.2.5.3.3 Amida 28: obtida pela reação da glicosilazida 22 com o derivado 29</i>	62
	<i>3.2.6 Desacetilação dos açúcares</i>	63
	<i>3.2.6.1 Procedimento geral para remoção dos grupos acetila de 26, 27, 28</i>	63
	<i>3.2.6.1.1 Amida 30: obtida pela desacetilação de 26</i>	64
	<i>3.2.6.1.2 Amida 31: obtida pela desacetilação de 27</i>	65
	<i>3.2.6.1.3 Amida 32: obtida pela desacetilação de 28</i>	66
4	Resultados e discussão	67
	<i>4.1 Síntese do núcleo contendo alcino terminal derivado do ácido gálico</i>	67
	<i>4.2 Síntese dos derivados do colesterol</i>	69
	<i>4.3 Síntese das glicosilazidas</i>	72
	<i>4.4 Síntese dos glicosiltriazóis</i>	77
	<i>4.5 Sínteses das amidas</i>	79
	<i>4.6 Reação de desproteção dos glicosídeos</i>	81
5	Conclusão	82
CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM CARBOIDRATOS E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES		
1	Introdução	84
2	Parte experimental	84
	<i>2.1 Materiais</i>	84

2.2	<i>Métodos</i>	84
2.2.1	<i>Doseamento da doxorubicina</i>	84
2.2.1.1	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	85
2.2.1.1.1	<i>Parâmetros de validação</i>	85
2.2.2	<i>Desenvolvimento farmacotécnico das formulações lipossomais</i>	86
2.2.3	<i>Caracterização físico química e morfológica das formulações</i>	87
2.2.3.1	<i>Determinação do diâmetro médio das partículas</i>	87
2.2.3.2	<i>Determinação do potencial zeta das partículas</i>	87
2.2.3.3	<i>Determinação do Teor de Encapsulação</i>	87
2.2.3.4	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	88
2.2.4	<i>Estudo de estabilidade das formulações</i>	88
2.2.4.1	<i>Passivação das membranas de ultrafiltração</i>	88
2.2.5	<i>Estudo de liberação das formulações</i>	89
2.2.6	<i>Análise estatística</i>	89
3	Resultados e Discussão	90
3.1	<i>Doseamento da doxorubicina</i>	90
3.1.1	<i>Linearidade</i>	90
3.1.2	<i>Precisão intra-dia</i>	92
3.1.3	<i>Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)</i>	92
3.2	<i>Desenvolvimento farmacotécnico das formulações lipossomais</i>	93
3.2.1	<i>Determinação do Teor de Encapsulação</i>	96
3.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	98
3.2.3	<i>Estudo de estabilidade das formulações</i>	98
3.2.4	<i>Estudo de liberação das formulações</i>	102
4	Conclusão	103
CAPÍTULO III: SÍNTESE DO DERIVADO COLESTEROL-DTPA, RADIOMARCAÇÃO DE LIPOSSOMAS COM ^{99m}Tc, ESTUDOS DE DEPURAÇÃO SANGUÍNEA, BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS		
1	Introdução	105
2	Parte experimental	105

2.1	<i>Materiais</i>	105
2.1.1	<i>Animais</i>	106
2.2	<i>Métodos</i>	106
2.2.1	<i>Síntese do derivado CHOL-DTPA</i>	106
2.2.2	<i>Caracterização química do derivado CHOL-DTPA</i>	107
2.2.3	<i>Radiomarcção de lipossomas com tecnécio-99m e estudos de estabilidade</i>	107
2.2.4	<i>Depuração sanguínea em animais BALB/c sadios</i>	108
2.2.5	<i>Estudos de biodistribuição em animais BALB/c sadios</i>	108
2.2.6	<i>Imagens cintilográficas em animais BALB/c sadios</i>	109
2.2.7	<i>Análise estatística</i>	109
3	Resultados e discussão	110
3.1	<i>Síntese e caracterização química do derivado CHOL-DTPA</i>	110
3.2	<i>Radiomarcção de lipossomas com tecnécio-99m</i>	111
3.3	<i>Estudo in vitro da estabilidade de radiomarcção</i>	112
3.4	<i>Depuração sanguínea em animais BALB/c sadios</i>	113
3.5	<i>Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais BALB/c sadios</i>	117
4	Conclusão	120

CAPÍTULO IV: ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM CARBOIDRATOS EM MODELO MURINO DE CÂNCER DE MAMA

1	Introdução	122
2	Parte experimental	122
2.1	<i>Materiais</i>	122
2.2	<i>Métodos</i>	123
2.2.1	<i>Estudos in vitro em células 4T1</i>	123
2.2.1.1	<i>Cultivo celular</i>	123
2.2.1.2	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	123
2.2.2	<i>Citometria de fluxo</i>	124
2.2.2.1	<i>Análise da apoptose/necrose pelo método da anexina-</i>	124

	<i>V/iodeto de propídio</i>	
	2.2.3 <i>Estudos in vivo</i>	125
	2.2.3.1 <i>Cultivo celular</i>	125
	2.2.3.2 <i>Animais</i>	125
	2.2.3.3 <i>Desenvolvimento do tumor</i>	125
	2.2.3.4 <i>Tratamento</i>	125
	2.2.3.5 <i>Avaliação da eficácia</i>	126
	2.2.3.6 <i>Avaliação da toxicidade</i>	126
	2.2.3 <i>Análise estatística</i>	127
3	Resultados e discussão	128
	3.1 <i>Estudos in vitro em células 4T1</i>	128
	3.2 <i>Quantificação de células apoptóticas</i>	130
	3.3 <i>Estudos in vivo</i>	132
	3.3 <i>Estudos toxicidade</i>	136
4	Conclusão	138
3	DICUSSÃO GERAL	139
4	CONCLUSÃO GERAL	144
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

ANEXOS

	ANEXO A: Espectros dos Capítulos I e III	163
	ANEXO B: Tabelas dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos Capítulos I e III	240

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de diversos fármacos na terapia de muitas doenças ainda é limitada por fatores como baixa solubilidade, degradação do princípio ativo e elevada toxicidade. Por isso há uma busca constante por sistemas carreadores de fármacos que possam superar estas dificuldades. Nesse contexto, o encapsulamento de fármacos em lipossomas destaca-se como uma alternativa interessante para contornar tais inconvenientes.

Os lipossomas, assim como outros sistemas nanoestruturados atualmente estudados, são intensamente capturados pelas células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF), o que limita a sua utilização clínica e acaba por conduzir significativas quantidades de agentes de diagnóstico ou terapia para regiões não alvo. Uma alternativa proposta para minimizar esses inconvenientes foi a modificação da sua superfície com componentes hidrofílicos, como polímeros de PEG ou derivados. Porém, diversos estudos publicados nos últimos anos, demonstram que esta abordagem ainda apresenta resultados tímidos em termos de evasão das ações do sistema imunológico e que, a maior parte dos lipossomas injetados por via intravascular, ainda ficam acumulados em órgãos como fígado e baço, gerando assim potenciais efeitos adversos. Dessa forma, a necessidade de novos estudos, focados especificamente na melhoria do tempo de circulação e evasão do sistema imune se faz necessário para proporcionar uma potencialização na ação dos fármacos encapsulados, assim como uma redução nos seus efeitos colaterais.

Pelos motivos acima descritos, o objetivo dessa tese é: (i) sintetizar e caracterizar carboidratos modificados, para serem incorporados na superfície de lipossomas contendo doxorrubicina e (ii) caracterizar físico-quimicamente e avaliar *in vitro* e *in vivo* as propriedades furtivas e antitumoral dos lipossomas revestidos com carboidratos.

A tese está dividida em quatro capítulos. No Capítulo I foram descritas a síntese e a caracterização de três glicosiltriazóis derivados da D-glicose, D-galactose, e *N*-acetilglicosamina ligados a 3-*O*-(2-aminoetil)colesterol. No Capítulo II foram descritos o desenvolvimento, a caracterização físico-química e o estudo de estabilidade dos lipossomas preparados contendo doxorrubicina. O Capítulo III apresenta a síntese do derivado colesterol-DTPA, obtido para possibilitar a radiomarcagem dos lipossomas com ^{99m}Tc. Também são descritos a estabilidade de radiomarcagem dos lipossomas e o perfil farmacocinético das vesículas em camundongos BALB/c. No Capítulo IV encontra-se a investigação da atividade citotóxica *in vitro* dos lipossomas contendo doxorrubicina, empregando o modelo de células tumorais 4T1. Estudos *in vivo* em animais acometidos com tumor 4T1 para avaliar a eficácia e a toxicidade das formulações também são apresentados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lipossomas como alternativa terapêutica para o câncer

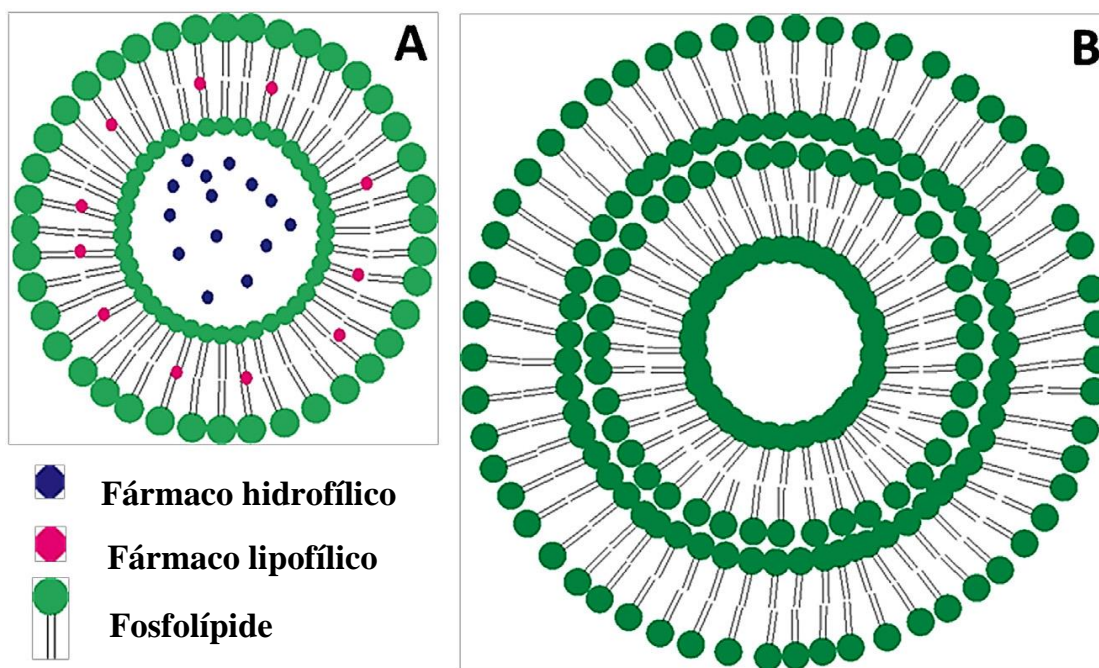
Ao longo dos anos, os avanços nas áreas química e biológica tornaram possível a descoberta de diversas substâncias com potencial terapêutico. Porém, a utilização de muitos compostos com relevantes atividades farmacológicas é limitada devido a algumas características como a baixa solubilidade, baixo índice terapêutico, elevada toxicidade e os efeitos colaterais referentes a altas dosagens. Por estes motivos, muitos estudos buscam desenvolver transportadores eficientes para os fármacos, com a finalidade de modular a cinética de liberação, reduzir a toxicidade, melhorar a absorção e a biodisponibilidade (SALTÃO & VEIGA, 2001; SANTOS & CASTANHO, 2002).

Uma das primeiras tentativas para obtenção de um sistema transportador eficaz foi o encapsulamento de biomoléculas em vesículas de nylon e em outros polímeros sintéticos. Entretanto, essa abordagem mostrou-se ineficiente, isso porque essas vesículas de material sintético acumulavam-se no organismo, constituindo um risco potencial para a saúde. Assim, o primeiro grande passo nessa área ocorreu em 1965, com a publicação, por Alec Bangham e colaboradores, de um trabalho no qual foi desenvolvido um sistema de vesículas fosfolipídicas, que alguns anos depois, seriam conhecidas como lipossomas (BANGHAM *et al.*, 1965; SANTOS & CASTANHO, 2002).

Após as pesquisas de Bangham, os lipossomas foram consolidados como um sistema de estudo de membranas biológicas. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica (SESSA & WEISSMANN, 1970). Nesse contexto, Gregoriadis e Ryman (1971) propuseram algo inédito ao utilizar os lipossomas como sistema transportador de fármacos, o que foi marcante para o desenvolvimento dessa área.

Os lipossomas são constituídos por vesículas com uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e são utilizados como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico (BATISTA *et al.*, 2007) (Figura 1, pág. 23). Eles podem ser classificados de acordo com o número de bicamadas (unilamelar e multilamelar) e tamanho (pequeno, médio ou grande).

Figura 1 – Representação esquemática de lipossomas (A) unilamelares e (B) multilamelares.



Fonte: Adaptado de SEN & MANDAL (2013).

As vesículas unilamelares compreendem uma única bicamada lipídica e, geralmente, têm diâmetro de 50-250 nm. Elas contêm um núcleo aquoso e são preferencialmente utilizadas para encapsular fármacos solúveis em água. Já as vesículas multilamelares, possuem várias bicamadas lipídicas concêntricas e com diâmetros menores que 1 μm , o que permite o carregamento de substâncias lipossolúveis, devido ao seu conteúdo lipídico elevado (IMMORDINO *et al.*, 2006).

Desde a sua criação, a comunidade científica tem demonstrado muito entusiasmo com a utilização dos lipossomas na terapêutica. No entanto, devido à sua instabilidade coloidal e biológica e a baixa taxa de encapsulamento, esse sistema mostrou sua limitação (ALLEN, 1994). As formulações lipossomais conhecidas como os C-lipossomas ou lipossomas convencionais, possuem tempo de meia vida de circulação de apenas alguns minutos, isso porque são rapidamente absorvidos pelas células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF). Dessa forma, seu uso é restrito ao tratamento de algumas doenças, como as leishmanioses (ALVING *et al.*, 1978).

Dentre as áreas de maior aplicação dos lipossomas, a do tratamento do câncer apresenta o maior destaque. Sabe-se que o termo câncer refere-se a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células invasoras de tecidos e órgãos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Apesar dos

avanços significativos na pesquisa biomédica durante as últimas décadas, o câncer continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, com uma probabilidade de prevalência crescente. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) apenas em 2012 foram registrados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes.

Para aplicações, como no tratamento do câncer, foi necessário desenvolver lipossomas com maior tempo de circulação, sendo conhecidos como lipossomas furtivos, ou de longa circulação, ou ainda estericamente estabilizados. Eles podem ser obtidos por diferentes métodos, incluindo o revestimento da superfície das vesículas com componentes hidrofílicos naturais, como os monossilogangliosídeos, ou a partir de polímeros hidrofílicos sintéticos derivados do polietilenoglicol (PEG), como a diestearoilfosfatidiletanolamina – PEG (DSPE-PEG). Nesses casos ocorre redução do reconhecimento e captura dos lipossomas pelas células do SMF, culminando em uma circulação mais prolongada (SAGRISTÁ *et al.*, 2000; TORCHILIN, 2005).

Algumas formulações lipossomais aplicadas no tratamento do câncer já foram aprovadas ou estão em fase de ensaios clínicos. O primeiro medicamento lipossomal a ser introduzido no mercado foi a doxorubicina (Doxil/Caelix) no ano de 1995, sendo empregado no tratamento do sarcoma de Kaposi associado à Aids. Outras formulações para tratamento do câncer também estão no mercado, como o Myocet® e o DaunoXome®, que apresentam como característica a redução significativa da toxicidade cardíaca associada ao fármaco doxorubicina (Tabela 1, pág. 25) (BELFIORE *et al.*, 2018).

Apesar de haver apenas um número relativamente pequeno de fármacos nanoencapsulados aprovados para o uso, os diferentes sistemas nanoestruturados constituem uma parte crescente dentro do arsenal terapêutico da oncologia para as próximas décadas (SCHEINBERG *et al.*, 2010; JEONG *et al.*, 2016). Mesmo atualmente existindo uma enorme gama de novos materiais nanoestruturados, biodegradáveis ou não, os lipossomas ainda destacam-se como um dos mais eficientes carreadores seletivos de fármacos para o tratamento do câncer, por oferecerem a possibilidade de encapsular fármacos pouco solúveis, proteger moléculas terapêuticas e modificar a sua circulação sanguínea e distribuição nos tecidos (WHITEHEAD *et al.*, 2009; ALEXIS *et al.*, 2008; BERTRAND & LEROUX, 2012).

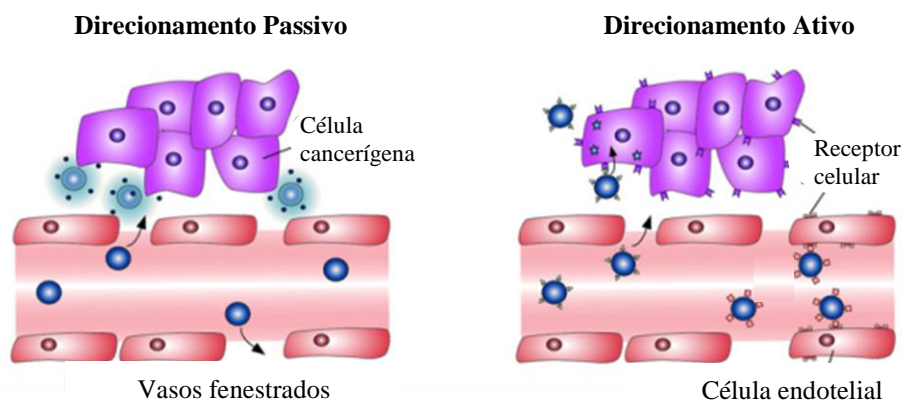
Tabela 1 – Formulações de lipossomas aprovadas e em fase de teste para o tratamento do câncer.

Produto	Fármaco	Composição	Situação	Doença
DaunoXome®	Daunorrubicina	Lipossoma	Aprovado FDA (1996)	Sarcoma de Kaposi
Doxil®/Caelyx®	Doxorrubicina	Lipossoma PEGuilado	Aprovado FDA (1995)	Carcinoma metastático de ovário e mama, Sarcoma de Kaposi
Lipo-Dox™	Doxorrubicina	Lipossoma PEGuilado	Aprovado EMA (2000)	Sarcoma de Kaposi, câncer de mama e de ovário
Marqibo®	Sulfato de vincristina	Lipossoma	Aprovado FDA (2012)	Cromossomo Philadelphia negativo e leucemia linfoblástica aguda
Myocet®	Doxorrubicina	Lipossoma	Aprovado EMA (2000)	Carcinoma metastático de mama
Onivyde®	Irinotecano	Lipossoma PEGuilado	Aprovado FDA (2015)	Carcinoma metastático pancreas
Vyxeos™	Daunorrubicina, citarabina	Lipossoma	Aprovado FDA (2017)	Leucemia mieloide aguda
LEP-ETU	Paclitaxel	Lipossoma	Ensaio clínico fase IV	Câncer de ovário
EndoTAG-1	Paclitaxel	Lipossoma	Ensaio clínico fase III	Câncer de mama e pâncreas
Citarabina Lipossomal	Citarabina	Lipossoma	Ensaio clínico fase III	Câncer de mama
ThermoDox	Doxorrubicina	Lipossoma	Ensaio clínico fase III	Carcinoma hepático
Sulfato vincristina lipossomal	Vincristina	Lipossoma	Ensaio clínico fase II	Leucemia mieloide aguda
LiPlaCis	Cisplatina	Lipossoma	Ensaio clínico fase I/II	Tumores sólidos avançados
Dexametasona lipossomal	Dexametasona	Lipossoma	Ensaio clínico fase I/II	Mieloma múltiplo
MM-398	Irinotecano	Lipossoma	Ensaio clínico fase I	Tumores sólidos recorrentes
Imunolipossoma Anti-EGFR	Doxorrubicina	Lipossoma Target Ativo Fragmento Fab Cetuximab	Ensaio clínico fase II	Câncer mama

Fonte: BELFIORE *et al.*, 2018.

Devido às características específicas do microambiente tumoral, é possível projetar sistemas de entrega de fármacos visando o seu direcionamento para o tumor. Isso acontece quando são exploradas as alterações vasculares dos tumores promovidas pela angiogênese. Em geral, os capilares da região tumoral possuem permeabilidade aumentada, o que permite o direcionamento passivo dos lipossomas, desde que estes possuam tamanho menor do que as fenestrações entre as células endoteliais. Assim, os lipossomas podem penetrar no interstício e ficar retidos nos tecidos tumorais. Essa abordagem terapêutica é conhecida como efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention Effect*). No direcionamento ativo, em geral, utiliza-se um ligante na superfície dos lipossomas que pode interagir com receptores superexpressados nas células alvo. Assim, o fármaco é entregue a um local específico com base no reconhecimento molecular (Figura 2) (DANHIER *et al.*, 2012). Atualmente todas as formulações lipossomais clinicamente aprovadas não possuem receptores em sua superfície, sendo a eficácia dependente exclusivamente do direcionamento passivo para acúmulo na região tumoral.

Figura 2 – Representação esquemática das diferentes estratégias de direcionamentos lipossomais.



Fonte: Adaptado de WICKI *et al.* (2015).

Nas estratégias de direcionamento passivo, é fundamental que os lipossomas apresentem um tempo de circulação sanguíneo longo. Isso permite uma maior acumulação do fármaco no tumor devido ao maior número de passagens pela região tumoral. Normalmente, esse objetivo pode ser alcançado pela incorporação de polímeros hidrofílicos como o PEG, obtendo-se lipossomas furtivos (LEHNER *et al.*, 2013). Entretanto, observa-se que os lipossomas apresentam uma alta taxa de captação pelos tecidos ricos em macrófagos, mesmo sendo utilizados polímeros derivados do PEG. O reconhecimento celular dos lipossomas e a

sua associação com as opsoninas do plasma fazem com que eles sejam captados pelas células do SMF, principalmente as células de Kupffer no fígado.

Estudos de biodistribuição conduzidos por Soares e colaboradores (2011) utilizando uma formulação de lipossomas contendo DSPE-PEG₂₀₀₀ em sua composição, mostraram uma captação mais expressiva das vesículas no fígado, baço e rins. O mesmo perfil foi encontrado por Barros e colaboradores (2015) após administração de lipossomas de longa circulação. A partir da observação desses resultados e de vários outros presentes na literatura, fica claro que mesmo utilizando lipossomas PEGuilados para promover um maior tempo de circulação, os resultados ainda não são satisfatórios.

2.2 Uso de polímeros sintéticos e suas limitações

Nos últimos anos, o PEG tem sido amplamente empregado nas pesquisas com lipossomas e outros sistemas nanoestruturados objetivando aumentar o seu tempo de circulação (YANG *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2012). Entretanto, sabe-se que o PEG não é um composto biodegradável e, embora haja evidência de uma enzima capaz de oxidá-lo a aldeídos e cetonas, este não é um mecanismo de eliminação convencional (CALICETE & VERONESE, 2003).

Durante muito tempo, acreditou-se que os lipossomas modificados com o PEG não possuíam imunogenicidade ou, quando a apresentavam, ela era insignificante. No entanto, estudos mais recentes apontam que os lipossomas PEGuilados têm induzido respostas imunes significativas quando injetados em doses repetidas em animais. Ao serem administrados em intervalos sequenciais de tempo, os lipossomas PEGuilados passam a ter uma redução no tempo de circulação e um aumento na acumulação hepática e esplênica. Esse fenômeno é conhecido como depuração acelerada do sangue (ABC = “*accelerated blood clearance*”) (DAMS *et al.*, 2000; LAVERMAN *et al.*, 2001; ISHIDA *et al.*, 2006a).

A imunogenicidade dos lipossomas PEGuilados, associada à sua captação pelos órgãos ricos em macrófagos, representa uma barreira para a pesquisa de formulações lipossomais e para a utilização clínica destes. Essa resposta imune também é observada quando há administração repetida de outros nano transportadores PEGuilados, tais como as microemulsões e as proteínas PEGuiladas (XU *et al.*, 2010).

Lu e colaboradores (2007) investigaram os perfis farmacocinéticos da aplicação da segunda dose de albumina de soro bovino catiônico (CBSA) conjugada com nanopartículas de ácido polilático PEGuiladas (PLA-PEG). O estudo confirmou a ocorrência do efeito ABC

nas repetidas injeções. Nesse trabalho, os fatores que influenciaram e regularam a ocorrência do fenômeno ABC foram consistentes com os estudos sobre lipossomas PEGuilados. Ishihara e colaboradores (2009) também relataram a ocorrência de efeito ABC intenso em administrações repetidas de nanopartículas modificadas com PEG em ratos.

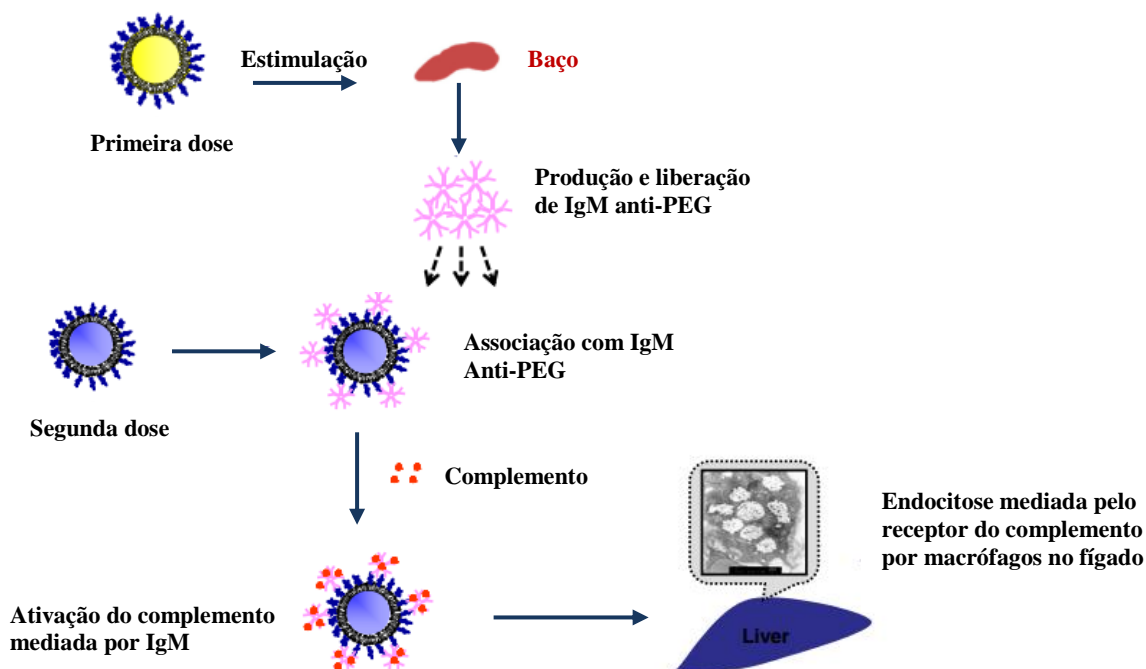
O efeito ABC é induzido por anticorpos IgM anti-PEG, que são produzidos pelo baço em resposta à primeira dose de lipossomas PEGuilados (ISHIDA *et al.*, 2003; ISHIDA *et al.*, 2006b, ISHIDA *et al.*, 2006c). O anticorpo liga-se seletivamente à superfície do PEG dos lipossomas administrados na segunda dose, ativando o sistema do complemento. Isso promove um aumento da absorção pelas células de Kupffer dos lipossomas injetados na segunda dose e acarreta em redução do seu tempo de circulação sanguínea (Figura 3, pág. 29) (XU *et al.*, 2010).

Suzuki e colaboradores (2012) mostraram que a formulação comercial Doxil® foi capaz de induzir o fenômeno ABC em cães da raça beagle em baixas dosagens (< 2 mg DOX/m²). Além disso, em termos de resposta à produção de IgM anti-PEG e indução do fenômeno ABC, foi evidenciado que os cães apresentaram maior sensibilidade aos lipossomas do que roedores. Li e colaboradores (2012) também relataram fenômenos semelhantes na administração de topotecano lipossomal PEGuilado em camundongos, ratos e cães da raça beagle.

Estudos em macacos cynomolgus, roedores, cães e mini pigs mostraram que o fenômeno ABC varia com as espécies animais e com as doses administradas. Doses mais baixas de Doxil® (0,2 a 2 mg DOX/m²) foram mais efetivas em induzir o efeito quando comparadas a doses mais elevadas. O estudo mostrou, ainda, que dosagens superiores a 20 mg DOX/m² não causaram o fenômeno ABC. Dentre os animais avaliados os mini pigs apresentaram maior sensibilidade ao Doxil® (SUZUKI *et al.*, 2014).

Além do papel crucial do sistema do complemento na opsonização dos lipossomas durante o efeito ABC, sabe-se que formulações peguiladas são capazes de ativar o sistema complemento em animais e humanos, levando a uma reação de hipersensibilidade conhecida como Pseudo Alergia Relacionada à Ativação do Complemento (CARPA), que pode impactar diretamente nas propriedades farmacocinéticas do fármaco (SZEBENI *et al.*, 2016). Chanan-Khan e colaboradores (2003) demonstraram que o Doxil® ativou o sistema do complemento em 21 dos 29 pacientes tratados com este fármaco. Além disso, foram observadas reações de hipersensibilidade moderadas a graves em 13 dos 29 pacientes.

Figura 3 – Representação dos eventos que levam a indução do efeito ABC após administração de lipossomas PEGuilados.

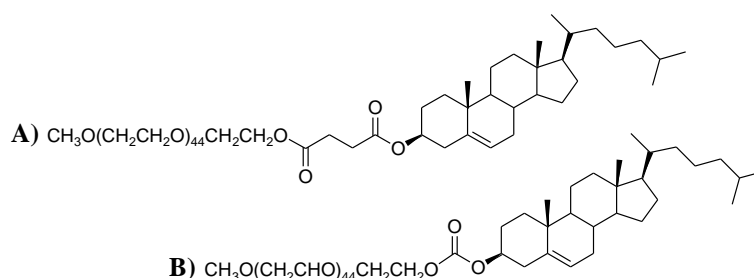


Fonte: Adaptado de LILA *et al.* (2013).

Dentro desse panorama, é possível dizer que a rápida depuração dos lipossomas revestidos por PEG compromete a sua aplicabilidade clínica. Dessa forma, o desenvolvimento de uma estratégia para evitar e/ou aliviar a imunogenicidade dos lipossomas e melhorar sua furtividade é de interesse e mesmo necessária. Várias abordagens têm sido aplicadas a fim de evitar que ocorra o efeito ABC. Algumas delas propõem mudanças nas propriedades físico-químicas dos lipossomas PEGuilados e/ou alteração no regime de administração (LI *et al.*, 2013; KOIDE *et al.*, 2010). Contudo, na maioria desses estudos foram observados uma atenuação na eficácia terapêutica dos lipossomas PEGuilados. Uma outra abordagem tem utilizado diferentes polímeros como alternativa para preparar lipossomas de longa circulação. Por exemplo, têm-se os polímeros biodegradáveis (METSELAAR *et al.*, 2003), o álcool polivinílico (TAKEUCHI *et al.*, 2001), os poli-*N*-vinilpirrolidonas anfífilicos (TORCHILIN *et al.*, 2001) e outros polímeros solúveis como HPMA (poli[*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida]), PVP (polivinilpirrolidona), PMOX (poli(2-metil-2-oxazolona)), PDMA (poli(*N,N*-dimetilacrilamida)) e PAcM (poli(*N*-acrilóil morfolina) (KIERSTEAD *et al.*, 2015).

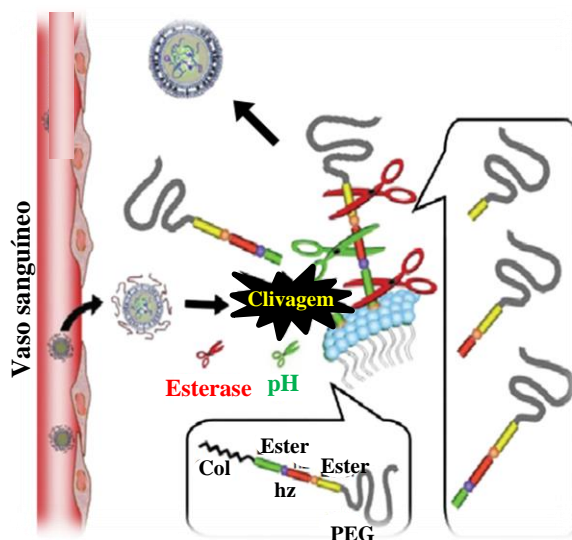
Outras metodologias, baseadas na modificação estrutural do PEG também tem sido propostas. Xu e colaboradores (2008) sintetizaram dois derivados lipídicos de PEG (PEG-CHMC e PEG-CHEMS) que foram unidos através de uma ligação do tipo éster (Figura 4), de modo que o PEG fosse clivado pelas esterases presentes na circulação sanguínea. Os resultados mostraram que os lipossomas PEGuilados preparados com os derivados cliváveis atenuaram o fenômeno ABC (XU *et al.*, 2010).

Figura 4 – Estrutura dos derivados potietilenoglicol PEG-CHMC (A) e PEG-CHEMS (B).



Chen e colaboradores (2011) também sintetizaram um derivado clivável do polietilenoglicol (PEG-Hz-CHEMS), no qual o polímero foi ligado ao colesterol através de duas ligações éster e uma hidrazona pH sensível (Figura 5). Os resultados mostraram que os lipossomas modificados com este novo derivado apresentaram circulação sanguínea prolongada quando comparados a lipossomas modificados com o derivado lipídico PEG-CHEMS. Além disso, após administrações repetidas de lipossomas modificados com PEG-Hz-CHEMS, não foi observado indução do efeito ABC.

Figura 5 – Esquema do derivado clivável do polietilenoglicol (PEG-Hz-CHEMS).



Fonte: Adaptado de LILA *et al.* (2013).

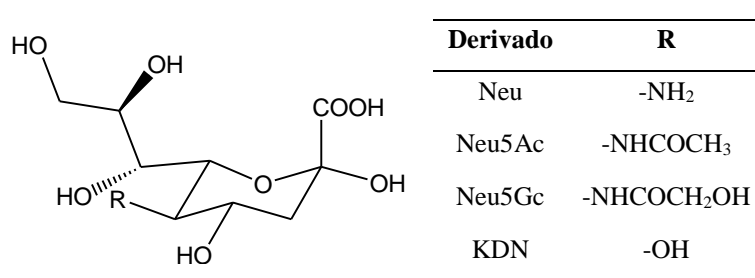
Além dos polímeros sintéticos, uma proposta que parece ser bastante promissora é o uso de compostos hidrofílicos naturais, como os carboidratos, na superfície lipossomal.

2.3 Carboidratos

As quatro principais classes de moléculas orgânicas presentes nos seres vivos incluem os carboidratos, as proteínas, os lipídios e os ácidos nucleicos. Sabe-se que os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza, sendo metabolizados e sintetizados por praticamente todos os organismos vivos. A diversidade estrutural e a complexidade dos carboidratos na superfície celular permite que eles funcionem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão. Além disso, eles estão envolvidos em várias funções fisiologicamente importantes, que incluem o desenvolvimento embrionário, diferenciação e o crescimento celular, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, velocidade de degradação e a rigidez da membrana celular (GHAZARIAN *et al.*, 2011).

Estudos realizados com as células vermelhas do sangue (hemácias) revelaram que a sua superfície apresentava grandes quantidades de glicolípides e ácido siálico (Figura 6). Essa observação contribuiu para o desenvolvimento dos lipossomas de longa circulação, pois se acreditava que essas substâncias eram essenciais para manter a circulação prolongada dessas células no sangue. A partir disso, iniciaram-se os estudos do efeito de polissacarídeos e de glicolípides no tempo de circulação dos lipossomas (ALLEN, 1994).

Figura 6 – Estrutura do ácido siálico e seus principais derivados.

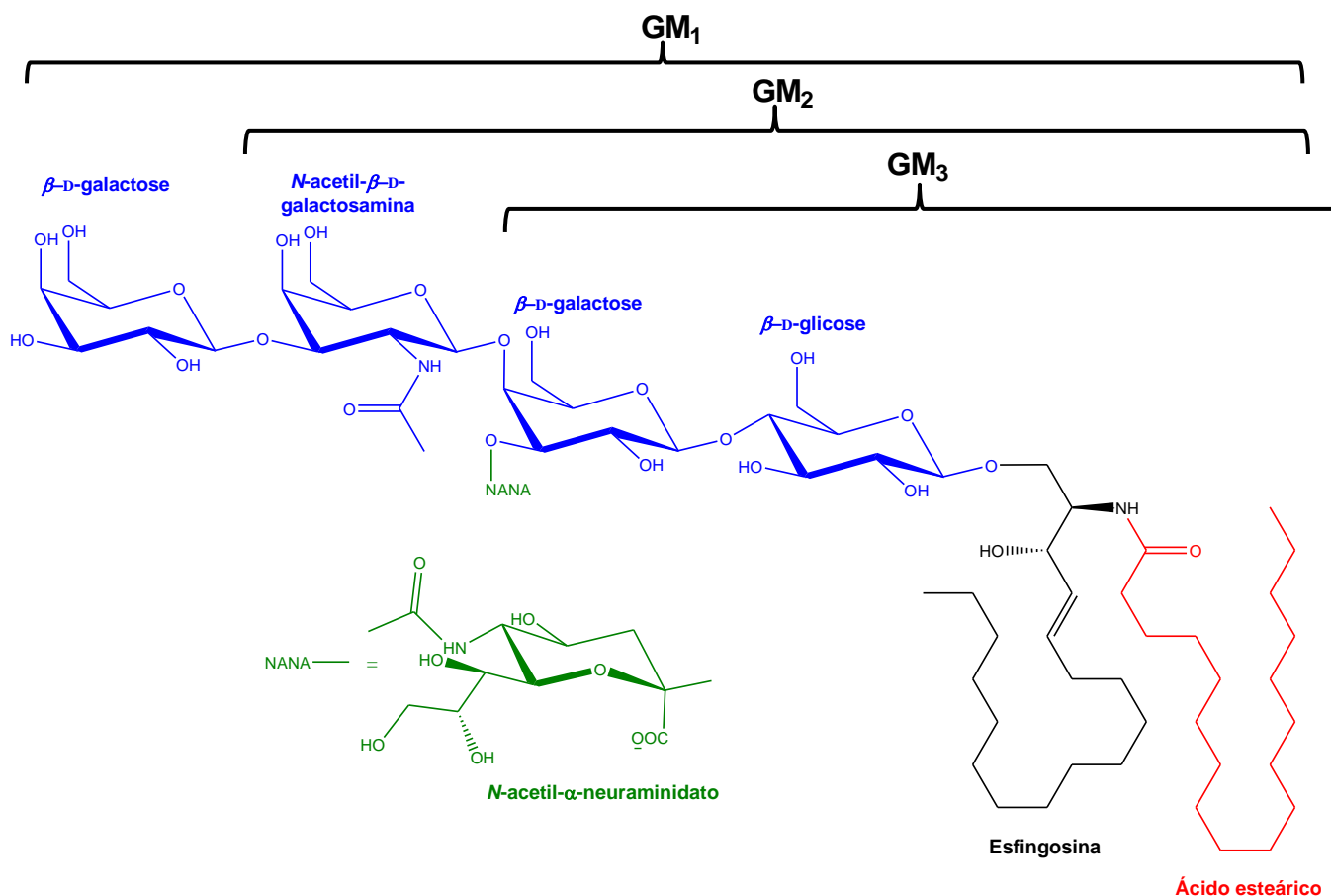


Um dos primeiros estudos que mostram as propriedades furtivas de lipossomas revestidos por carboidratos foi conduzido por Pain e colaboradores (1984). O estudo, utilizando dextrano conjugado à superfície dos lipossomas, mostrou um aumento de duas vezes na concentração de lipossomas no sangue, após duas horas da injeção. Sunamoto (1986) também utilizou polissacarídeos para aumentar a estabilidade de lipossomas *in vivo* e reduzir a sua absorção pelas células do SFM, tais como dextrans e pululanos.

Estudos utilizando glicolípides na superfície dos lipossomas, como os monossialogangliosídeos (GM) (Figura 7) também apresentaram furtividade. Gabizon e Papahadjopoulos (1988) mostraram que os lipossomas modificados com GM1 foram 3,4 vezes menos captados pelo SMF quando comparados aos lipossomas convencionais. Posteriormente, Liu e colaboradores (1991) observaram que os lipossomas revestidos com GM1 poderiam escapar da absorção pelas células do SMF, confirmando ser uma vantagem a incorporação de substâncias hidrofílicas naturais na superfície lipossomal.

Para comparar os efeitos de longa circulação promovidos pelo PEG e o GM1, Maruyama e colaboradores (1994) prepararam lipossomas contendo doxorubicina (DOX) revestidos com GM1 ou PEG. Após 6 horas da administração por via intravenosa em camundongos, as concentrações do fármaco na corrente sanguínea foram 2,3 e 2,9 vezes maiores para sistemas contendo GM1 e PEG, em comparação aos sistemas convencionais, respectivamente. Entretanto, os índices de absorção de lipossomas contendo GM1 e PEG no sangue/SMF foram aumentados em 4,6 vezes e 7,3 vezes, respectivamente.

Figura 7 – Estrutura química dos monossialogangliosídeos.



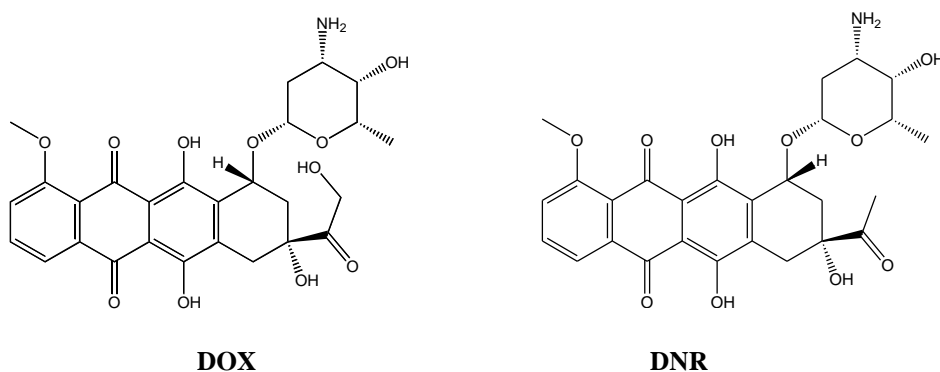
Além da possibilidade de aumentar o tempo de meia vida dos lipossomas, os carboidratos também podem conferir um direcionamento ativo a locais específicos quando adicionados à superfície das nanoestruturas (CHEN *et al.*, 2016). O direcionamento é alcançado quando as estruturas presentes na superfície dos lipossomas se ligam a receptores expressos na superfície da célula tumoral. Após sua internalização, geralmente via endocitose mediada por receptor, o fármaco é liberado no local específico. As formulações lipossomais com direcionamento ativo, em geral, também possuem propriedades para entrega de fármaco por direcionamento passivo. Dessa forma, lipossomas que contemplam ambas as estratégias podem apresentar uma entrega de fármaco mais eficiente quando comparados a lipossomas sem ligantes específicos (BELFIORE *et al.* 2018).

Considerando a relevância desses resultados e a necessidade do desenvolvimento de lipossomas com propriedades furtivas mais eficientes, torna-se claro que estudos envolvendo o uso de carboidratos na superfície dos lipossomas pode ser uma estratégia promissora para aumentar o seu tempo de circulação, e assim, buscar aplicações terapêuticas mais eficazes.

2.4 Terapia do câncer com antraciclinas

As antraciclinas são antitumorais eficazes amplamente empregadas no tratamento de muitas neoplasias malignas. As primeiras antraciclinas identificadas com aplicação quimioterápica foram a DOX e a daunorrubicina (DNR) (Figura 8), isoladas a partir de *Streptomyces peucetius* no início da década de 1960. Ambos os fármacos são constituídos de uma porção aglicônica, formada por um derivado antraquinônico e uma porção glicosídica, chamada daunosamina. A única diferença entre estas duas moléculas está na cadeia lateral, enquanto a DOX apresenta um álcool primário, a DNR apresenta um grupo metila

Figura 8 – Estrutura química das substâncias doxorubicina (DOX) e daunorrubicina (DNR).



2.4.1 Doxorrubicina

A DOX é um dos fármacos antineoplásicos mais potentes, com um amplo espectro de ação. Suas principais aplicações são para o tratamento de tumores sólidos e doenças malignas hematológicas, câncer de mama, canais biliares, próstata, útero, ovário, esôfago, estômago, tumores do fígado, osteosarcomas, sarcomas de tecidos moles, sarcoma de Kaposi, bem como leucemia mieloblástica e linfoblástica aguda (CARVALHO *et al.*, 2009).

Muitos estudos atribuem a atividade antitumoral da DOX à sua capacidade de se intercalar à hélice do DNA e/ou ligar-se covalentemente às proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA. Tais interações resultam na inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, culminando com a morte celular (CARVALHO *et al.*, 2009).

A dose de DOX deve ser cuidadosamente considerada para cada caso, uma vez que a utilização deste agente quimioterápico pode conduzir a vários efeitos adversos em diferentes órgãos, incluindo o coração, cérebro, fígado e rins. Além dos efeitos secundários comuns, como mielosupressão, náuseas, vômitos, estomatite, distúrbios intestinais e alopecia, um grande problema associado ao uso da DOX é a sua cardiotoxicidade. (AGUDELO *et al.*, 2014; KIZEK *et al.*, 2012).

A estratégia mais eficaz para diminuir a cardiotoxicidade das antraciclina envolve a sua encapsulação em lipossomas, responsável por alterar a sua distribuição nos tecidos e a sua farmacocinética. A segurança cardíaca da doxorrubicina lipossomal e da doxorrubicina lipossomal PEGuilada foi estudada em uma série de ensaios clínicos. Os resultados revelaram que o risco de cardiotoxicidade induzida pela antraciclina é consideravelmente menor quando ela está na forma lipossomal (SAFRA, 2003; GABIZON *et al.*, 2012).

O Doxil[®] foi primeira formulação contendo doxorrubicina encapsulada em lipossomas aprovada para uso clínico. Ela tem sido utilizada principalmente para o tratamento de Sarcoma de Kaposi associado a AIDS e câncer metastático de ovário e mama. Apesar de ser uma formulação contendo PEG na superfície lipossomal, o Doxil[®] também tende a se acumular em órgãos como fígado e rins (SOUNDARARAJAN *et al.*, 2009). Assim, a pesquisa por substâncias que possuam propriedades mais furtivas que o PEG e possam diminuir o reconhecimento imunológico e conseqüentemente aumentar o tempo de circulação sanguíneo destas vesículas torna-se necessário. Tais características melhorariam a biodisponibilidade dos fármacos encapsulados, diminuiriam os efeitos adversos, o que garantiria uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

CAPÍTULO I

Síntese e caracterização dos glicosiltriazóis derivados da D-glicose, D-galactose e *N*- acetilglicosamina

1 Introdução

Juntamente com os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, os carboidratos são uma das quatro principais classes de biomoléculas. Diversos fatores tornam os carboidratos candidatos promissores para aplicação em nanomedicina, dentre eles: são compostos quimicamente bem definidos, biocompatíveis e biodegradáveis, disponíveis em grande quantidade, altamente solúveis em água, além de serem agentes de direcionamento ativo (SWIERCZEWSKA *et al.*, 2016).

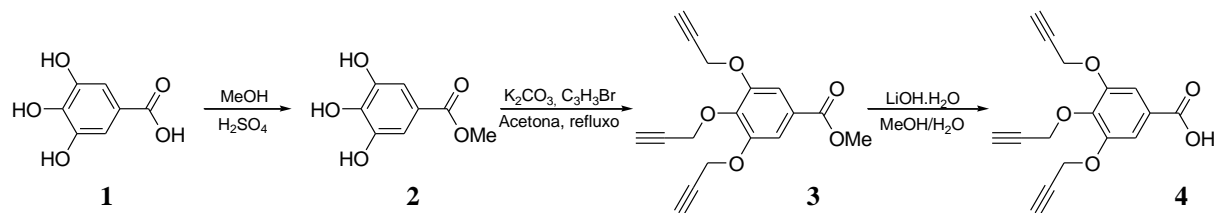
A utilização de carboidratos na superfície das nanoestruturas tem crescido nos últimos anos e várias estratégias para incorporação destes compostos são utilizadas. A principal abordagem envolve a funcionalização das substâncias utilizadas no preparo das nanoestruturas, de forma covalente ou não covalente. Os protocolos covalentes são geralmente preferidos, devido à estabilidade consideravelmente maior quando comparados à abordagem não covalente, onde os carboidratos são ancorados à superfície das nanoestruturas através de interações eletrostáticas (JEBALI *et al.*, 2017).

A inserção de carboidratos à superfície dos lipossomas, em geral, ocorre através da sua conjugação com estruturas presentes na bicamada lipídica, como, por exemplo, o colesterol. Diversos estudos na literatura mostram que este esteroide reduz a permeabilidade de moléculas hidrofílicas através da membrana, melhora a fluidez, bem como a estabilidade da membrana na presença de fluidos biológicos (NOGUEIRA *et al.*, 2015), sendo, portanto, uma substância com características adequadas para ancoragem dos carboidratos.

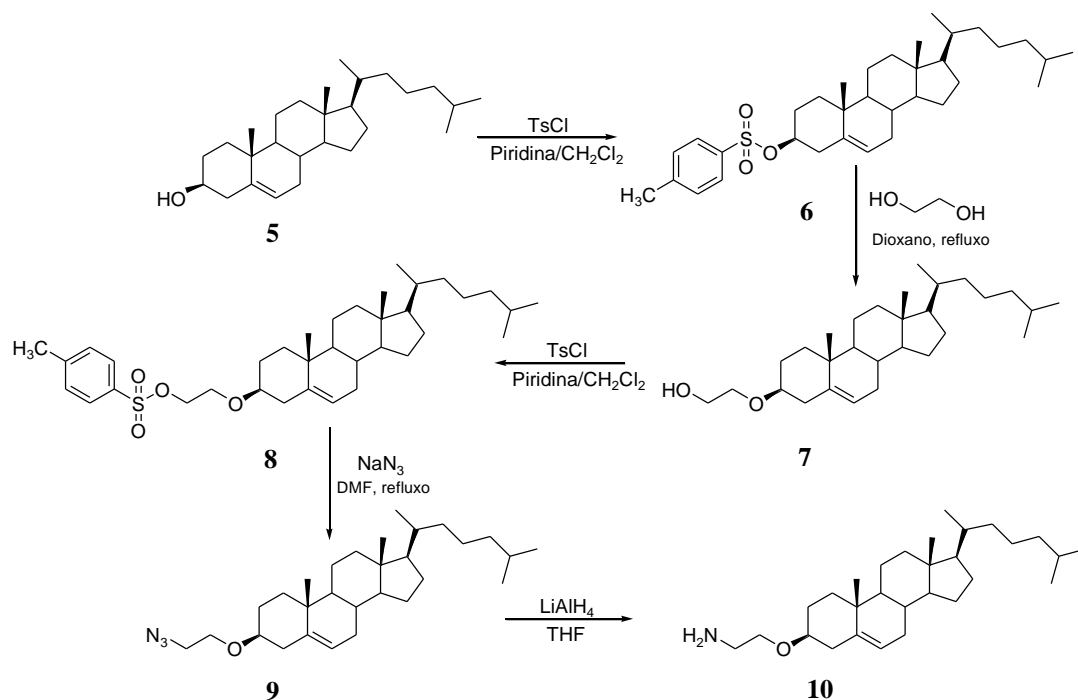
Desta forma, esta etapa do nosso estudo consiste em sintetizar três glicosiltriazóis acoplados ao colesterol para posterior preparo dos lipossomas. Neste capítulo será abordada a síntese e caracterização de todos os compostos propostos.

2 Proposta de trabalho

A síntese dos glicosiltriazóis está dividida em seis etapas principais, que serão discutidas a seguir. A primeira etapa consiste na obtenção do núcleo contendo três alcinos terminais (**4**) a partir do ácido gálico (**1**) (Esquema 1, pág. 37). Inicialmente, o ácido gálico (**1**) pode ser esterificado em condições ácidas (esterificação de Fisher) para obtenção do galato de metila (**2**). Em seguida, a *O*-alquilação do composto **2** pode ser realizada sob condições básicas, na presença de bometo de propargila, para obtenção do composto **3**. Finalmente, a hidrólise em meio alcalino do composto **3** leva à obtenção do éter propargílico derivado do ácido gálico **4**.

Esquema 1 – Proposta de síntese do núcleo contendo três alcinos terminais.

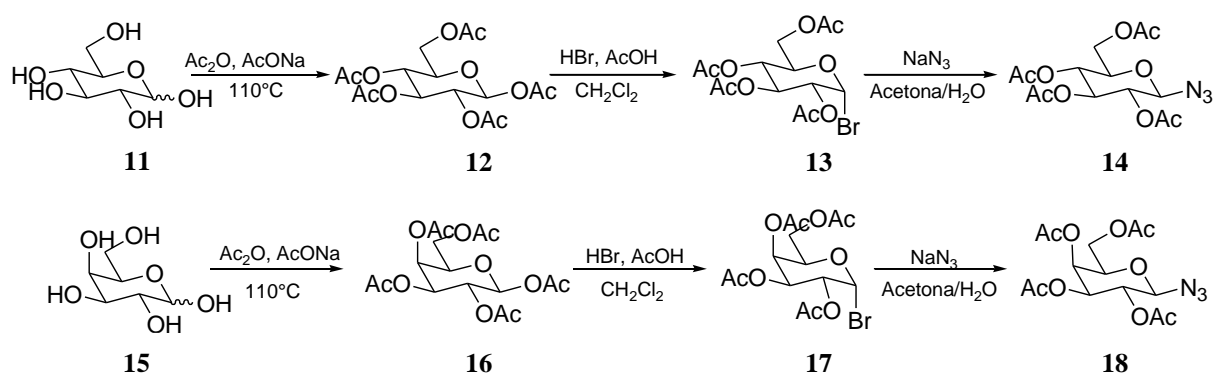
A segunda etapa deste trabalho consiste na obtenção do derivado 2-aminoetila do colesterol (**10**). Inicialmente pode ser feita a tosilação do colesterol, para obtenção do composto **6**. Em seguida, o composto **7** pode ser obtido utilizando-se etilenoglicol. Este composto, por sua vez, pode ser submetido à tosilação, para obtenção do composto **8**. Em seguida, pode ser feita uma reação de substituição nucleofílica bimolecular com azida de sódio levando à formação do azido-colesterol (**9**). Por fim, o derivado **9** pode ser convertido no 2-aminoetila colesterol (**10**) por redução do grupo azido com hidreto de lítio e alumínio (Esquema 2).

Esquema 2 – Proposta de síntese do 3-*O*-(2-aminoetil)colesterol.

A terceira etapa deste trabalho envolve a síntese das azidas derivadas de carboidratos. Foram propostas três azidas derivadas dos seguintes carboidratos: D-glicose, D-galactose e *N*-acetilglicosamina. Os derivados foram propostos com o objetivo de avaliar a furtividade de cada um deles quando incorporados à superfície dos lipossomas.

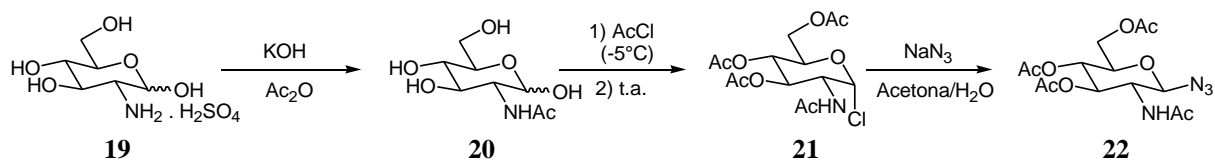
Para a síntese das azidas derivadas da D-glicose e D-galactose a rota se inicia com a proteção das hidroxilas dos carboidratos na forma de grupos acetato. Em seguida, os derivados per-*O*-acetilados **12** e **16** podem ser convertidos nos brometos de glicosila **13** e **17**, respectivamente. Posteriormente, estes derivados podem ser submetidos à reação de substituição nucleofílica bimolecular com azida de sódio, obtendo-se as azidas **14** e **18** (Esquema 3).

Esquema 3 – Proposta de síntese das azidas derivadas da D-glicose e D-galactose.



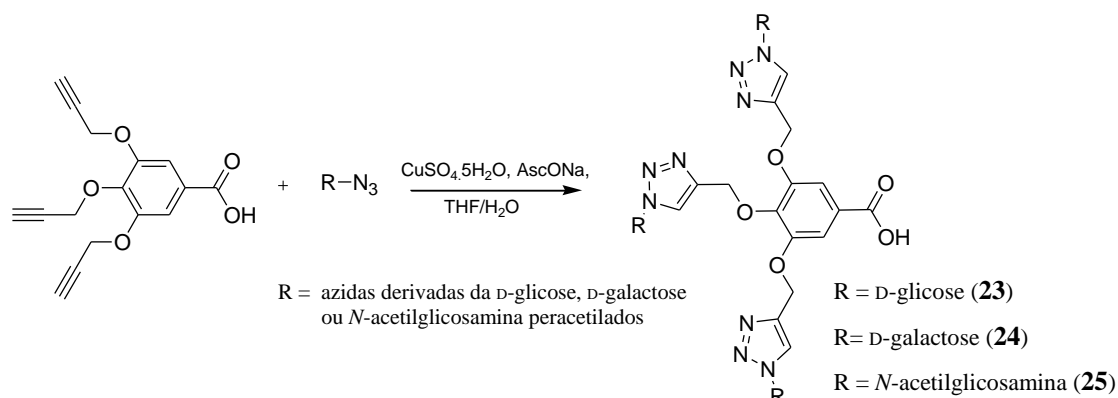
A azida derivada da *N*-acetilglicosamina pode ser obtida por uma rota alternativa, tendo como material de partida o reagente comercial sulfato de glicosamina (**19**). Inicialmente o sulfato pode ser convertido na *N*-acetilglicosamina através de acetilação em meio básico. Em seguida, pode-se obter o cloreto de glicosila per-*O*-acetilado pela reação de **20** com cloreto de acetila em sistema vedado. O cloreto de glicosila **21** pode ser submetido à reação de substituição nucleofílica bimolecular com a azida de sódio para obtenção da azida **22** (Esquema 4).

Esquema 4 – Proposta de síntese da azida derivada da *N*-acetilglicosamina.



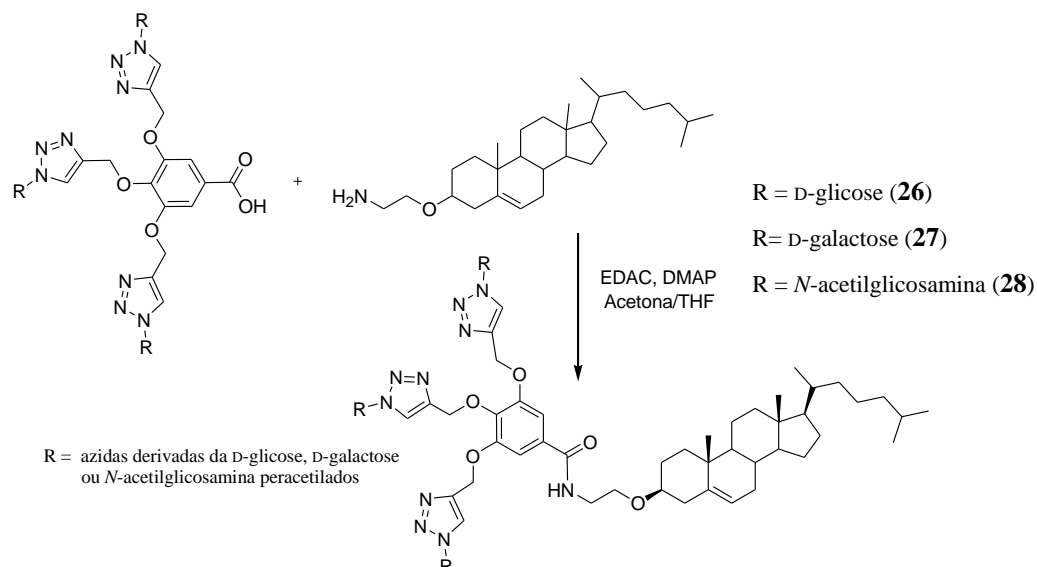
A quarta etapa deste trabalho consiste na obtenção dos derivados 1,2,3-triazólicos, a partir da cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I) entre um alcino terminal, no caso, o éter propargílico do ácido gálico (**4**) e as diferentes azidas orgânicas derivadas dos carboidratos (**14**, **18**, **22**) (Esquema 5, pág. 39).

Esquema 5 – Proposta de síntese dos derivados 1,2,3-triazólicos.



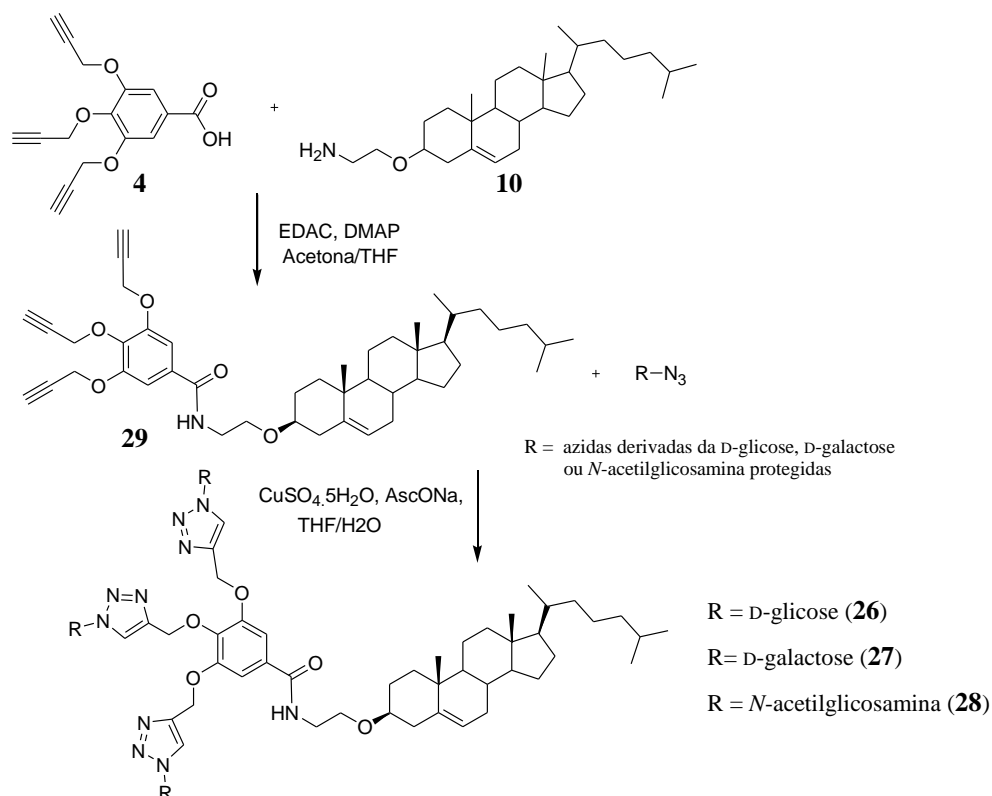
Na quinta etapa do trabalho propõe-se a obtenção de amidas, obtidas a partir dos derivados triazólicos (**23**, **24**, **25**) e do derivado 2-aminoetila do colesterol (**10**). A obtenção destes compostos pode ser feita utilizando-se reagentes de acoplamento, conforme mostrado no Esquema 6.

Esquema 6 – Proposta de síntese de amidas a partir dos derivados triazólicos **23**, **24** e **25** e do derivado 2-aminoetila do colesterol.



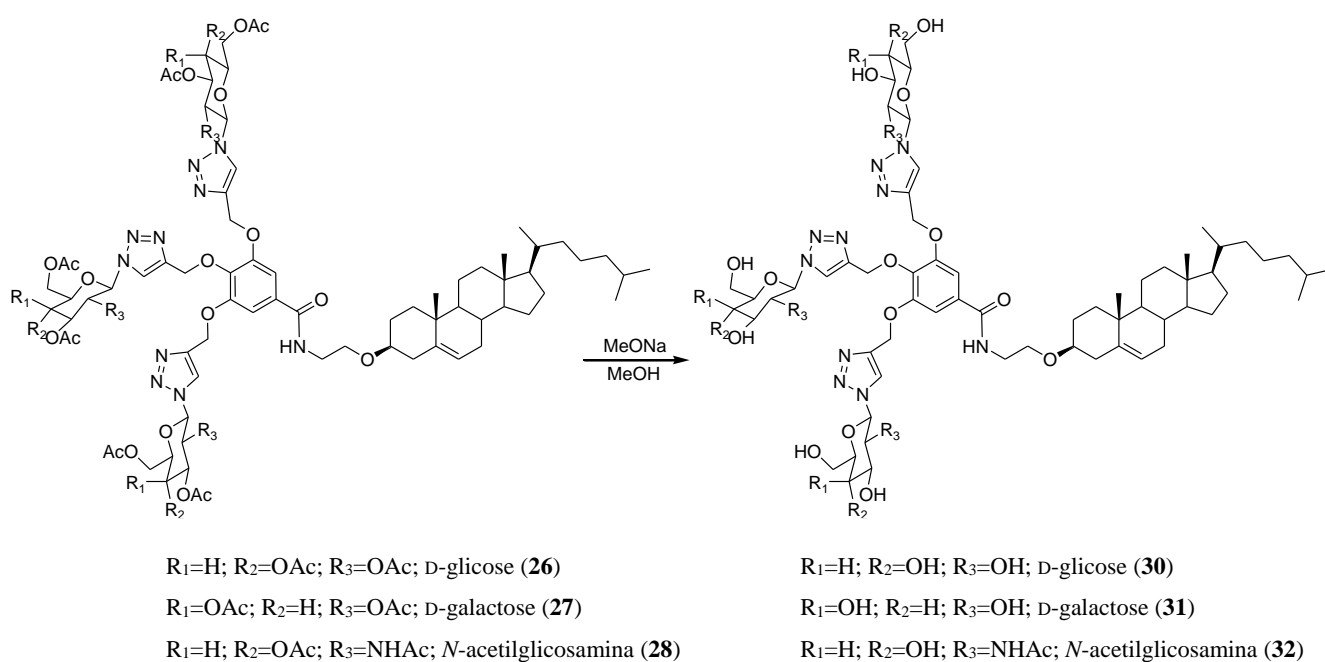
A fim de se avaliar uma rota de síntese alternativa para a obtenção das amidas, também foi proposto a obtenção da amida **29**, que pode ser obtida através de reação entre o núcleo contendo alcino terminal (**4**) e o derivado 2-aminoetila (**10**). Dessa forma, o composto obtido (**29**) pode ser utilizado na obtenção dos compostos **26**, **27** e **28**, utilizando-se as mesmas condições propostas para os triazóis **23**, **24** e **25** (Esquema 7, pág. 40)

Esquema 7 – Proposta de síntese alternativa para obtenção das amidas **26**, **27** e **28**.



Finalmente, a última etapa de síntese consiste na remoção dos grupos protetores dos derivados glicosídicos por meio do método de Zémplen (Esquema 8). Os derivados desprotegidos obtidos foram utilizados para o preparo de lipossomas.

Esquema 8 – Proposta de desproteção dos glicosídeos.



3 Parte experimental

3.1 Materiais e métodos

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF 301 (Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG) e não foram corrigidas.

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro Spectrum One Perkin-Elmer (Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG), com sistema ATR. Para a atribuição de bandas no infravermelho utilizaram-se como referência os livros do PAVIA e colaboradores (2010) e BARBOSA (2011).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetros BRUKER AVANCE DRX 400 e BRUKER AVANCE DPX 200 do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – LAREMAR (Departamento de Química, ICEX, UFMG). Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS) ou o sinal do solvente. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz). As multiplicidades foram abreviadas da seguinte maneira: s (simpleto), sl (sinal largo), d (duplete), dd (duplete duplo), t (triplete), m (multiplete), qn (quinteto), dt (duplete triplo) e td (triplete duplo). Para processar os espectros utilizaram-se os programas BRUKER TOPSPIN 3.0.

Os espectros de massas ESI-MS por injeção direta foram realizados em espectrômetro de massas aparelho q-ToF Maxis 3G (Bruker Daltonics) com ionização por electrospray na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

As análises por LC-MS foram realizadas no Instituto René Rachou (Fiocruz Minas) em um sistema Nexera UHPLC (Shimadzu) acoplado a espectrômetro de massas ESI-QTOF. Soluções das amostras foram injetadas em uma coluna da Shimadzu Shimpack XR-ODS-III (C_{18} , 2,2 μm , 2,0 \times 150 mm) com uma taxa de fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizando como fase móvel mistura 1:1 de água e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

Análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF foram realizadas no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em instrumentos AutoFlex III (Bruker Daltonics), operados em modo positivo/reflector e controlados pelo software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). As amostras foram misturadas em soluções contendo as matrizes ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e ácido 2,5-dihidroxibenzóico (s-DHB) diretamente sobre uma placa de metal MTP AnchorChip-400/384 (BrukerDaltonics) e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram adquiridos pelo software FlexAnalysis 3.0 (BrukerDaltonics).

A numeração atribuída nas estruturas não corresponde à numeração da nomenclatura IUPAC. Isso foi feito para facilitar a atribuição dos sinais.

Para cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh) Merk e sílica gel 60 (230-400 mesh). Para cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60 G Merck com espessura de 0,25 mm.

3.1.1 Secagem e purificação dos solventes e reagentes

Os reagentes e solventes foram secos e purificados conforme técnicas descritas na literatura (WILLIAMS & LAWTON, 2010; FERREIRA, 1992). O diclorometano anidro foi inicialmente destilado e armazenado em peneira molecular 3 Å (previamente ativada em manta aquecedora a 250 °C, por 2 horas). A resina amberlite IRA 120 foi lavada com metanol e posteriormente filtrada.

O metanol anidro foi obtido da seguinte forma: em um gral de porcelana foram triturados 0,05 g de iodo juntamente com 0,5 g de magnésio em raspas. Em seguida este material foi transferido para um balão acoplado a um funil de adição e a um condensador de refluxo. Foram adicionados 15 mL de metanol ao balão e iniciado o aquecimento até o completo desaparecimento da coloração característica do iodo. Por fim, adicionaram-se 85 mL de metanol e o sistema foi mantido em refluxo por aproximadamente 1 hora. O solvente seco foi armazenado em peneira molecular 3 Å.

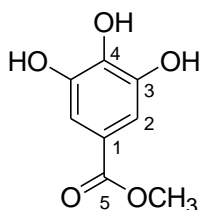
3.1.2 Soluções reveladoras

A solução reveladora etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v foi utilizada para os compostos contendo carboidratos em sua estrutura. Para todas as outras substâncias a solução ácida de CAM (Molibdato Cérico Amoniacal) foi eficiente. Os materiais que possuíam em sua estrutura aminas (primárias ou secundárias) também foram revelados com solução etanólica de ninidrina 1,5% p/v.

3.2 Sínteses

3.2.1 Síntese dos derivados do ácido gálico

3.2.1.1 Síntese de 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila (2) (FUKUDA *et al.*, 2010)



A um balão de fundo redondo de 100 mL, conectado a um condensador de refluxo, foram adicionados 3 g (17,6 mmol) de ácido gálico e 30 mL de metanol anidro. A mistura foi mantida sob agitação e, aos poucos, 0,9 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado. Esta mistura permaneceu por 27 horas sob agitação magnética, à temperatura de 65°C, até completo consumo do material de partida evidenciado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 4:6; reveladores: vapor de iodo, solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: o solvente da reação foi removido a vácuo e o resíduo foi dissolvido em 40 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL) e água destilada (1 x 30 mL). Removeu-se o solvente da fase orgânica em evaporador rotatório (após remover a água residual com Na₂SO₄ anidro). Foram obtidos 3,09 g de um sólido branco.

Rendimento: 98%

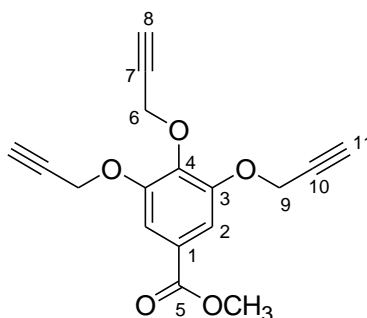
Aspecto físico: sólido branco

FM: C₈H₈O₅ **MM:** 184,0 g mol⁻¹

FF: 197,8-198,9 °C; literatura (MOSTAFA *et al.*, 2006): 197-200 °C

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.1, pág. 164): 3498, 3459, 3290 (ν O-H fenol); 3110, 3085, 3017 (ν C-H aromático); 1689 (ν C=O éster aromático); 1615, 1540, 1470 (ν C=C aromático); 1309, 1193 (ν C-O éster); 1248 (ν C-O éter).

3.2.1.2 Síntese de 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoato de metila (3) (adaptado de FUKUDA *et al.*, 2010)



A um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 1,3 g (7,06 mmol) de **2**, 20 mL de acetona anidra e 8,7 g (63,5 mmol) de carbonato de potássio. Em seguida, foram

adicionados 7,5 g (63,5 mmol) de brometo de propargila. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 20 horas até completo consumo do material de partida evidenciado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 8:2; reveladores: solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: o solvente da reação foi removido com auxílio de ar comprimido até remoção do excesso de brometo de propargila. Em seguida, foram adicionados 50 mL de diclorometano ao balão e filtrou-se o material. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotatório, obtendo-se 2,0 g de um sólido branco.

Rendimento: 95%

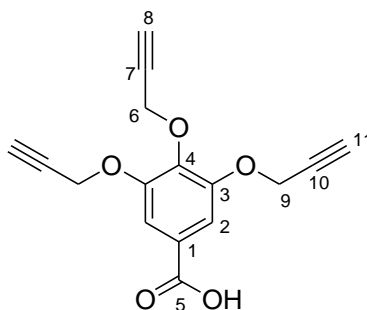
Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₇H₁₄O₅ **MM:** 298,1 g mol⁻¹

FF: 83,6-85,5 °C; literatura (PERCEC *et al.*, 2006): 87 °C

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.2, pág. 164): 3292, 3271 (ν C-H alcino); 2120 (ν C≡C); 1719 (ν C=O éster aromático); 1589, 1500, 1429 (ν C=C aromático); 1314, 1210 (ν C-O éster); 1248 (ν C-O éter aromático); 1106 (ν C-O éter)

3.2.1.3 Síntese de ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (4) (Adaptado de ZHANG & ZHAO, 2011)



A um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 1,5 g (5,03 mmol) de **3**, 30 mL de metanol e 10 mL de água. Em seguida, foram adicionados 1,27 g (30,1 mmol) de hidróxido de lítio monohidratado. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 4 horas e 30 minutos até completo consumo do material de partida evidenciado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 6:4; reveladores: solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: foi adicionado à mistura de reação HCl concentrado até pH 7. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água ao balão e a mistura foi vertida em um funil de separação. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secou-se com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório. Obteve-se 1,42 g de um produto sólido levemente amarelo.

Rendimento: 99%

Aspecto físico: sólido levemente amarelo

FM: C₁₆H₁₂O₅ **MM:** 284,1 g mol⁻¹

FF: 148,8-150,5 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.3, pág. 165): 3298, 3274 (ν C-H alcino); 2127 (ν C≡C); 1692 (ν C=O ácido aromático); 1586, 1503, 1431 (ν C=C aromático); 1318, 1204 (ν C-O ácido); 1248 (ν C-O éter aromático); 1107 (ν C-O).

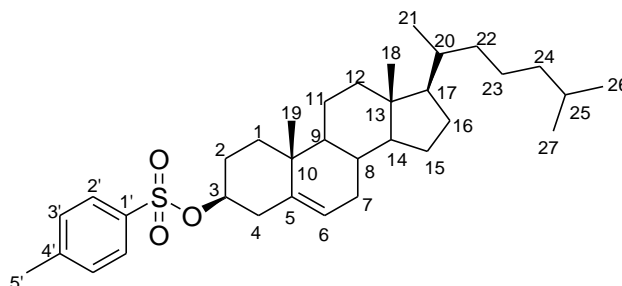
RMN de ¹H (200 MHz, acetona-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.4, pág. 165): Anexo B, Tabela B.1, pág. 241.

RMN de ¹³C (50 MHz, acetona-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.5, pág. 166): Anexo B, Tabela B.2, pág. 241.

HRMS (ESI) *m/z*: (Anexo A, Figura A.6, pág. 167): [M+H]⁺ calculado: 285,0763; encontrado: 285,0768.

3.2.2 Síntese dos derivados do colesterol

3.2.2.1 Síntese de 3- β -[(*p*-toluenossulfonil)oxi]colest-5-eno (**6**) (adaptado de BAJAJ *et al.*, 2008)



A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 g (2,92 mmol) de colesterol, 1,3 mL de diclorometano anidro e 1,3 mL de piridina anidra. A mistura foi resfriada a 0°C, em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 0,74 g (3,9 mmol) de cloreto de *p*-toluenossulfonila. Essa mistura permaneceu sob agitação, a 0°C, por 20 minutos. A mistura reagente foi transferida para freezer, onde permaneceu por 24 horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCD, tendo sido observado o consumo total do colesterol (eluyente: Hex/AcOEt 8:2; reveladores: solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: foram adicionados 30 mL de diclorometano ao balão e a mistura foi vertida em um funil de separação. A fase orgânica foi lavada com solução de HCl 3 mol L⁻¹ (3 x 25 mL), solução saturada de NaHCO₃ (1 x 25 mL) e água destilada (1 x 25 mL). A fase orgânica foi seca com

Na₂SO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotatório. Obteve-se um produto sólido amarelado que foi recristalizado em metanol (10 mL), resultando em 1,35 g de um sólido branco.

Rendimento: 96%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₃₄H₅₂O₃S **MM:** 540,4 g mol⁻¹

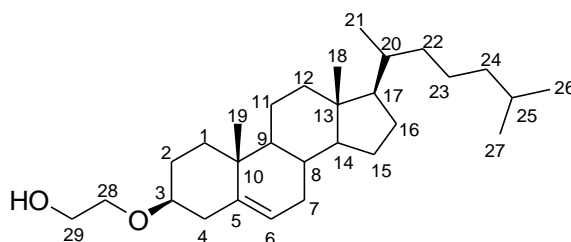
FF: 122,1-124,3 °C; literatura (BAJAJ, 2008): 133 °C

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.7, pág. 168): 2936, 2901, 2884, 2856 (ν C-H alifático); 1597, 1495 (ν C=C de aromático); 1375 (ν_s SO₂); 1173 (ν_{as} SO₂); 1188 (ν C-O éter).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.8, pág. 169): Anexo B, Tabela B.3, pág. 242.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.9, pág.170): Anexo B, Tabela B.4, pág. 242.

3.2.2.2 Síntese de 3-β-[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (7) (adaptado de BAJAJ *et al.*, 2008)



A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 2,9 g (5,4 mmol) de **6** e 7 mL de dioxano anidro. A mistura foi aquecida a 90°C, sob agitação. Em seguida, foi adicionado 1,8 mL (32,4 mmol) de etilenoglicol e a mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 21 horas e 40 minutos. A evolução da reação foi acompanhada por CCD, onde foi observado o consumo total do material de partida (eluente: Hex/AcOEt 9:1; reveladores: solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: a mistura reagente foi resfriada a temperatura ambiente e o solvente foi removido com auxílio de ar comprimido. O bruto da reação foi dissolvido em 40 mL de diclorometano e lavado com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 40 mL) e água destilada (2 x 40 mL). Removeu-se o solvente da fase orgânica em evaporador rotatório (após remover a água residual com Na₂SO₄ anidro). O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com misturas de AcOEt:Hex (1:9 e 2:9), fornecendo 1,27g do produto **7** puro.

Rendimento: 55%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₂₉H₅₀O₂ **MM:** 430,4 g mol⁻¹

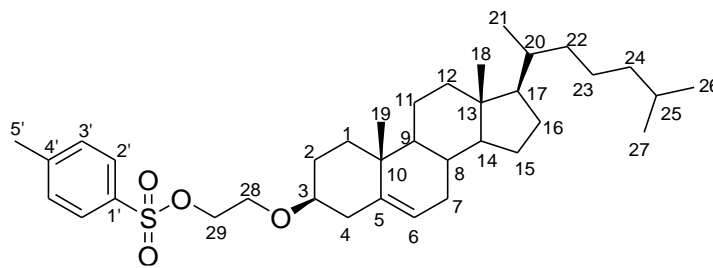
FF: 91,9-92,4 °C; literatura (BAJAJ *et al.*, 2008): 99-100 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.10, pág. 171): 3516 (ν O-H álcool); 2931, 2866, 2881 (ν C-H alifático); 1108 (ν C-O éter); 1061 (ν C-O álcool).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.11, pág. 172): Anexo B, Tabela B.5, pág. 243.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.12, pág. 173): Anexo B, Tabela B.6, pág. 243.

3.2.2.3 Síntese de 3- β -[2[(*p*-toluenossulfonil)oxi]etoxi]colest-5-eno (**8**) (adaptado de BAJAJ *et al.*, 2008)



A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1,23 g (2,9 mmol) de **7**, 4 mL de diclorometano anidro e 4 mL de piridina anidra. A mistura foi resfriada a 0°C, em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 1,67 g (8,8 mmol) de cloreto de *p*-toluenossulfonila. Essa mistura permaneceu sob agitação, a 0°C, por 10 minutos. Em seguida, foi transferida para o freezer, onde permaneceu por 22 horas e 30 minutos. A evolução da reação foi acompanhada por CCD, tendo sido observado o consumo total do material de partida (eluente: Hex/AcOEt 9:1; reveladores: solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: foram adicionados 30 mL de diclorometano ao balão e a mistura foi vertida em um funil de separação. A fase orgânica foi lavada com solução de HCl 3 mol L⁻¹ (3 x 25 mL), solução saturada de NaHCO₃ (1 x 25 mL) e água destilada (1 x 25 mL). A fase orgânica foi reunida e seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com mistura de AcOEt:Hex (1:9), fornecendo 1,6g do produto **8** puro.

Rendimento: 96%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₃₆H₅₆O₄S **MM:** 584,4 g mol⁻¹

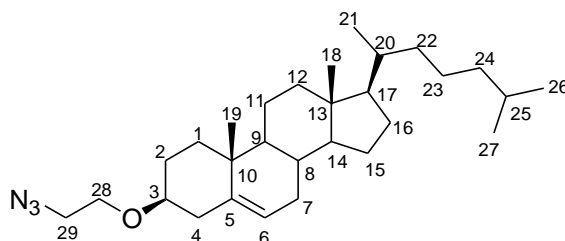
FF: 112,0-112,4 °C; literatura (NIKOLAEVA *et al.*, 2010): 115 °C

IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.13, pág. 174): 2933, 2864 (ν C-H alifático); 1597 (ν C=C de aromático); 1355 (ν_s SO_2); 1174 (ν_{as} SO_2); 1188 (ν C-O éter).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.14, pág. 175): Anexo B, Tabela B.7, pág. 244.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.15, pág. 176): Anexo B, Tabela B.8, pág. 244.

3.2.2.4 Síntese de 3- β -(2-azidoetoxi)colest-5-eno (**9**) (adaptado de NIKOLAEVA *et al.*, 2010)



A um balão de fundo redondo de 25 mL foi dissolvido 1,66 g (2,8 mmol) de **8** em 4 mL de DMF anidra, Em seguida, adicionou-se de 1,09 g (16,8 mmol) de azida de sódio. A mistura foi aquecida a 80°C e permaneceu sob agitação por 1 hora e 30 minutos. O término da reação foi evidenciado por CCD após o consumo de **8** (eluente: Hex/AcOEt 9:1; reveladores: solução ácida de CAM e aquecimento a 120°C). Elaboração: foram adicionados ao balão gelo picado e 30 mL de água destilada. Observou-se a formação de um precipitado, que foi filtrado a vácuo. O produto foi obtido puro, como um sólido branco (1,27 g).

Rendimento: 98%

Aspecto físico: sólido branco

FM: $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}$ **MM:** 455,4 g mol^{-1}

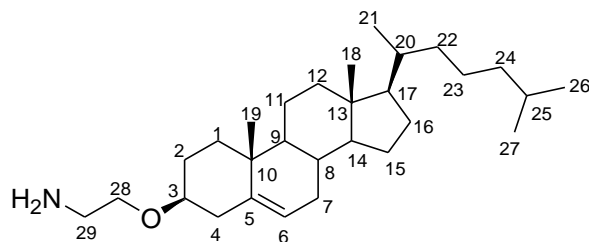
FF: 57,2-58,2 °C; literatura (NIKOLAEVA *et al.*, 2010): 60 °C

IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.16, pág. 177): 2931, 2902, 2886, 2864, 2845 (ν C-H alifático); 2102 (ν_{as} R- N_3); 1115 (ν C-O éter).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.17, pág. 178): Anexo B, Tabela B.9, pág. 245.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Figura A.18, Anexo A, pág. 179): Anexo B, Tabela B.10, pág. 245.

3.2.2.5 Síntese de 3-β-(2-aminoetoxi)colest-5-eno (**10**) (adaptado de NIKOLAEVA *et al.*, 2010)



A um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 2 mL de THF anidro e 100 mg (0,22 mmol) de **9**. A mistura foi resfriada a 0°C e, aos poucos, 25 mg (0,66 mmol) de hidreto de lítio e alumínio foram adicionados ao meio. Essa mistura permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, por 1 hora e 20 minutos até completo consumo do material de partida evidenciado por CDD (eluente: Hex/AcOEt 9:1; reveladores: solução ácida de CAM, solução etanólica de ninidrina 1,5% e aquecimento a 120°C). Elaboração: foram adicionados ao balão, aos poucos, gelo picado e 20 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi vertida em funil de separação e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi agrupada e lavada com água destilada (1 x 40 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente removido em evaporador rotatório. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com mistura de AcOEt:MeOH:NH₄OH (89:10:1), fornecendo 84 mg do produto **10** puro.

Rendimento: 89%

Aspecto físico: cera branca

FM: C₂₉H₅₁NO **MM:** 429,4 g mol⁻¹

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.19, pág. 180): 3359, 3281 (ν N-H amina primária); 2932, 2866 (ν C-H alifático); 1106 (ν C-O éter).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.20, pág. 181): Anexo B, Tabela B.11, pág. 246.

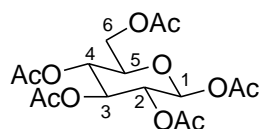
RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.21, pág. 182): Anexo B, Tabela B.12, pág. 246.

3.2.3 Síntese das azidas dos carboidratos

3.2.3.1 Procedimento geral da síntese dos derivados per-*O*-acetilados **12** e **16** (adaptado de FRANCO *et al.*, 2015)

Em um balão de vidro foram triturados 27,75 mmol do carboidrato (1 equivalente) e 48,76 mmol de acetato de sódio (1,76 equivalentes). Em seguida, transferiu-se a mistura para um balão de fundo de redondo de 100 mL e adicionaram-se 25 mL de anidrido acético. A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento (100 °C) por 3 horas até o término da reação, evidenciado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 4:6; reveladores: solução de ácido sulfúrico 15% e aquecimento a 120 °C). A mistura reagente foi vertida em um béquer contendo gelo e mantida sob agitação magnética por 1 hora. Formou-se um precipitado branco que foi filtrado e lavado com água.

3.2.3.1.1 Síntese de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopiranosose (12)



O produto **12** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.1**. Foram utilizados 5 g (27,75 mmol) de D-glicose, 4 g (48,76 mmol) de acetato de sódio e 25 mL de anidrido acético. Foram obtidos 10,8 g de um sólido branco.

Rendimento: 99%

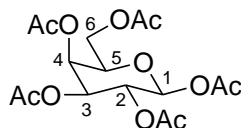
Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₆H₂₂O₁₁ **MM:** 390,1 g mol⁻¹

FF: 129,7-130,8 °C; literatura (GHOLAP, 2003): 131 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.22, pág. 183): 2969 (ν C-H alifático); 1736 (ν C=O éster); 1217 (ν C-O éster); 1032 (ν C-O éter).

3.2.3.1.2 Síntese de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- β -D-galactopiranosose (16)



O produto **16** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.1**. Foram utilizados 5 g (27,75 mmol) de D-galactose, 4 g (48,76 mmol) de acetato de sódio e 25 mL de anidrido acético. Foram obtidos 6,2 g de um sólido branco.

Rendimento: 57%

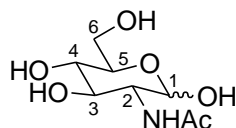
Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₆H₂₂O₁₁ **MM:** 390,1 g mol⁻¹

FF: 138,3-140,1 °C; literatura (KRISHNAN & SURESHAN, 2015) 133-134 °C

IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.23, pág. 183): 2989 (ν C-H alifático); 1751, 1737 (ν C=O éster); 1210 (ν C-O éster); 1039 (ν C-O éter).

3.2.3.2 Síntese de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (20)



A um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 1,32 g (23,5 mmol) de hidróxido de potássio e 65 mL de metanol. A mistura foi mantida sob agitação magnética até completa solubilização do sólido. Em seguida, foram adicionados 5 g (18,05 mmol) de sulfato de glicosamina e após 15 minutos adicionaram-se 4 mL de anidrido acético. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 1 hora e 30 min até o término da reação, evidenciado por CCD (eluente: MeOH/AcOEt 1:1; reveladores: solução de ácido sulfúrico 15% e aquecimento a 120 °C). Após o término da reação, o precipitado branco formado foi filtrado a vácuo e lavado com metanol. Foram obtidos 3,99 g de um sólido branco.

Rendimento: 100%

Aspecto físico: sólido branco

FM: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_6$ **MM:** 221,1 g mol^{-1}

FF: 208,1-210,3 °C; literatura (FRANCO, 2015): 209,1-211,4 °C

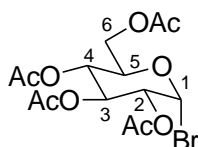
IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.24, pág. 184): 3455 (ν N-H); 3322 (ν O-H álcool); 2931, 2892 (ν C-H alifático); 1625 (ν C=O amida); 1149, 1118 (ν C-O).

3.2.3.3 Procedimento geral da síntese dos derivados bromados 13 e 17 (adaptado de BUTERA *et al.*, 2007)

A um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 55,5 mL de anidrido acético. A solução foi resfriada a 0 °C (banho de gelo) e mantida sob agitação magnética. Em seguida, adicionaram-se, gota a gota, 13,5 mL de HBr (48% p/v) com auxílio de funil de adição. Em um segundo balão foram adicionados 40 mL de diclorometano e 6 g de **12** ou **16**. A mistura reacional foi mantida sob banho de gelo e agitação magnética. Após adição de todo volume de HBr ao anidrido acético, tal solução de HBr foi transferida, também com auxílio de um funil de adição, ao balão contendo a solução de **12** ou **16** em diclorometano. A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 6 horas até o término da reação, evidenciado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 6:4; reveladores: solução de ácido

sulfúrico 15% e aquecimento a 120 °C). Elaboração: A mistura reagente foi vertida em um béquer contendo gelo. Em seguida, procedeu-se à extração do produto. Inicialmente, foi realizada a extração da fase aquosa com diclorometano (3 x 30 mL). Em seguida, a fase orgânica foi reunida e lavada com solução saturada de NaHCO₃ (4 x 40 mL) e água (6 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente removido em evaporador rotatório. O produto bruto obtido foi utilizado em sequencia na obtenção da azida.

3.2.3.3.1 Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (13)



O produto **13** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.3**. Foram utilizados 6 g (15,4 mmol) de **12**, 13,5 mL HBr 48% (119,34 mmol), 55,5 mL de anidrido acético e 40 mL de diclorometano. Foram obtidos 5,5 g de um óleo branco que foi cristalizando aos poucos.

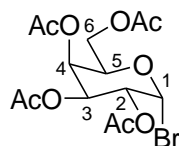
Rendimento: 87%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₄H₁₉BrO₉ **MM:** 410,0 g mol⁻¹

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.25, pág. 184): 2964 (ν C-H alifático), 1739 (ν C=O éster), 1223, 1210 (ν C-O éster).

3.2.3.3.2 Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (17)



O produto **17** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.3**. Foram utilizados 6 g (15,4 mmol) de **16**, 13,5 mL HBr 48% (119,3), 55,5 mL de anidrido acético e 40 mL de diclorometano. Foram obtidos 6,3 g de um óleo branco, que foi cristalizando aos poucos.

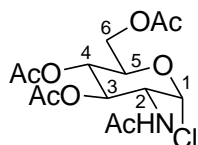
Rendimento: 100%

Aspecto físico: óleo branco

FM: C₁₄H₁₉BrO₉ **MM:** 410,0 g mol⁻¹

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.26, pág. 185): 2966 (ν C-H alifático), 1742 (ν C=O éster), 1208 (ν C-O éster).

3.2.3.4 Síntese de cloreto de 2-acetamido-1,2-didesoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**21**) (Adaptado de HEIDLAS, 1992)



A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 3,99 g (18,05 mmol) de **20**. O balão foi vedado com septo de borracha e o material foi mantido a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando-se banho de gelo, contendo acetona e NaCl. Foram adicionados, com auxílio de seringa, 10 mL de cloreto de acetila e a mistura foi deixada sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 48 horas. Elaboração: com auxílio de uma seringa, furou-se o septo que vedava o balão para eliminar o excesso de $\text{HCl}_{(\text{g})}$. Após cerca de 5 minutos o sistema foi aberto e foram adicionados 20 mL de diclorometano. O sistema foi mantido sob agitação por mais 5 minutos e, logo após, adicionou-se uma pequena quantidade de gelo ao balão. Em seguida, o material foi vertido em funil de separação e foram adicionados mais 20 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com água destilada (1 x 30 mL), depois com solução saturada NaHCO_3 (3 x 30 mL) e finalmente com água destilada (1 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e o solvente removido em evaporador rotatório. Foram obtidos 3,49 g de produto que foi utilizado em sequencia na obtenção da azida.

Rendimento: 53%

Aspecto físico: óleo marrom claro

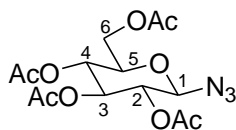
FM: $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClNO}_8$ **MM:** $365,1\text{ g mol}^{-1}$

IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.27, pág. 185): 3240 (ν N-H amina), 2978 (ν C-H alifático), 1737 (ν C=O éster), 1641 (ν C=O amida).

3.2.3.5 Procedimento geral da síntese das azidas **14**, **18** e **22** (Adaptado de BUTERA *et al.*, 2007)

A um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 1 equivalente de **13**, **17** ou **21** e 25 mL de acetona. A esta solução, foram adicionados 2,5 equivalentes de azida de sódio, dissolvidas em 20 mL de água. A mistura permaneceu sob agitação magnética, à temperatura ambiente por cerca de 4 horas, até o término da reação, evidenciado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 2:8; reveladores: solução de ácido sulfúrico 15% e aquecimento a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$). Elaboração: o solvente orgânico foi removido com auxílio de ar comprimido, levando a formação de um precipitado que foi filtrado a vácuo.

3.2.3.5.1 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopiranosose (14)



O produto **14** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.5**. Foram utilizados 6,9 g (16,8 mmol) de **13** e 2,7 g (42 mmol) de azida de sódio. Foram obtidos 4,8 g de um sólido branco.

Rendimento: 76%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₄H₁₉N₃O₉ **MM:** 373,1 g mol⁻¹

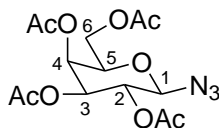
FF: 124,8-125,9 °C; literatura (JOHNSTONE *et al.*, 2005): 126-128 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.28, pág. 186): 2969, 2909 (ν C-H alifático); 2117 (ν_{as} R-N₃); 1752, 1731 (ν C=O éster).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.29, pág. 186): Anexo B, Tabela B.13, pág. 247.

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.30, pág. 187): Anexo B, Tabela B.14, pág. 247.

3.2.3.5.2 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranosose (18)



O produto **18** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.5**. Foram utilizados 6,3 g (15,3 mmol) de **17** e 2,5 g (38,2 mmol) de azida de sódio. Foram obtidos 5,1 g de um sólido branco.

Rendimento: 90%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₁₄H₁₉N₃O₉ **MM:** 373,1 g mol⁻¹

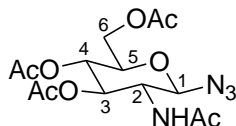
FF: 92,5-93,2 °C; literatura (BUTERA *et al.*, 2007): 91,5-93,0 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.31, pág. 187): 2985, 2949 (ν C-H alifático); 2164 (ν_s N=N=N); (2126 (ν_{as} R-N₃); 1737 (ν C=O éster); 1212 (ν C-O éter).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.32, pág. 188): Anexo B, Tabela B.15, pág. 248.

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.33, pág. 188): Anexo B, Tabela B.16, pág. 248.

3.2.3.5.3 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopirranose (**22**)



O produto **22** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.3.5**. Foram utilizados 2,3 g (6,4 mmol) de **21** e 1,05 g (16,0 mmol) de azida de sódio. Foi obtido 1,53 g de um sólido marrom claro.

Rendimento: 64%

Aspecto físico: sólido marrom claro

FM: $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$ **MM:** $372,1 \text{ g mol}^{-1}$

FF: 166,8-167,7 °C; literatura (AUGE *et al.*, 1989): 168-169 °C

IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.34, pág. 189): 3362 (ν N-H); 2944, 2883 (ν C-H alifático); 2103 (ν_{as} R- N_3); 1741 (ν C=O éster); 1663 (ν C=O amida).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.35, pág. 189): Anexo B, Tabela B.17, pág. 249.

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.36, pág. 190): Anexo B, Tabela B.18, pág. 249.

3.2.4 Síntese dos glicosiltriazóis

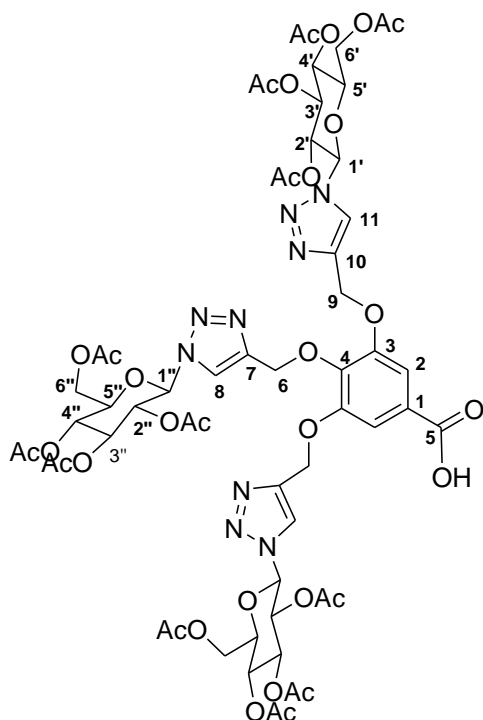
3.2.4.1 Procedimento geral para síntese dos derivados glicosiltriazóis **23** e **24**

(adaptado de KUSHWAHA & TIWARI, 2013)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 equivalente do composto **4** e 6 mL de THF. A essa mistura adicionaram-se 3,6 equivalentes da glicosilazida (**14** ou **18**), e 0,9 equivalente de solução aquosa de CuSO_4 (10% p/v). Por fim, uma solução contendo 0,9 equivalente de ascorbato de sódio, dissolvido em 2 mL de água destilada, foi adicionada ao balão. A mistura de reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 4 horas e o progresso da reação foi acompanhado por CCD (eluente: Hex/ AcOEt 3:7; reveladores: solução ácida de CAM, solução de ácido sulfúrico 15% e aquecimento a 120 °C). Elaboração: o solvente orgânico foi removido com auxílio de ar comprimido, levando à formação de um precipitado que foi filtrado a vácuo. O bruto foi purificado em coluna

cromatográfica de sílica gel, utilizando-se fluorisil no topo da coluna. Após a purificação por coluna, o material foi solubilizado em 30 mL de diclorometano e extraído com solução de EDTA (2 x 30 mL). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com água (2 x 40 mL) e seca com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se o triazol puro.

3.2.4.1.1 Glicosiltriazol 23



O produto **23** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.4.1**. Foram utilizados 100 mg (0,35 mmol) de **4**, 469 mg (1,3 mmol) de **14**, 0,8 mL de solução aquosa de CuSO₄ (10% p/v, 0,32 mmol) e 64 mg de ascorbato de sódio (0,32 mmol). Foram obtidos 447 mg de um sólido branco.

Rendimento: 91%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₅₈H₆₉N₉O₃₂ **MM:** 1403,4 g mol⁻¹

FF: 238,0-241,3 °C (decomposição)

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.37, pág. 190): 2928 (ν C-H alifático), 1743 (ν C=O éster), 1211 (ν C-O éster).

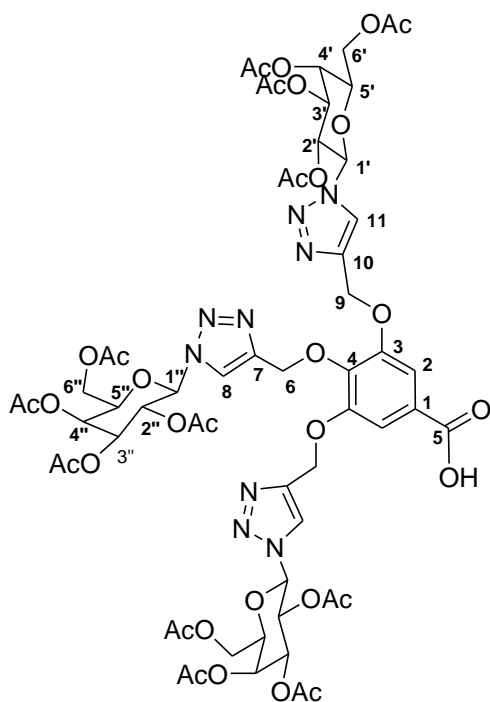
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.38, pág. 191): Anexo B, Tabela B.19, pág.

250.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.39, pág. 192): Anexo B, Tabela B.20, pág. 250.

HRMS (ESI) *m/z*: (Anexo A, Figura A.41, pág. 194): [M+H]⁺ calculado: 1404,4127; encontrado: 1404,4138.

3.2.4.1.2 Galactosiltriazol 24



O produto **24** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.4.1**. Foram utilizados 300 mg (1,05 mmol) de **4** e 1,4 g (3,78 mmol) de **18**, 2,4 mL de solução aquosa de CuSO₄ (10% p/v, 0,95 mmol) e 188 mg de ascorbato de sódio (0,95 mmol). Foram obtidos 1,14 g de um sólido branco.

Rendimento: 77%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₅₈H₆₉N₉O₃₂ **MM:** 1403,4 g mol⁻¹

FF: 138,4-140,5 °C

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.42, pág. 195): 2972 (ν C-H alifático), 1746 (ν C=O éster), 1212 (ν C-O éster).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A,

Figura A.43, pág. 196): Anexo B, Tabela B.21, pág. 251.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.44, pág. 197): Anexo B, Tabela B.22, pág. 252.

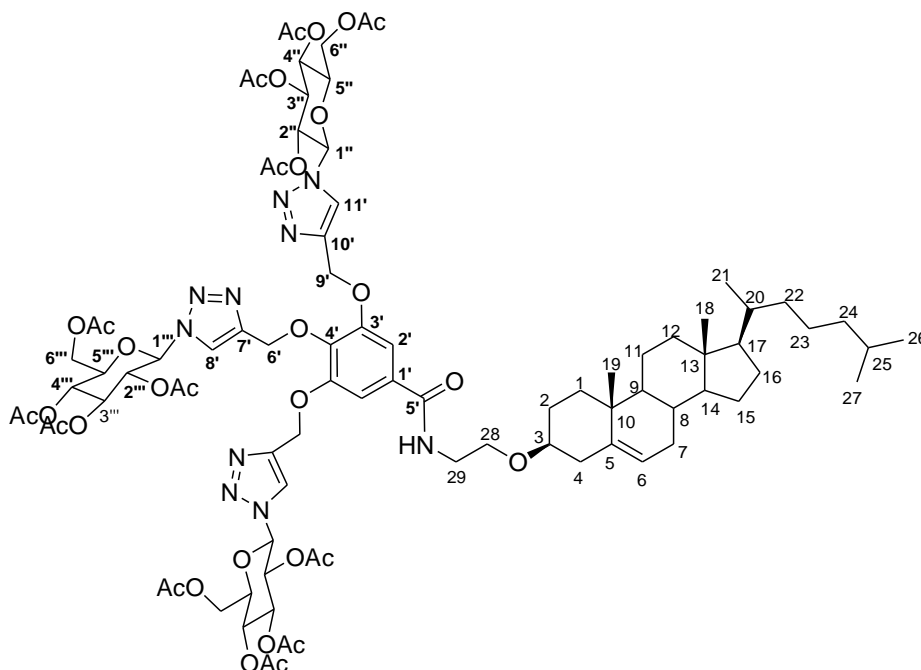
HRMS (ESI) m/z: (Anexo A, Figura A.46, pág. 199): [M+H]⁺ calculado: 1404,4127; encontrado: 1404,4138.

3.2.5 Síntese das amidas

3.2.5.1 Procedimento geral para síntese das amidas 26, 27

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1,5 equivalentes do composto **23** ou **24** e 1 equivalente do derivado **10**. Em seguida, o material foi solubilizado em THF. Por fim, adicionaram-se 1,5 equivalentes de EDAC e 1 equivalente de DMAP e acetona (correspondente à metade do volume de THF utilizado). A mistura permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 4 horas até completo consumo do material de partida evidenciado por CDD (eluente: Hex/AcOEt 1:1; reveladores: solução ácida de CAM, solução etanólica de ninidrina 1,5% e aquecimento a 120°C). Elaboração: o solvente foi removido com auxílio de ar comprimido e o bruto da reação foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com misturas de AcOEt:Hex, em ordem crescente de polaridade.

3.2.5.1.1 Amida **26**: obtida pela reação do glicosiltriazol **23** com o 3-*O*-(2-aminoetil)colesterol (**10**)



O produto **26** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.5.1**. Foram utilizados 322 mg de **23** (0,23 mmol), 77 mg (0,18 mmol) de **10**, 44 mg (0,23 mmol) de EDAC e 22 mg (0,18 mmol) de DMAP. Foram obtidos 197 mg de um sólido branco.

Rendimento: 61%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₈₇H₁₁₈N₁₀O₃₂ **MM:** 1814,8 g mol⁻¹

FF: 173,2-174,8 °C

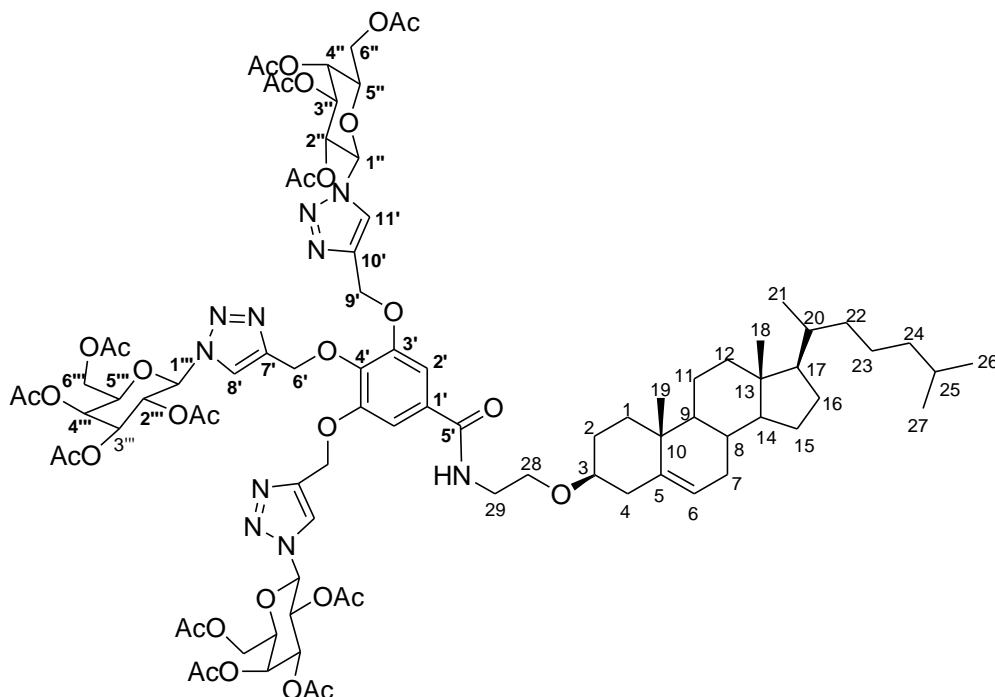
IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.47, pág. 200): 2935 (ν C-H alifático), 1747 (ν C=O éster), 1210 (ν C-O éster).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.48, pág. 201): Tabela B.23, Anexo 253.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.49, pág. 202): Anexo B, Tabela B.24, pág. 254.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: (Anexo A, Figura A.51, pág. 204): [M+ Na]⁺ calculado: 1837,781; encontrado: 1837,477.

3.2.5.1.2 Amida **27**: obtida pela reação do galactosiltriazol **24** com o 3-*O*-(2-aminoetil)colesterol (**10**)



O produto **27** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.5.1**. Foram utilizados 252 mg de **24** (0,18 mmol), 50 mg (0,12 mmol) de **10**, 34 mg (0,18 mmol) de EDAC e 15 mg (0,12 mmol) de DMAP. Foram obtidos 158 mg de um sólido branco.

Rendimento: 75%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₈₇H₁₁₈N₁₀O₃₂ **MM:** 1814,8 g mol⁻¹

FF: 112,7-114,4 °C

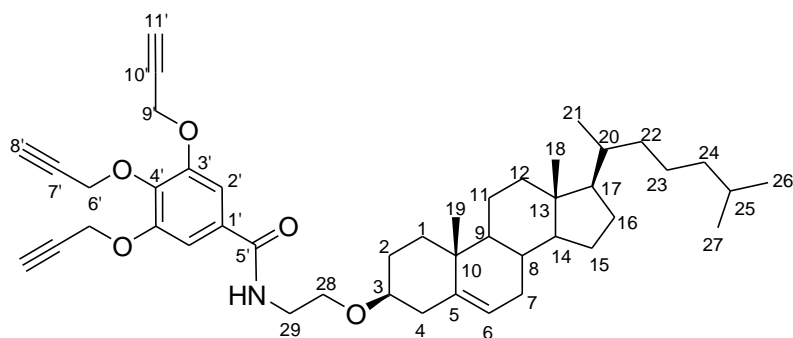
IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.52, pág. 205): 2936 (ν C-H alifático), 1747 (ν C=O éster), 1211 (ν C-O éster).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.53, pág. 206): Anexo B, Tabela B.25, pág. 255.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.54, pág. 207): Anexo B, Tabela B.26, pág. 256.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: (Anexo A, Figura A.56, pág. 209): [M+ Na]⁺ calculado: 1837,781; encontrado: 1837,580.

3.2.5.2 Síntese de 29



A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 196 mg de **4** (0,69 mmol) e 228 mg (0,53 mmol) do derivado **10**. Em seguida, o material foi solubilizado em THF. Por fim, adicionaram-se 132 mg (0,69 mmol) de EDAC e 65 mg (0,53 mmol) de DMAP e acetona (correspondente à metade do volume de THF utilizado). A mistura permaneceu sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 4 horas até completo consumo do material de partida evidenciado por CDD (eluente: Hex/AcOEt 1:1; reveladores: solução ácida de CAM, solução etanólica de ninidrina 1,5% e aquecimento a 120°C). Elaboração: o solvente foi removido com auxílio de ar comprimido e o bruto da reação foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, eluída com misturas de AcOEt:Hex, em ordem crescente de polaridade. Foram obtidos 303 mg de um sólido branco.

Rendimento: 82%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₄₅H₆₁NO₅ **MM:** 695,5 g mol⁻¹

FF: 108,4-110,1 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.63, pág. 216): 3288, 3210 (ν C-H alcino); 2932, 2867, 2850 (ν C-H alifático); 2107 (ν C≡C); 1626 (ν C=O amida); 1589, 1543, 1495 (ν C=C aromático); 1104 (ν C-O éter).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.64, pág. 217): Anexo B, Tabela B.29, pág. 259.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.65, pág. 218): Anexo B, Tabela B.30, pág. 260.

HRMS (ESI) *m/z*: (Anexo A, Figura A.66, pág. 219): [M+H]⁺ calculado: 696,4628; encontrado: 696,4587.

3.2.5.3 Procedimento geral para síntese das amidas **26**, **27**, **28** a partir do derivado **29** (adaptado de KUSHWAHA & TIWARI, 2013)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 1 equivalente do composto **29** e 5 mL de THF. A essa solução adicionaram-se 3,6 equivalentes da glicosilazida (**14**, **18** ou **22**), e 0,9 equivalentes de solução aquosa de CuSO₄ (10% p/v). Por fim, uma solução contendo 0,9 equivalente de ascorbato de sódio, previamente solubilizado em 2 mL de água destilada, foi adicionada ao balão. A mistura de reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 4 horas e o progresso da reação foi acompanhado por CCD (eluente: Hex/AcOEt 1:1; reveladores: solução ácida de CAM, solução de ácido sulfúrico 15% e aquecimento a 120 °C). Elaboração: o solvente orgânico foi removido com auxílio de ar comprimido, levando a formação de um precipitado que foi filtrado à vácuo. O bruto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se fluorisil para preparo do topo, eluída com misturas de AcOEt:Hex, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se o triazol puro.

3.2.5.3.1 Amida **26**: obtida pela reação da glicosilazida **14** com o derivado **29**

O produto **26** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.5.3**. Foram utilizados 150 mg (0,21 mmol) de **29**, 279 mg (0,75 mmol) de **14**, 0,5 mL de solução aquosa de CuSO₄ (10% p/v, 0,19 mmol) e 38 mg de ascorbato de sódio (0,19 mmol). Foram obtidos 333 mg de um sólido branco.

Rendimento: 85%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₈₇H₁₁₈N₁₀O₃₂ **MM:** 1814,8 g mol⁻¹

FF: 173,2,0-174,8 °C

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.47, pág. 200): 2935 (ν C-H alifático), 1747 (ν C=O éster), 1210 (ν C-O éster).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.48, pág. 201): Anexo B, Tabela B.23, pág. 253.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.49, pág. 202): Anexo B, Tabela B.24, pág. 254.

MS (MALDI-TOF) m/z: (Anexo A, Figura A.51, pág. 204): [M+ Na]⁺ calculado: 1837,781; encontrado: 1837,477.

3.2.5.3.2 Amida 27: obtida pela reação da glicosilazida 18 com o derivado 29

O produto **27** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.4.2**. Foram utilizados 100 mg (0,14 mmol) de **29** e 186 mg (0,5 mmol) de **18**, 0,3 mL de solução aquosa de CuSO_4 (10% p/v, 0,13 mmol) e 26 mg de ascorbato de sódio (0,13 mmol). Foram obtidos 210 mg de um sólido branco.

Rendimento: 81%

Aspecto físico: sólido branco

FM: $\text{C}_{87}\text{H}_{118}\text{N}_{10}\text{O}_{32}$ **MM:** $1814,8 \text{ g mol}^{-1}$

FF: 112,7-114,4 °C

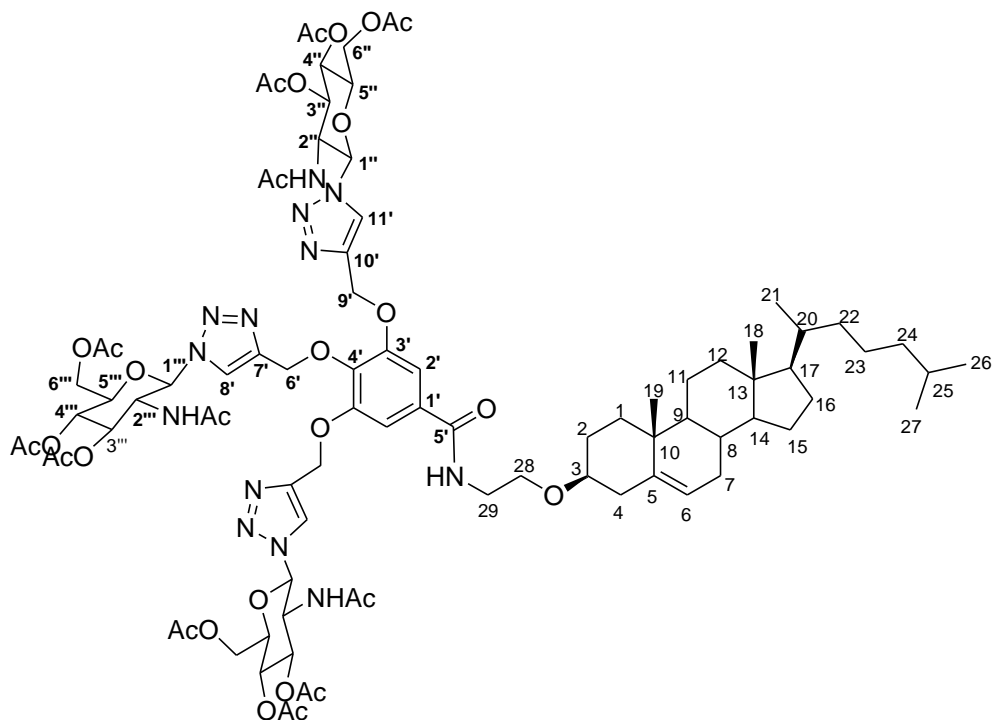
IV (ν , cm^{-1}) (Anexo A, Figura A.52, pág. 205): 2936 (ν C-H alifático), 1747 (ν C=O éster), 1211 (ν C-O éster).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.53, pág. 206): Anexo B, Tabela B.25, pág. 255.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.54, pág. 207): Anexo B, Tabela B.26, pág. 256.

MS (MALDI-TOF) m/z : (Anexo A, Figura A.56, pág. 209): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculado: 1837,781; encontrado: 1837,580.

3.2.5.3.3 Amida 28: obtida pela reação da glicosilazida 22 com o derivado 29



O produto **28** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.4.2**. Foram utilizados 100 mg (0,14 mmol) de **29** e 187 mg (0,5 mmol) de **22**, 0,3 mL de solução aquosa de CuSO₄ (10% p/v, 0,13 mmol) e 26 mg de ascorbato de sódio (0,13 mmol). Foram obtidos 234 mg de um sólido branco.

Rendimento: 90%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₈₇H₁₂₁N₁₃O₂₉ **MM:** 1811,8 g mol⁻¹

FF: 173 °C (decomposição)

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.57, pág. 210): 3307 (ν N-H); 2935, 2865 (ν C-H alifático); 1743 (ν C=O éster); 1223 (ν C-O éster).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.58, pág. 211): Anexo B, Tabela B.27, pág. 257.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.59, pág. 212): Anexo B, Tabela B.28, pág. 258.

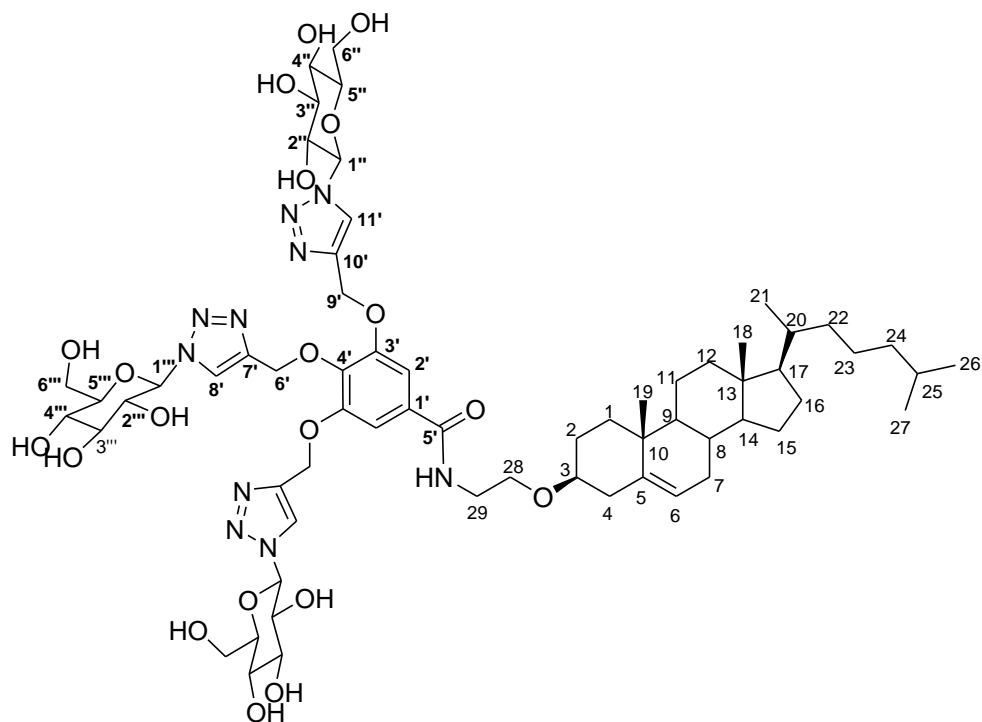
MS (MALDI-TOF) *m/z*: (Anexo A, Figura A.62, pág. 215): [M+ Na]⁺ calculado: 1834,829; encontrado: 1834,912.

3.2.6 Desacetilação dos açúcares

3.2.6.1 Procedimento geral para remoção dos grupos acetila de **26**, **27**, **28** (adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2009)

A um balão de 25 mL foram adicionados 6 mL de solução previamente preparada de MeONa em MeOH anidro. A mistura foi resfriada a 0 °C e, aos poucos, 100 mg do glicosídeo peracetilado (**26**, **27** ou **28**) foram adicionados. Essa mistura permaneceu sob agitação magnética, à temperatura de 0 °C, por 1 hora, até completo consumo do material de partida (eluente: AcOEt, revelador: solução ácida de CAM, solução de ácido sulfúrico 15% e aquecimento a 120 °C). Elaboração: a mistura reagente foi neutralizada com resina ácida amberlite IRA 120. O material foi recolhido com auxílio de pipeta de Pasteur e o solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se os produtos finais desprotegidos que foram utilizados no preparo dos lipossomas.

3.2.6.1.1 Amida **30**: obtida pela desacetilação de **26**



O produto **30** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.6.1**. Foram utilizados 204 mg (0,11 mmol) de **26** e 9 mL de MeONa/MeOH. Foram obtidos 147 mg de um cristal branco.

Rendimento: 100%

Aspecto físico: cristal branco

FM: C₆₃H₉₄N₁₀O₂₀ **MM:** 1310,7 g mol⁻¹

FF: 186,2 °C (decomposição)

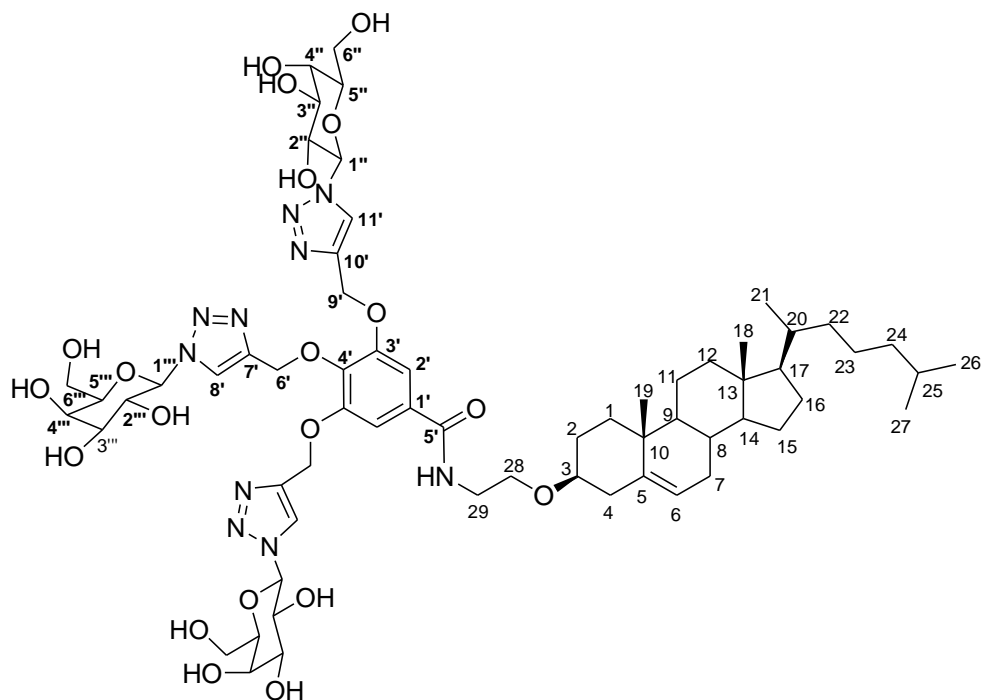
IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.67, pág. 220): 3339 (ν O-H álcool), 2932 (ν C-H alifático), 1634 (ν C=O amida), 1094 (ν C-O éter), 1046 (ν C-O álcool).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.68, pág. 221): Anexo B, Tabela B.31, pág. 261.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.69, pág. 222): Anexo B, Tabela B.32, pág. 262.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: (Anexo A, Figura A.71, pág. 224): [M+ Na]⁺ calculado: 1333,654; encontrado: 1333,772.

3.2.6.1.2 Amida 31: obtida pela desacetilação de 27



O produto **31** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.6.1**. Foram utilizados 100 mg (0,05 mmol) de **27** e 9 mL de MeONa/MeOH. Foram obtidos 70 mg de um cristal branco.

Rendimento: 100%

Aspecto físico: cristal branco

FM: C₆₃H₉₄N₁₀O₂₀ **MM:** 1310,7 g mol⁻¹

FF: 205,6 °C (decomposição)

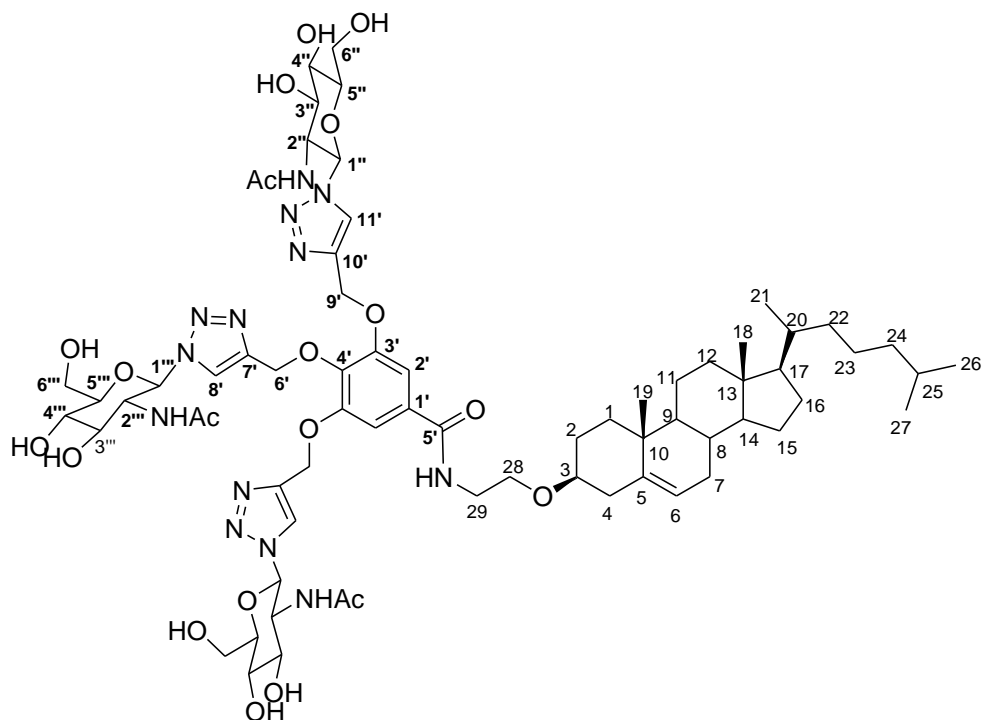
IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.72, pág. 225): 3325 (ν O-H álcool), 2933 (ν C-H alifático), 1635 (ν C=O amida), 1092 (ν C-O éter), 1055 (ν C-O álcool).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.73, pág. 226): Anexo B, Tabela B.33, pág. 263.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.74, pág. 227): Anexo B, Tabela B.34, pág. 264.

MS (MALDI-TOF) *m/z*: (Anexo A, Figura A.76, pág. 229): [M+ Na]⁺ calculado: 1333,654; encontrado: 1333,768.

3.2.6.1.3 Amida **32**: obtida pela desacetilação de **28**



O produto **32** foi obtido de acordo com procedimento geral **3.2.6.1**. Foram utilizados 302 mg (0,17 mmol) de **28** e 15 mL de MeONa/MeOH. Foram obtidos 232 mg de um cristal branco.

Rendimento: 98%

Aspecto físico: cristal branco

FM: C₆₉H₁₀₃N₁₃O₂₀ **MM:** 1433,7 g mol⁻¹

FF: 235 °C (decomposição)

IV (ν, cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.77, pág. 230): 3287 (ν O-H álcool); 2933, 2865 (ν C-H alifático); 1658 (ν C=O amida); 1099 (ν C-O éter); 1037 (ν C-O álcool).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.78, pág. 231): Anexo B, Tabela B.35, pág. 265.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.79, pág. 232): Anexo B, Tabela B.36, pág. 266.

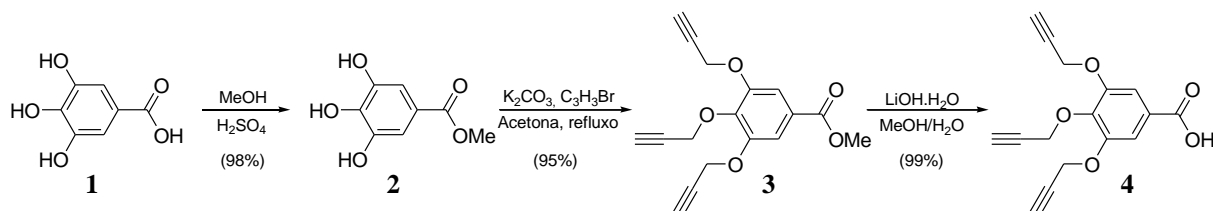
MS (MALDI-TOF) *m/z*: (Anexo A, Figura A.81, pág. 234): [M+ Na]⁺ calculado: 1456,734; encontrado: 1456,840.

4 Resultados e discussão

4.1 Síntese do núcleo contendo alcino terminal derivado do ácido gálico

Inicialmente foi sintetizado o núcleo do éter propargílico derivado do ácido gálico (**4**), como intermediário básico para obtenção dos derivados de carboidratos. A obtenção deste composto foi realizada em três etapas (Figura 9), tendo como material de partida o reagente comercial ácido gálico.

Figura 9 – Síntese do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (**4**).



A primeira etapa de síntese consistiu na esterificação de Fisher do ácido gálico, um método clássico para obtenção de ésteres a partir de ácidos carboxílicos, utilizando-se metanol em meio ácido. Dessa forma, o composto **2** foi obtido com 98% rendimento, conforme metodologia descrita na literatura (FUKUDA *et al.*, 2010).

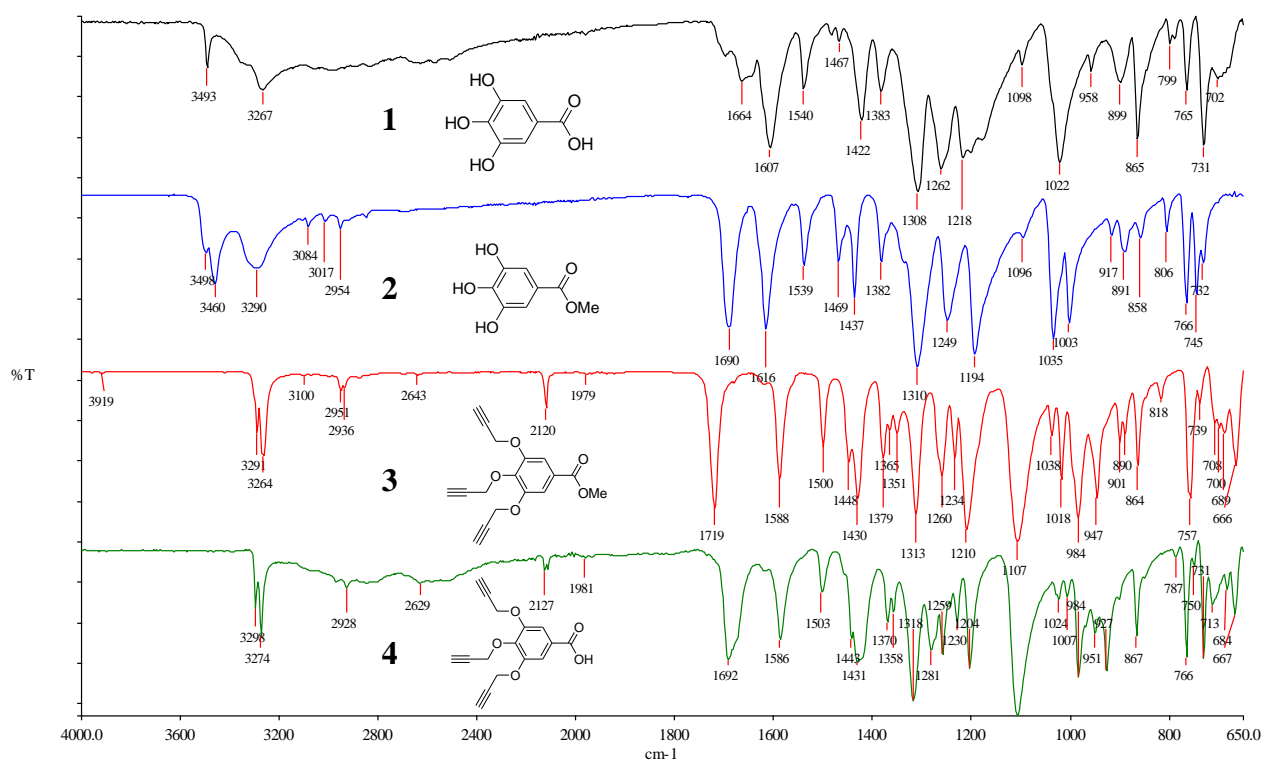
Na segunda etapa de síntese foi realizada a *O*-alquilação do composto **2** em condições básicas, utilizando-se carbonato de potássio e brometo de propargila, conforme procedimento descrito por Fokuda e colaboradores (2010). A reação em meio básico leva à formação dos grupos fenóxidos, que através de uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) do brometo de propargila, fornece o éter **3** em bons rendimentos (95%).

A última etapa consistiu na conversão do éster metílico **3** ao ácido carboxílico **4**. A reação foi realizada sob condições básicas, utilizando-se hidróxido de lítio monoidratado em mistura de metanol/água. A hidrólise completa do composto foi obtida após 4,5 h à temperatura ambiente, com 99% de rendimento.

A formação dos compostos **2**, **3** e **4** pode ser facilmente avaliada pela comparação dos espectros no infravermelho (Figura 10, pág. 68). Observa-se, no espectro no infravermelho do ácido gálico uma banda larga em 3267 cm^{-1} , correspondente ao estiramento O-H de ácido. Essa banda não é observada no espectro do derivado **2**, pois este teve o grupo ácido convertido em um éster. Pode ser observado no espectro de **2** uma banda em 1690 cm^{-1} , relativo ao estiramento da ligação C=O (éster aromático), bem como banda em 1194 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-O de ésteres, o que indica o sucesso na esterificação do ácido gálico. No espectro do composto **3** pode ser observado o

desaparecimento das bandas relativas ao estiramento O-H fenólico, e ainda, aparecimento de bandas em 3291, 3264 cm^{-1} ; características de estiramento de C-H de alcino e banda em 2120 cm^{-1} , típica de estiramento $\text{C}\equiv\text{C}$. A principal evidência que comprova a formação do composto **4** é o aparecimento de uma banda larga entre 3300 e 2100 cm^{-1} , característica de estiramento O-H de ácido. Ainda observamos mudanças na frequência de absorção da carbonila, que para composto **3** encontra-se em 1719 cm^{-1} (ν C=O éster) e para o composto **4** encontra-se em 1692 cm^{-1} (ν C=O ácido). Isto ocorre, pois no composto ácido ocorre a formação de ligação de hidrogênio intermolecular e intramolecular, que resulta em enfraquecimento da ligação C=O, resultando em uma diminuição na frequência de absorção (BARBOSA, 2011).

Figura 10 – Espectros no infravermelho dos compostos **1**, **2**, **3** e **4**.



O composto **4** também teve todos os seus sinais no espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C atribuídos (Figura A.4 e A.5, págs. 165 e 166; Tabela B.1 e B.2, pág. 241) de acordo com os valores de deslocamento observado, integral e a intensidade dos sinais. Em δ 7,52 pode-se observar um simpleto referente aos hidrogênios aromáticos H-2. Em δ 4,92 e 4,81 observam-se dois dupletos, com constantes de acoplamento (4J) iguais a 2,3 e 2,4 Hz; correspondentes aos hidrogênios H-9 e H-6, respectivamente. A integral dos sinais possibilitou a atribuição inequívoca dos mesmos, uma vez que a molécula apresenta simetria. O tripleto em δ 3,13, com integral para dois hidrogênios, refere-se ao H-11, que acopla com os hidrogênios H-9

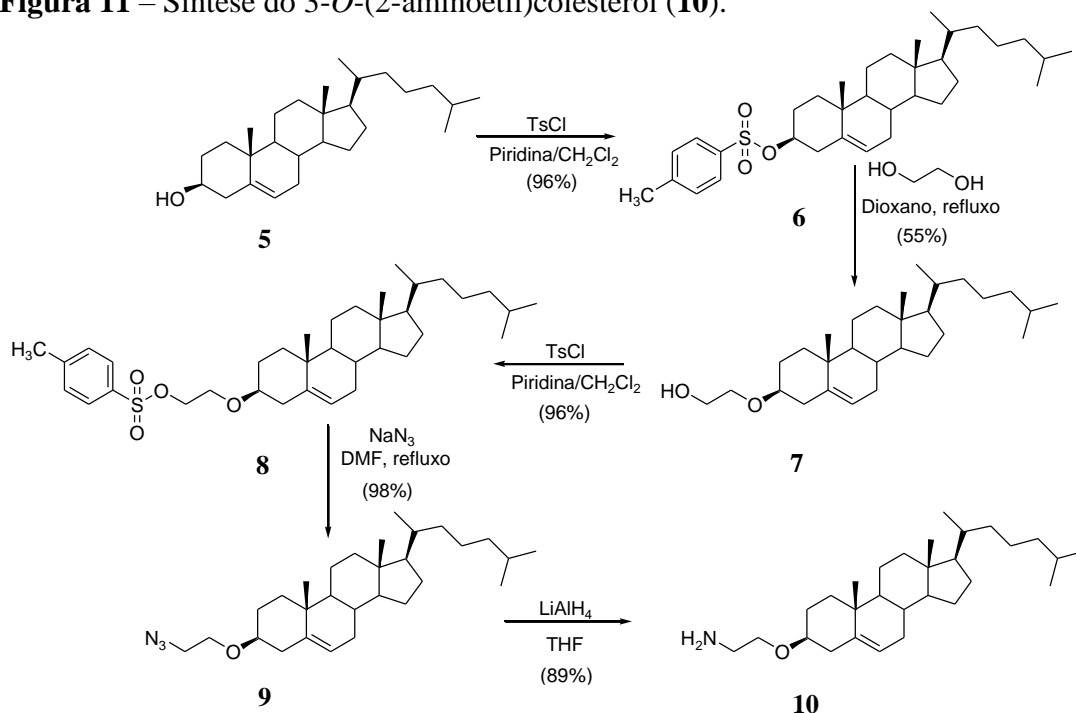
com constante de acoplamento (4J) igual a 2,3 Hz. Já o tripleto em δ 2,99, integrando para um hidrogênio, corresponde ao H-8, e possui constante de acoplamento (4J) igual a 2,4 Hz, referente ao acoplamento com os hidrogênios H-6.

No espectro de RMN de ^{13}C de **4** (pág. 166), pode-se observar um sinal em δ 167,3 correspondente à carbonila do grupo ácido. Em δ 152,5, δ 141,8, δ 127,2 e δ 110,6 observam-se os sinais referentes aos carbonos aromáticos C-3, C-4, C-1 e C-2, respectivamente. Os sinais referentes aos carbonos metínicos C-8 e C-11 encontram-se em δ 79,4 e δ 77,6. Já os sinais em δ 79,9 e δ 77,0 são referentes aos carbonos não hidrogenados C-7 e C-10, respectivamente. Em δ 60,5 e δ 57,6 estão os sinais correspondentes aos carbonos metilênicos C-6 e C-9, que são facilmente atribuídos devido à intensidade dos sinais.

4.2 Síntese dos derivados do colesterol

A segunda etapa de síntese consistiu na obtenção do derivado 2-aminoetila do colesterol (**10**). O colesterol foi escolhido como o composto que serviria de ancoragem para os derivados de carboidrato nos lipossomas, uma vez que é um composto comercial barato, principalmente quando comparado aos lípides utilizados no preparo destas vesículas. Além disso, este composto também está presente na composição de inúmeros sistemas nanoestruturados, conferindo rigidez ou maleabilidade às bicamadas destas vesículas, de acordo com as características da membrana lipídica e da porcentagem de colesterol utilizado (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Figura 11 – Síntese do 3-*O*-(2-aminoetil)colesterol (**10**).



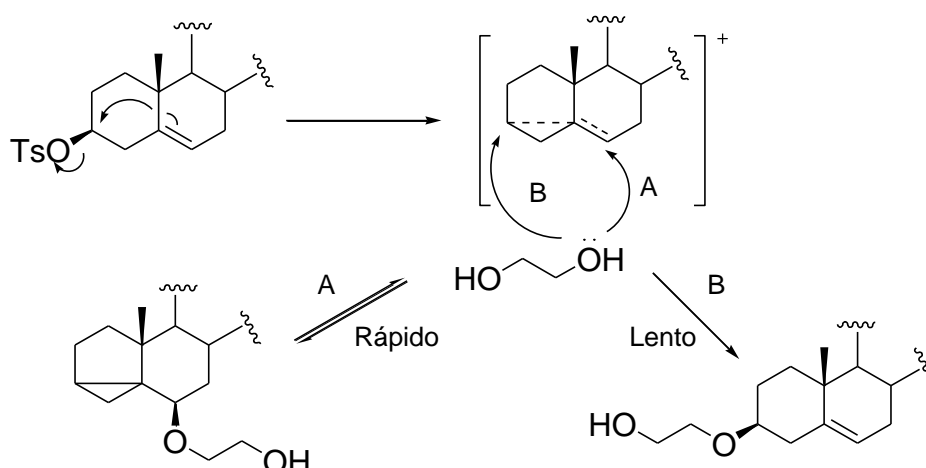
A metodologia para obtenção do composto **10** (Figura 11, pág. 69), obtido em cinco etapas, foi adaptada de Bajaj e colaboradores (2008) e Nikolaeva e colaboradores (2010). Na primeira etapa de síntese, a hidroxila do álcool em C-3 foi convertida em um bom grupo abandonador, por reação com o cloreto de *p*-toluenossulfonila, sob resfriamento, em uma mistura de diclorometano e piridina anidros, levando à obtenção do composto **6** com 96% de rendimento.

O produto **6** foi caracterizado por RMN de ^1H , de ^{13}C e por espectrometria no infravermelho. Na Figura A.8 (pág. 169) pode ser observado o espectro de RMN de ^1H , onde nota-se a presença de dois dupletos relativos ao novo sistema aromático 1,4-dissubstituído do grupo tosila, em δ 7,79 e 7,32, com constante de acoplamento (3J) igual a 8,28 Hz. Além disso, há um sinal em δ 2,44, relativo ao grupo metila aromático. Os sinais do esqueleto esteroidal foram comparados com os descritos na literatura (RIZEA *et al.*, 2012), sendo que os mesmos permaneceram constantes durante as substituições que foram feitas na cadeia lateral do composto.

Nos espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **6** (Figura A.9, pág. 170) observaram-se sinais em δ 129,9 e 127,8, relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados do grupo tosila. Um sinal em δ 21,8, correspondente ao grupo metila ligado a anel aromático, também foi observado.

O composto tosilato **6** foi submetido à reação nas condições descritas na Figura 11 (pág. 69), com o objetivo de substituir o grupo tosila pelo etilenoglicol. Esta reação, forneceu o composto **7** com rendimento de 55%, após purificação por cromatografia em coluna. Durante o acompanhamento da reação por CCD foi observado a formação de subprodutos que não foram isolados. Esta reação, via de regra, levaria a obtenção do composto **7** com inversão de configuração no carbono C-3. Entretanto, o mecanismo proposto para esta reação não ocorre via $\text{S}_{\text{N}}2$, mas envolve a saída do tosilato por assistência da ligação dupla, gerando um carbocátion não clássico. Dessa forma, pode ocorrer a formação de dois produtos distintos, devido ao ataque do nucleófilo (etilenoglicol) no carbono C-3 ou no carbono C-6, o que leva a retenção da configuração β no carbono C-3. Este rearranjo é descrito por Sun e colaboradores (2009) e é conhecido como rearranjo *i*-esteroide. O mecanismo proposto para a reação encontra-se descrito no Esquema 9 (pág. 71).

Foram observados sinais compatíveis com a estrutura do produto **7** nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H (Figura A.11, pág. 172) notou-se a presença de dois tripletos, relativos aos hidrogênios metilênicos H-28 e H-29, em δ 3,58 e δ 3,71.

Esquema 9 – Proposta de rearranjo para obtenção do composto **7**.

Fonte: Adaptado de SUN *et al.*, 2009.

Nos espectros de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **7** (Figura A.12, pág. 173) podem ser notados novos sinais de carbonos metilênicos em δ 62,3 e δ 69,2, além do desaparecimento dos sinais dos carbonos aromáticos, referentes ao grupo tosila, confirmando a obtenção do composto. Todos os sinais relativos ao esqueleto esteroidal do colesterol mantiveram-se intactos.

O terceiro produto da rota de síntese apresentado na Figura 11 (pág. 69) é o composto **8** que foi obtido em condições iguais às descritas para o composto **6**. O produto foi obtido com rendimento de 96%, após purificação por cromatografia em coluna.

No espectro no infravermelho de **8** (Figura A.13, pág. 174) são observadas as bandas referentes ao estiramento simétrico e assimétrico de SO_2 (1355 , 1174 cm^{-1}) e banda em 1597 cm^{-1} , referente a estiramento $\text{C}=\text{C}$ de aromático. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C também confirmam a formação do composto (Figura A.14 e A.15, págs. 175 e 176).

Uma vez obtido o composto **8**, este foi submetido à reação de substituição nucleofílica bimolecular com a azida de sódio. A reação foi feita em DMF anidra a $80\text{ }^\circ\text{C}$ e após 1,5 h foi adicionado água ao meio reagente, levando à precipitação do produto **9**, obtido com 98% de rendimento.

A formação do composto **9** é facilmente evidenciada pela análise do espectro no infravermelho (Figura A.16, pág. 177), onde se observa uma banda intensa em 2102 cm^{-1} , referente a estiramento assimétrico de $\text{N}=\text{N}=\text{N}$.

Por fim, o composto **10** foi obtido a partir da redução do grupo azido, utilizando-se hidreto de lítio e alumínio, em THF anidro, à temperatura ambiente. O consumo de todo material de partida ocorreu após 1,2 h de reação. Em seguida, foi adicionado gelo ao balão e a

mistura reagente foi extraída com diclorometano. O composto foi purificado por CCD e obtido com 89% de rendimento. Devido à baixa estabilidade da amina obtida, esta foi utilizada em sequência para obtenção das amidas de interesse.

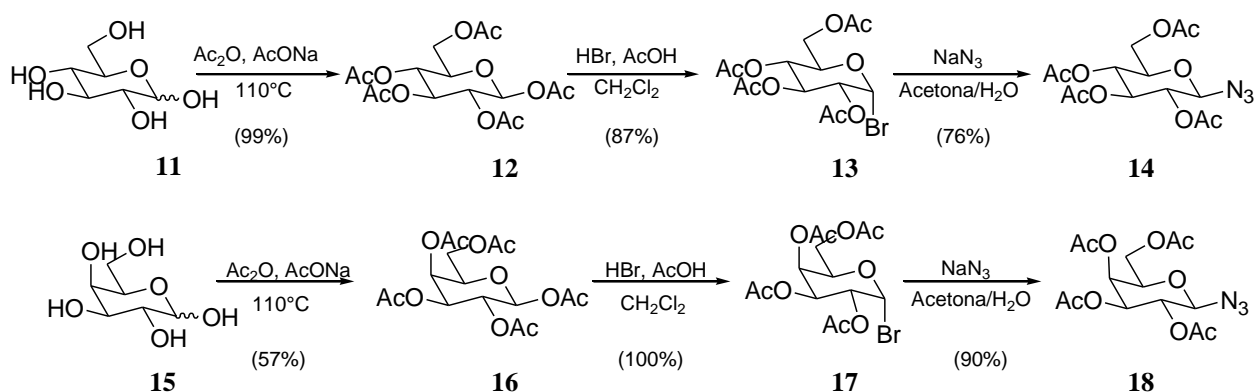
A comprovação do sucesso na conversão de **9** em **10** foi feita pela análise de seus espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro no infravermelho de **10** (Figura A.19, pág. 180) observou-se bandas de absorção em 3359 e 3281 cm^{-1} , referentes a estiramento N-H de amina primária. Nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figuras A.20 e A.21, págs. 181 e 182) observam-se que os hidrogênios H-28 e H-29 do composto **10** são mais blindados do que os respectivos hidrogênios no composto **9**. Isto porque o grupo amino tem menor efeito retirador de densidade eletrônica quando comparado com o grupo azido.

4.3 Síntese das glicosilazidas

Os carboidratos escolhidos para serem avaliados quanto as suas propriedades furtivas foram: D-glicose, D-galactose e *N*-acetilglicosamina. A escolha destes compostos foi feita devido ao baixo custo e a facilidade de introdução do grupo azido no carbono anomérico. Além disto, estes carboidratos estão ligados a processos de reconhecimento celular, podendo atuar como direcionadores ativos em sistemas nanoestruturados (BOONS, 2010; BERNARDES *et al.*, 2010).

As glicosilazidas da D-glicose e D-galactose foram obtidas através da mesma metodologia síntese (Figura 12). Dessa forma, será abordada apenas a obtenção da glicosilazida derivada da D-glicose.

Figura 12 – Síntese das glicosilazidas derivadas da D-glicose (**14**) e D-galactose (**18**).



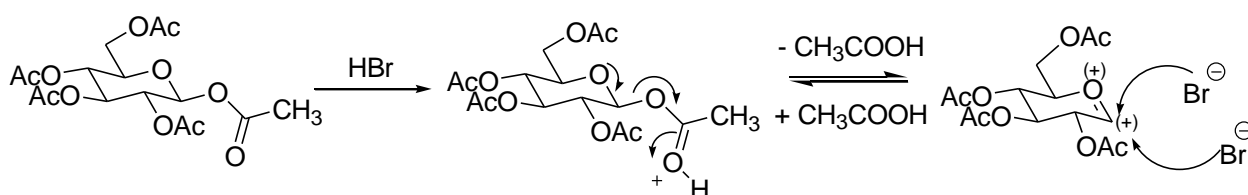
A primeira etapa de síntese consiste na proteção das hidroxilas do carboidrato, com anidrido acético em presença de acetato de sódio, condições que levaram a obtenção do anomero β (**12**) com 99% de rendimento. A utilização de grupos protetores é uma prática

comum em química de carboidratos, visto que a introdução destes grupos possibilita a funcionalização dos carboidratos e, em geral, facilita o manuseio dos produtos obtidos por torná-los mais solúveis em solventes orgânicos. Um bom grupo protetor deve ser estável e de fácil remoção em condições brandas (PÉTURSSON, 1997).

A segunda etapa de síntese consiste na conversão do derivado per-*O*-acetilado **12** no brometo de glicosila **13**. Esta reação foi feita em mistura de ácido bromídrico e anidrido acético, fornecendo o composto **13** com 87% de rendimento.

Um mecanismo proposto para a substituição nucleofílica unimolecular do grupo acetato do carbono anomérico pelo íon brometo está proposto no Esquema 10. De acordo com a proposta, o íon brometo pode atacar o íon oxônio formado por ambas as faces (superior e inferior), fornecendo uma mistura de anômeros (α e β). Entretanto, observa-se que apenas o produto termodinâmico (anômero α) é formado ao final da reação. Dois efeitos podem explicar o favorecimento da formação do anômero α em detrimento do β . O primeiro deles explica o efeito através da repulsão eletrônica existente no anômero β . Como mostrado na Figura 13 (pág. 74), os pares de elétrons livres do halogênio em C-1 no anômeros β e os dois pares de elétrons livres do oxigênio do anel piranosídico tem um momento dipolar na mesma direção, o que resulta em instabilidade do composto formado. Já no anômero α , os dipolos estão em direções opostas, reduzindo a interação desfavorável dipolo-dipolo, conferindo a este composto maior estabilidade eletrônica (KABAYAMA & PATTERSON, 1958).

Esquema 10 – Proposta de mecanismo para substituição nucleofílica unimolecular.



O segundo efeito que explica a obtenção preferencial do anômero α é o efeito estereoeletrônico, que se baseia na teoria dos orbitais moleculares (Figura 14, pág. 74). No anômero α , o par de elétrons do orbital axial não ligante do oxigênio piranosídico está paralelo ao orbital antiligante (σ^*) da ligação C-Br, favorecendo a superposição desses orbitais e a estabilização do anômero α (efeito anomérico ou de hiperconjugação). No anômero β nenhum dos orbitais não ligantes do oxigênio piranosídico está paralelo ao σ^* e por isso não há possibilidade de superposição (CLAYDEN, 2001).

Figura 13 – Efeito eletrônico nos anômeros α e β .

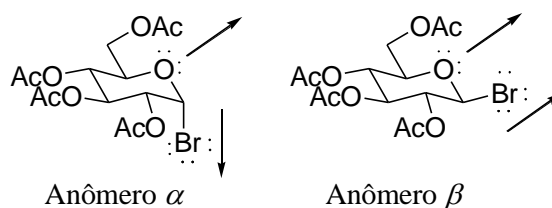
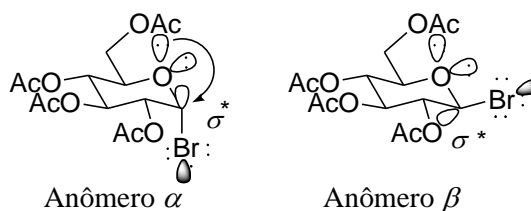


Figura 14 – Efeito anomérico (hiperconjugação) nos anômeros α e β .

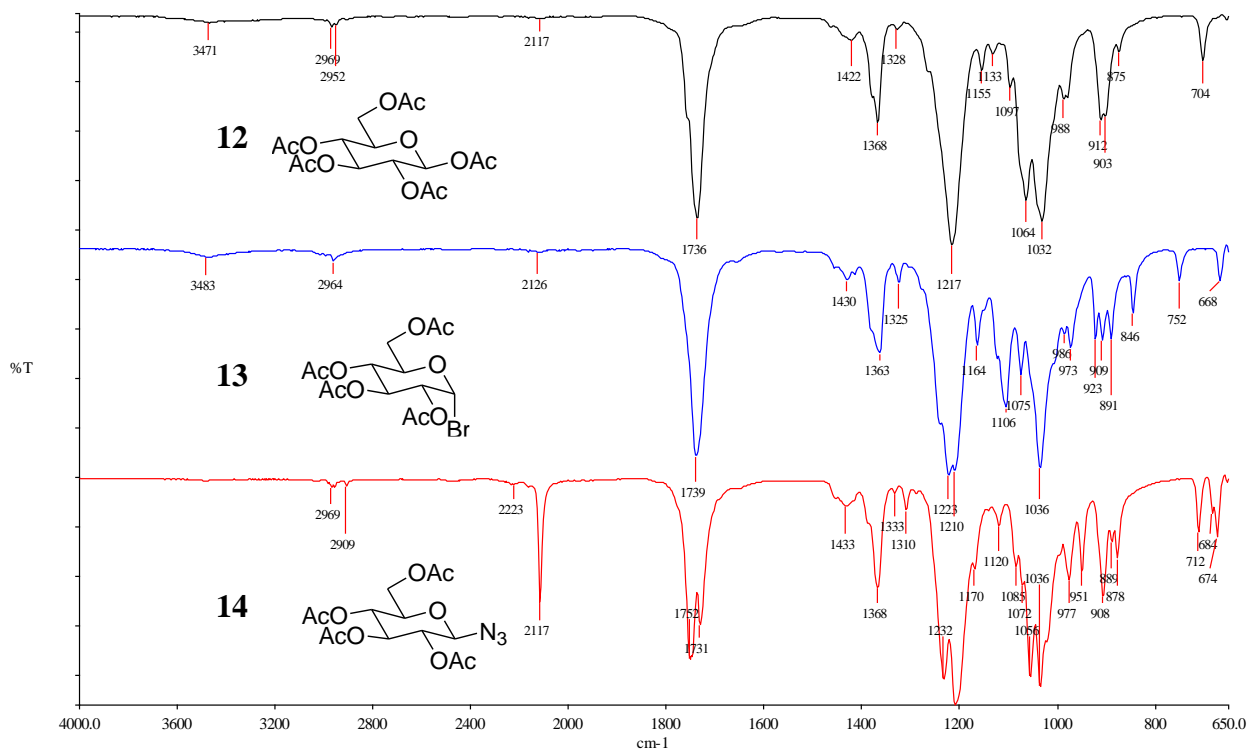
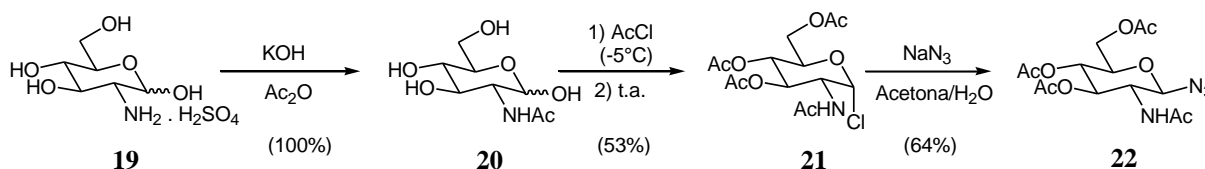


Após obtenção do composto **13**, este foi usado imediatamente na etapa seguinte devido a sua instabilidade. A azida **14** foi obtida por meio de substituição nucleofílica com azida de sódio em mistura de acetona e água à temperatura ambiente com 76% de rendimento.

A conversão dos grupos funcionais dos derivados da glicose é facilmente confirmada pela comparação dos espectros no infravermelho (Figura 15, pág. 75). No espectro do derivado **12**, não observamos bandas na região de 3200, confirmando a peracetilação das hidroxilas da glicose. Ainda pode ser observada uma banda intensa em 1736 cm^{-1} , característica de estiramento C=O de éster, bem como uma banda em 1217 cm^{-1} , típico de estiramento C-O de éster. No espectro do derivado **13** pode-se observar uma banda em 752 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C-Br. A obtenção do derivado **14** é facilmente evidenciada pela presença de uma banda intensa em 2117 cm^{-1} , típica de estiramento de grupo azido (R-N_3).

As glicosilazidas **14** e **18** também foram caracterizadas por RMN de ^1H e de ^{13}C e tiveram todos os seus sinais atribuídos de acordo valores de deslocamento já descritos na literatura (FRANCO, 2015; MONEGAL & PLANAS, 2006).

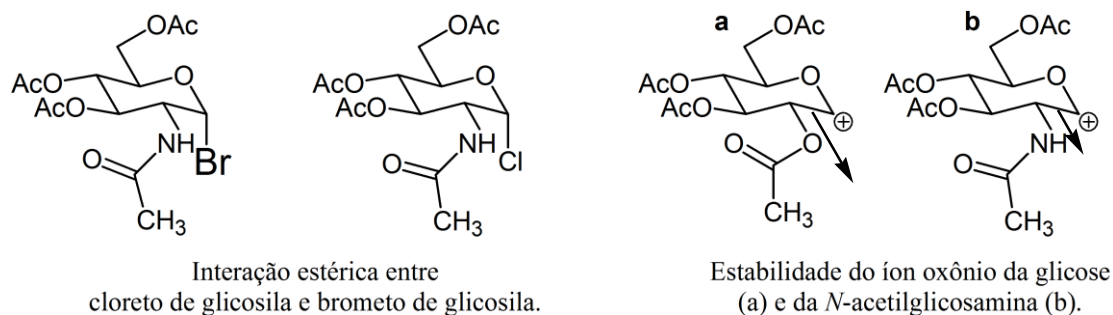
Para obtenção da azida **22**, derivada da *N*-acetilglicosamina, foi proposta rota de síntese alternativa na qual obtém-se o cloreto de glicosila e per-*O*-acetilado em uma única etapa (Figura 16) (HEIDLAS *et al.*, 1992).

Figura 15 – Espectros no infravermelho dos compostos **12**, **13** e **14**.**Figura 16** – Síntese da glicosilazida derivada da *N*-acetilglicosamina (**22**)

O derivado **21** foi obtido através da reação da *N*-acetilglicosamina (**20**) com cloreto de acetila em um sistema vedado. A primeira reação que ocorre no sistema é a peracetilação de **20**, que leva à formação de HCl *in situ*. Dessa forma íon cloreto presente no meio pode atacar o íon oxônio formado, levando à formação do cloreto de glicosila na forma anomérica α . Há uma preferência em se trabalhar com o cloreto de glicosila da *N*-acetilglicosamina em detrimento do brometo, devido a efeitos estéricos e eletrônicos. Isso porque o cloreto é um átomo menos volumoso que o bromo e, por isso, há menor repulsão estérica entre o cloreto e o grupo acetamido em C-2 (Figura 17, pág. 76). A eletronegatividade também influencia na preferência pelo cloreto. O íon oxônio formado devido à hidrólise do haleto de glicosila da *N*-acetilglicosamina é mais estável quando se comparado aos derivados da glicose (Figura 17). Assim, para compensar o efeito da eletronegatividade em C-2, é preferível a utilização do

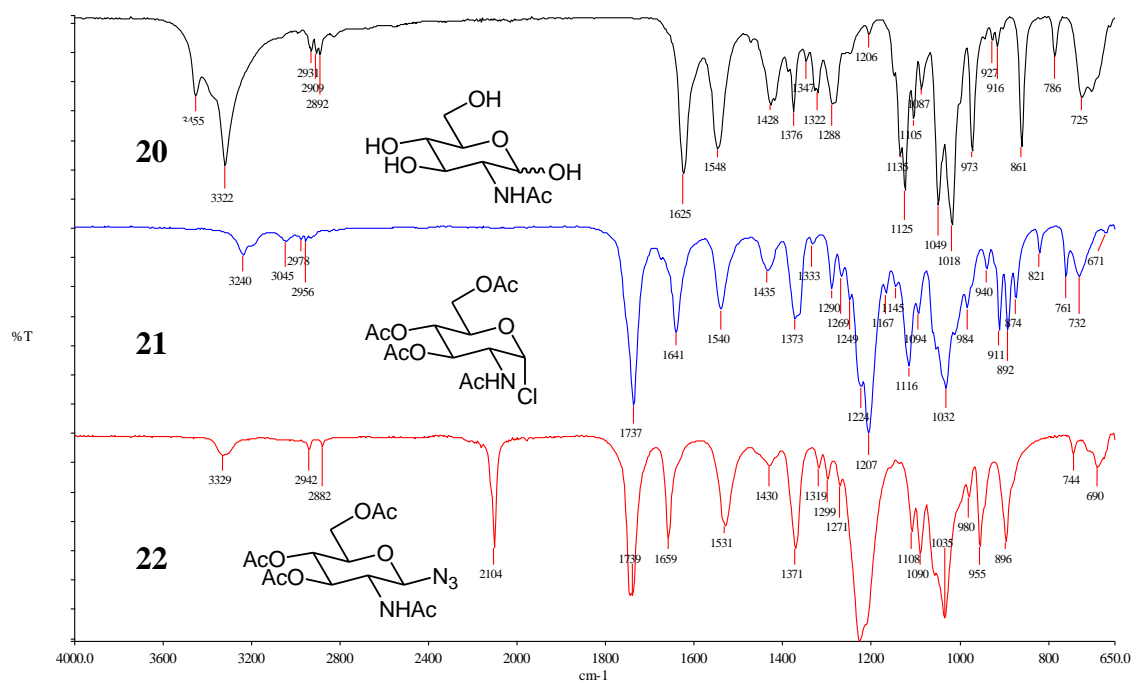
cloreto, uma vez que este apresenta uma ligação mais forte com o carbono, quando comparado ao brometo.

Figura 17 – Efeitos estéricos e eletrônicos em haletos da *N*-acetilglicosamina.



A obtenção dos derivados **20**, **21** e **22** é facilmente confirmada mediante a comparação dos espectros no infravermelho (Figura 18). No espectro do derivado **20** observa-se banda intensa em 1625 cm^{-1} , típica de estiramento $\text{C}=\text{O}$ de amida, confirmando a obtenção deste composto. No espectro do derivado **21** não são observadas bandas em 3322 cm^{-1} , confirmando a peracetilação das hidroxilas. Além disso, uma banda intensa em 1737 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ de éster também é observada. A obtenção do derivado **22** é facilmente evidenciada pela presença de banda intensa em 2104 cm^{-1} , característica de estiramento de grupo azido ($\text{R}-\text{N}_3$).

Figura 18 – Espectros no infravermelho dos compostos **20**, **21** e **22**.



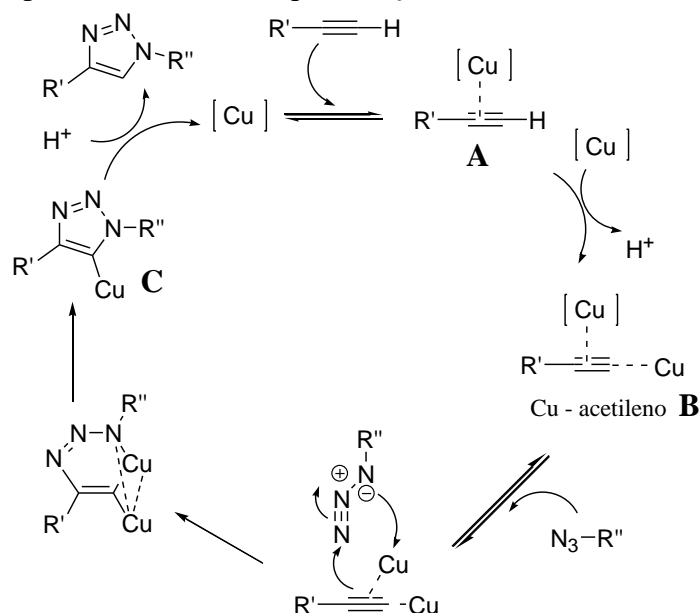
A glicosilazida da *N*-acetilglicosamina **22** também foi caracterizada por RMN de ^1H e de ^{13}C e teve todos os seus sinais atribuídos de acordo valores de deslocamento já descritos na literatura (FRANCO, 2015).

4.4 Síntese dos glicosiltriazóis

As azidas orgânicas obtidas foram utilizadas, juntamente com o éter propargílico do ácido gálico (**4**), para obtenção dos derivados 1,2,3-triazólicos **23** e **24** (Figura 19, pág. 78). O procedimento de síntese utilizado foi adaptado de Kushwaha e Tiwari (2013). A reação, conhecida como “click”, ocorre mediada por íons Cu(I) . O mecanismo envolvido na obtenção dos triazóis ainda não é bem definido, sendo a proposta apresentada no Esquema 11 mais aceita atualmente (FREITAS *et al.*, 2011).

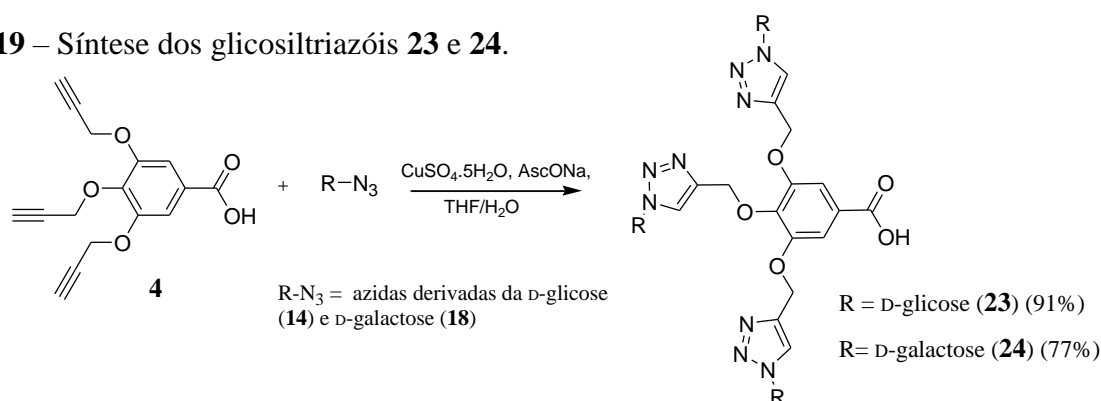
A primeira etapa do mecanismo envolve a formação do acetileto de Cu(I) , a partir da complexação do cobre com os elétrons do alcino. A formação deste complexo (**A**) leva à redução do pK_a do hidrogênio terminal do alcino de 25 para 9,8, possibilitando sua desprotonação em meio aquoso. Em seguida, ocorre uma nova complexação com um segundo átomo de Cu(I) , levando à formação do intermediário **B**. A etapa seguinte consiste na complexação da azida orgânica com o grupo acetileno. Neste intermediário formado, o cobre possui um efeito sinérgico, pois torna o carbono do alcino mais nucleofílico, além de tornar o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico, favorecendo a formação do metalociclo na próxima etapa. Por fim, a contração do anel metalociclo provoca a saída de um Cu(I) , seguida pela formação do triazolila de cobre (**C**). Este, por sua vez, ao sofrer protonólise, leva a formação do 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (WORRELL, 2013).

Esquema 11 – Proposta de mecanismo para reação “click”.



A proposta mecanística da reação “click” envolve a participação do Cu(I) como catalisador. Entretanto, outras fontes de Cu(I) podem ser utilizadas na reação. Uma delas, desenvolvida por Sharpless e colaboradores, propõe o uso de sais estáveis de Cu(II), como o sulfato penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), em presença de um agente redutor fraco como o ascorbato de sódio. A utilização desta metodologia possui algumas vantagens como: menor interferência do oxigênio atmosférico e a possibilidade de se utilizar água como solvente da reação, devido à hidrossolubilidade do ascobarto e do sulfato de cobre (FREITAS *et al.*, 2011).

Figura 19 – Síntese dos glicosiltriazióis **23** e **24**.



A reação “click” levou à obtenção dos compostos **23** e **24** com 91 e 77% de rendimento, respectivamente (Figura 19). Os derivados foram purificados utilizando-se coluna cromatográfica de sílica gel e fluorisil no topo da coluna. Entretanto, mesmo em presença de fluorisil, os compostos ainda eram obtidos contaminados com cobre. Isso possivelmente ocorre devido à complexação do grupamento ácido com o metal, dificultando sua purificação (LEONG & VITTAL, 2011). Dessa forma, realizou-se a extração do cobre com EDTA para completa purificação dos compostos. Entretanto, não foi possível purificar o triazol **25** (derivado da *N*-acetilglicosamina) por meio deste método, uma vez que este composto não foi solúvel em solventes orgânicos pouco polares, como clorofórmio e acetato de etila, o que inviabilizou sua extração com solução de EDTA. Desta forma, foi proposta a rota de síntese mostrada no Esquema 7 (pág. 40), na qual haveria primeiro o acoplamento com o colesterol para em seguida realizar a reação click.

Os triazióis obtidos foram caracterizados por espectroscopia no IV e RMN de ^1H e de ^{13}C . A atribuição dos carbonos foi realizada comparando-se os deslocamentos químicos obtidos para as azidas e para o éter propargílico utilizados na obtenção dos triazióis. Além disso, a intensidade dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C também permitiu a atribuição inequívoca dos mesmos. Como exemplo será abordada a caracterização do triazol **23**.

No espectro no infravermelho de **23** (Figura A.37, pág. 190) observou-se que a banda referente ao grupo azido em 2117 cm^{-1} e as bandas referentes ao grupo propargila em 3274 , 3298 cm^{-1} e 2127 cm^{-1} não foram registradas no espectro, evidenciando ausência de material de partida. Além disso, também é observada uma banda intensa em 1743 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C=O de éster dos grupos acetilas do carboidrato.

No espectro de RMN de ^{13}C de **23** (Figura A.39, pág. 192) foram observados sinais entre δ 20,3 e 20,9, referentes aos carbonos metílicos do grupo acetila. Os sinais dos carbonos referentes aos carboidratos estão localizados entre δ 61,6 e 86,1. Nesta mesma região encontram-se os sinais dos carbonos metilênicos C-6 e C-9, que foram atribuídos de forma inequívoca devido à sua intensidade, sendo o primeiro com deslocamento químico de δ 65,8 e o segundo δ 62,8. Na região dos sinais dos carbonos aromáticos, os carbonos metínicos foram identificados com deslocamento químico em δ 109,2. O sinal em δ 141,5 foi atribuído ao carbono C-1, enquanto os sinais em δ 144,6 e 151,7 foram associados a C-4 e C-3, respectivamente.

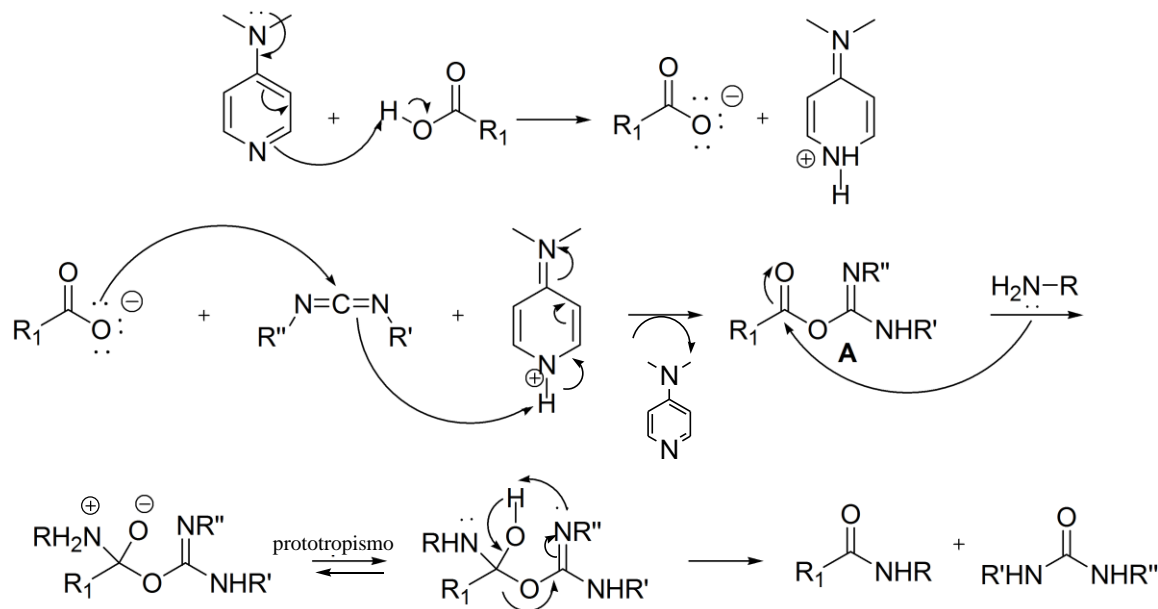
A partir do mapa de contornos HMQC e subespectro DEPT-135 (Figura A.40, pág. 193) foi possível atribuir todos os hidrogênios dos carboidratos, uma vez que os sinais referentes aos carbonos já eram conhecidos. Dessa forma, o multipletto localizado entre δ 4,01-4,28 refere-se aos hidrogênios H-3', H-3'', H-6' e H-6''. Já o multipletto entre δ 5,20-5,39 corresponde aos hidrogênios do carboidrato H-2', H-2'', H-5', H-5'' e aos hidrogênios metilênicos H-6 e H-9. O tripleto aparente em δ 5,51 refere-se ao hidrogênio H-4'. O tripleto em δ 5,59, com constante de acoplamento (3J) igual a 9,31 Hz, corresponde ao hidrogênio H-4''. Por fim, os sinais referentes aos carbonos anoméricos foram observados em δ 85,4 e 85,7. Dessa forma, os carbonos C-1' e C-1'' foram associados aos dupletos em δ 6,15 e 5,94, respectivamente. O composto também foi caracterizado por espectrometria de massas, onde foi observado sinal em m/z 1404,4138 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4.5 Síntese das amidas

As amidas **26** e **27** foram sintetizadas pelo procedimento mostrado no Esquema 6 (pág. 39), no qual se utilizam os reagentes de acoplamento EDAC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] e DMAP (N,N-dimetilaminopiridina), de acordo com o mecanismo mostrado no Esquema 12 (pág. 80). Inicialmente, o ácido carboxílico é desprotonado e, em seguida, reage com o EDAC para formar o éster ativado (O-acilisouréia - **A**), que apresenta reatividade semelhante à de um anidrido de ácido carboxílico. Em seguida, a amina ataca o composto **A**, levando à formação da amida de interesse. Os produtos brutos

foram purificados por cromatografia e as amidas **26** e **27** foram obtidas com rendimentos de 61 e 75%, respectivamente.

Esquema 12 – Proposta de mecanismo da reação de acoplamento utilizando-se EDAC e DMAP.



No espectro no infravermelho de **26** e **27** (Figura A.47 e A.52, págs. 200 e 205) são observada bandas em 2935 e 2936 cm⁻¹, respectivamente, referentes ao estiramento C-H alifático dos carbonos do colesterol, banda de estiramento C=O de éster em 1747 cm⁻¹, banda de estiramento C=O de amida em 1636 e 1659 cm⁻¹ e banda de estiramento C-O assimétrico e simétrico de éster em 1210 e 1035 cm⁻¹ para o composto **26** e 1211 e 1045 cm⁻¹ para o composto **27**.

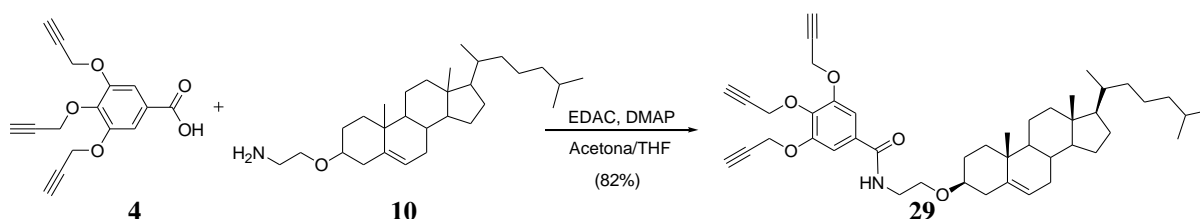
No espectro de RMN de ¹H de ambos os compostos (Figura A.48 e A.53, págs. 201 e 206) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios do esteroide entre δ 0,68 e 3,22. Além disso, observa-se um sinal largo em δ 6,91 (composto **26**) e δ 6,83 (composto **27**) relativos ao hidrogênio amídico. Também são observados sinais na região de δ 4,06 a δ 6,24, referentes aos hidrogênios dos carboidratos.

Nos espectros de RMN de ¹³C de **26** e **27** (Figura A.49 e A.54, pág. 202 e 207) observam-se os sinais referentes aos carbonos carbonílicos da amida em δ 167,2 e 166,9, respectivamente, além dos sinais correspondentes aos carbonos dos carboidratos e do núcleo esteroidal.

Para viabilizar a obtenção do triazol da *N*-acetilglicosamina foi necessária a síntese do composto **29**, dessa forma, seria possível obter o triazol **28** por meio da reação “click”, entre **29** e a azida **22**. O composto **29** foi sintetizado mediante a mesma metodologia utilizada para

os compostos **26** e **27**, obtendo-se o produto com 82% de rendimento (Figura 20). Como o composto **29** não possui grupamento ácido em sua estrutura, durante o processo de purificação não houve problema com relação ao cobre, que foi facilmente removido do meio apenas com purificação em coluna cromatográfica de sílica gel.

Figura 20 – Síntese da amida **29**.



No espectro no infravermelho de **29** (Figura A.63, pág. 216) são encontradas, entre outras, bandas em 3288 e 3210 cm^{-1} referentes ao estiramento C-H de alcino. Observou-se ainda uma banda em 1626 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O de amida.

No espectro de RMN de ^1H de **29** (Figura A.64, pág. 217) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios do esteroide entre δ 0,68 e 2,39. Os hidrogênios H-8' e H-11' apresentaram-se na forma de tripleto, em δ 2,46 e 2,53, com valores de constante de acoplamento de 2,36 (4J) e 2,24 (4J) Hz, respectivamente. Além disso, observa-se um simpleto em δ 4,79 relativo aos hidrogênios H-6'e H-9'. Na região referente aos sinais de hidrogênios aromáticos, o simpleto detectado em δ 7,20 foi atribuído a H-2'.

No espectro de RMN de ^{13}C de **29** (Figura A.65, pág. 218) observa-se o sinal referente ao carbono carbonílico da amida em δ 166,8. Além disso, os sinais dos carbonos metínicos C-8'e C-11' foram detectados em δ 78,3 e 76,4 respectivamente; sendo possível sua atribuição devido à intensidade dos sinais.

O composto **29** viabilizou a síntese dos três triazóis (glicose, galactose e *N*-acetilglicosamina), por meio da reação “click” entre este composto e as respectivas glicosilazidas. Dessa forma, foi possível obter os composto **26**, **27** e **28** com rendimentos de 85, 81 e 90%, respectivamente.

4.6 Reação de desproteção dos glicosídeos

A remoção dos grupos acetila dos glicosiltriazóis **26**, **27** e **28** foi feita utilizando-se o método de Zemplén (FIGUEIREDO *et al.*, 2009), que consiste em uma metodologia suave de desproteção, por transesterificação com metóxido de sódio em metanol, dos grupamentos éster

do anel piranosídico. Todos os glicosídeos (**30**, **31** e **32**) foram obtidos por essa metodologia com rendimentos superiores a 98%.

Os produtos finais foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e espectrometria de RMN de ^1H , de ^{13}C e subespectro DEPT-135. Nos espectros no infravermelho de **30**, **31** e **32** (Figura A.67, A.72 e A.77, págs. 220, 225 e 230) não foram observadas as bandas relativas ao estiramento de C=O de éster, confirmando a ocorrência da desacetilação dos carboidratos. Além disso, como esperado, foram observadas bandas em 3339, 3325 e 3287 cm^{-1} , para **30**, **31** e **32**, respectivamente, referentes ao estiramento das hidroxilas alcoólicas. Nos espectros de RMN de ^1H de todos os compostos (Figura A.68, A.73 e A.78, págs. 221, 226 e 231) observam-se sinais na região de δ 6,00 a δ 4,50, relativos aos hidrogênios do carboidrato desprotegido e não foram observados sinais referentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetila. Nos espectros de RMN de ^{13}C de **30**, **31** e **32** (Figura A.69, A.74 e A.79, págs. 222, 227 e 232) também não foram constatados sinais referentes aos carbonos metílicos e carbonílicos dos grupos acetila. Apenas para o composto **32** foram observados sinais na região de δ 165 a 169, que correspondem às carbonilas do grupo acetamido.

5 Conclusão

Foram sintetizados três glicosiltriazóis inéditos, derivados de D-glicose, D-galactose e N-acetilglicosamina. Os compostos foram obtidos por duas vias sintéticas, ambas com 14 etapas, com rendimentos globais variando de 9 a 22%, conforme indicado na Tabela 2. Apesar de ambas as rotas possuírem o mesmo número de etapas, a síntese por meio da rota 2, proposta no Esquema 7 (pág. 40) foi operacionalmente mais simples e prática de se executar. Além disso, o rendimento dos compostos por esta via foi superior à rota 1, proposta inicialmente (Esquema 5 e 6, pág. 39)

Tabela 2 – Rendimentos globais obtidos para os glicosiltriazóis sintetizados.

Glicosiltriaazol	Rota 1		Rota 2	
	Número de etapas	Rendimento global (%)	Número de etapas	Rendimento global (%)
D-glicose	14	17	14	22
D-galactose	14	11	14	15
N-acetilglicosamina	-	-	14	9

CAPÍTULO II

Desenvolvimento de lipossomas revestidos com carboidratos e estudo de estabilidade das formulações

1 Introdução

O design inovador e a funcionalização química dos lipossomas, visando promover uma entrega mais eficiente e direcionada do fármaco, ainda é um desafio. Conforme já relatado, uma das propostas mais utilizadas para aumentar o tempo de circulação sanguínea destas nanoestruturas é através da incorporação do PEG à sua superfície. Esta abordagem, entretanto, possui inúmeras desvantagens, especialmente em relação à sua biocompatibilidade. Desta forma, atualmente, a pesquisa tem se voltado para utilização de substâncias naturais na fabricação destes nanocarreadores, uma vez que tais compostos são compatíveis com o sistema metabólico e têm alto potencial para promover maior reconhecimento e internalização das vesículas (SWIERCZEWSKA *et al.*, 2016).

Desta forma, neste capítulo do trabalho tem-se como objetivo descrever o desenvolvimento de uma formulação lipossomal revestida por derivados de carboidratos e a avaliação das suas características físico-químicas, morfológicas e também sua estabilidade de armazenamento. Vale ressaltar que o desempenho dos lipossomas como sistema de liberação de fármacos está diretamente relacionado à sua estrutura, estabilidade, dispersão de tamanho, morfologia e teor de encapsulação. Portanto, a caracterização das vesículas e a investigação destes parâmetros são fundamentais para que os resultados desejados sejam alcançados.

2 Parte experimental

2.1 Materiais

O cloridrato de doxorrubicina foi adquirido na Lancrix Chemicals (Shanghai, China) com teor maior que 99,9% de acordo com laudo do fabricante. A fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), o fosfatidilglicerol de ovo (EPG), o diestearoil fosfatidiletanolamina peguilada (DSPE-PEG₂₀₀₀) foram comprados da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O colesterol e o HEPES foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, EUA). O metanol grau HPLC foi adquirido da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brazil). A água foi purificada em sistema Milli-Q® (Millipore, MA, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Doseamento da doxorrubicina

O doseamento da doxorrubicina foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência.

2.2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O método utilizado para quantificar o teor de doxorubicina por CLAE foi realizado conforme procedimento descrito por Alvarez-Cedrón e colaboradores (1999) com algumas modificações. Os parâmetros cromatográficos utilizados foram:

- ✓ Coluna de fase reversa (C₈, 250 x 4,6 mm, 5 µm; ACE, RU);
- ✓ Fase móvel composta por uma mistura de metanol e tampão fosfato 0,05 M, pH 3 (65:35, v/v);
- ✓ Detecção em comprimento de onda de emissão a 470 nm e excitação a 555 nm;
- ✓ Fluxo de 1,0 mL/minuto e volume de injeção de 20 µL (módulo de bomba isocrática Waters 515, injetor automático Waters 717 Plus e detector Waters 474; Milford, EUA).

2.2.1.1.1 Parâmetros de validação

Os parâmetros de validação avaliados para o método foram linearidade, precisão intra-dia, limites de detecção e quantificação.

2.2.1.1.1.1 Linearidade

A solução comercial de doxorubicina com teor maior que 99,9% foi utilizada como padrão de trabalho. Foram preparadas três soluções estoques na concentração de 1000 µg/mL em MeOH : H₂O (1:1). As diluições foram preparadas, em triplicata, tomando-se alíquotas de 1,0 mL (transferida para balão de 50 mL); 2,5 mL (transferida para balão de 25 mL) e 5 mL (transferida para balão de 10 mL). A partir da solução a 1 µg/mL, foram feitas novas diluições, tomando-se alíquotas de 5 mL e transferindo para balões de 10 mL. Os volumes foram completados com fase móvel. As concentrações finais obtidas foram 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 µg/mL. Após a estabilização da linha de base, nas condições do ensaio, as soluções padrões foram filtradas em unidade filtrante de 0,45 µm e foram injetadas em triplicatas no cromatógrafo.

As áreas dos picos detectados foram utilizadas para a construção da curva analítica. A regressão linear foi verificada por meio do método de mínimos quadrados utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5. Foram avaliados os coeficientes de determinação (r²), correlação (r) e os fatores de resposta (y/x).

2.2.1.1.1.2 Precisão intra-dia

A avaliação da precisão intra-dia do método foi realizada por meio de três determinações de soluções de baixa, média e alta concentração. Foram preparadas três soluções estoques na concentração de 1000 µg/mL em MeOH : H₂O (1:1). Foram feitas diluições, em triplicatas, até as concentrações finais de 1,0; 0,5 e 0,0625 µg/mL respectivamente.

A média, o intervalo de confiança (IC) a 95% e o desvio padrão relativo (DPR) foram obtidos como resultado de avaliação da precisão.

2.2.1.1.1.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A determinação do LD e do LQ foi realizada com base no desvio padrão da resposta e inclinação da curva de calibração do fármaco. Foram utilizadas as equações a seguir:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{b}$$

b

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{b}$$

b

em que: σ , desvio padrão do intercepto com o eixo y; b, inclinação da curva analítica (ICH, 2005).

2.2.2 Desenvolvimento farmacotécnico das formulações lipossomais

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico (método de Bangham). Foram propostas diferentes concentrações e composições lipídicas para avaliar a estabilidade das vesículas obtidas, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição lipídica e razão molar para as formulações propostas.

Composição	Razão molar	Concentração lipídica total (mmol/L)
HSPC:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG)	12,22:8,25:1,137	21,607
HSPC:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG)	13,36:7,11:1,137	21,607
HSPC:EPG:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG)	11,20:2,16:7,11:1,137	21,607

Inicialmente, alíquotas clorofórmicas dos lípidos foram transferidas para um balão de fundo redondo e, em seguida, o solvente foi eliminado sob vácuo até a formação de um filme lipídico nas paredes do balão. Em seguida, o filme foi hidratado com solução de fosfato de

amônio 300 mM (pH 7,4) e solução contendo o carboidrato modificado. O sistema foi agitado vigorosamente em vórtex até obtenção de uma dispersão de lipossomas multilamelares grandes.

Os lipossomas obtidos foram calibrados mediante a passagem através de membranas de policarbonato de 0,4 μm , 0,2 μm e 0,1 μm , respectivamente. Este procedimento foi repetido dez vezes em cada membrana. Em seguida, os lipossomas foram ultracentrifugados (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-80 XP) a 150.000 x g, durante 2 horas, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi removido e substituído por tampão HEPES (pH 7,4).

A encapsulação da doxorrubicina foi realizada pelo método de gradiente. Dessa forma, 1 mL de lipossomas foi adicionado em um vidro de penicilina contendo 2 mg de cloridrato de doxorrubicina liofilizada. A mistura foi vortexada e deixada em contato por 2h a uma temperatura de 4 °C ou 1 h a temperatura de 60 °C. Em seguida, a doxorrubicina não encapsulada nos lipossomas foi separada da encapsulada utilizando-se ultracentrifugação a 150.000 x g, durante 2 horas, a uma temperatura de 4 °C. O *pellet* obtido foi disperso em tampão HEPES (pH 7,4).

2.2.3 Caracterização físico química e morfológica das formulações

2.2.3.1 Determinação do diâmetro médio das partículas

O diâmetro médio das partículas foi determinado por espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. As formulações (100 μL) foram diluídas em 3 mL de tampão HEPES e os resultados foram fornecidos como diâmetro efetivo (diâmetro médio avaliado pela intensidade). As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

2.2.3.2 Determinação do potencial zeta das partículas

O potencial zeta das formulações foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz associado à análise de mobilidade eletroforética das vesículas a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C. As medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras (100 μL) foram diluídas em 3 mL de solução tampão HEPES e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

2.2.3.3 Determinação do Teor de Encapsulação

O teor de encapsulação (TE) da DOX nos lipossomas foi determinado por CLAE, conforme método descrito no item 1.2.1.1. As vesículas lipossomais foram rompidas utilizando-se álcool isopropílico na proporção de 1:2. Em seguida, a preparação foi diluída em fase móvel. A quantidade de DOX foi determinada nos lipossomas antes da centrifugação (lipossomas totais) e após a centrifugação (lipossomas purificados). O TE da DOX foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$TE = ([DOX] \text{ lipossomas purificados} / [DOX] \text{ lipossomas totais}) \times 100.$$

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão e as determinações foram realizadas em triplicatas.

2.2.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A avaliação morfológica dos lipossomas foi realizada pelo emprego da técnica de MET no Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram coradas com solução de contraste contendo ácido fosfotúngstico 2% (p/v), albumina sérica bovina 0,5% (p/v) e sacarose 0,5% (p/v). A visualização das vesículas foi feita utilizando-se o equipamento Tecnai G2 12 Spirit Biotwin FEI, 120 kV.

2.2.4 Estudo de estabilidade das formulações

Para o estudo da estabilidade de armazenamento das formulações, foram preparados três lotes de lipossomas contendo DOX compostos por HSPC:EPG:CHOL:Carboidrato ou DSPE-PEG. As formulações lipossomais foram mantidas a 4 °C e caracterizadas em períodos de tempos iguais a 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias em termos diâmetro médio das vesículas, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação. Para determinação do teor de encapsulação, a concentração de DOX nos lipossomas foi obtida pelo método de ultrafiltração (20 min a 14000×g), utilizando o dispositivo Amicon[®] (Milipore, EUA) previamente passivado. Todos os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

2.2.4.1 Passivação das membranas de ultrafiltração

Considerando que a doxorrubicina tem potencial para se adsorver nos dispositivos de ultrafiltração foi necessária realizar a passivação dos filtros. Este procedimento tem por objetivo reduzir ou eliminar esta adsorção. Para isso, os dispositivos de ultrafiltração foram mantidos por cerca de 14h imersos em uma solução aquosa de Tween 20 a 5% p/v. Em seguida, foi realizada a lavagem dos dispositivos com água destilada, para eliminar o excesso desta solução. Para avaliar a eficácia do procedimento, foi realizada a ultrafiltração de uma

solução 10 µg/mL de DOX em filtros passivados e não passivados. A adsorção nos filtros não passivados foi aproximadamente 75% e nos filtros passivados cerca de 3%. Dessa forma, foi possível eliminar 97% da interação entre a DOX e a membrana de ultrafiltração.

2.2.5 Estudo de liberação das formulações

Estudos de liberação *in vitro* das formulações foram conduzidos através do método de diálise. Para isso, 1 mL de lipossomas foi adicionado nos dispositivos (membranas) de diálise com tamanho de cutoff de 14000 Da (membrana de éster de celulose, Sigma-Aldrich; St.Louis, EUA). Em seguida, os sacos foram selados e incubados com 100 mL de PBS pH 7,4 por até 48 h, a 37 °C, sob agitação contínua a 150 rpm. Alíquotas foram retiradas em tempos específicos (o volume do meio receptor foi reconstituído após cada coleta) e a concentração total de doxorrubicina (DOX total) e a fração liberada (DOX liberada) foram dosadas de acordo com o método descrito no item 1.2.1. A quantidade de doxorrubicina liberada foi calculada e plotada como perfil de liberação utilizando a seguinte equação:

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{[\text{DOX liberada}]}{[\text{DOX total}]} \times 100$$

Onde, *DOX liberada* corresponde à concentração de doxorrubicina medida no meio fora da bolsa de diálise e a *DOX total* corresponde à concentração teórica total de doxorrubicina, considerando a diluição do meio.

2.2.6 Análise estatística

Os resultados estão representados por média ± desvio padrão. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 Resultados e discussão

3.1 Doseamento da doxorubicina

Para quantificação da doxorubicina foi necessária a construção de uma curva de calibração, com concentrações variando de 1,0 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$. Os parâmetros de validação foram avaliados de acordo com a RDC 166 (BRASIL, 2017).

3.1.1 Linearidade

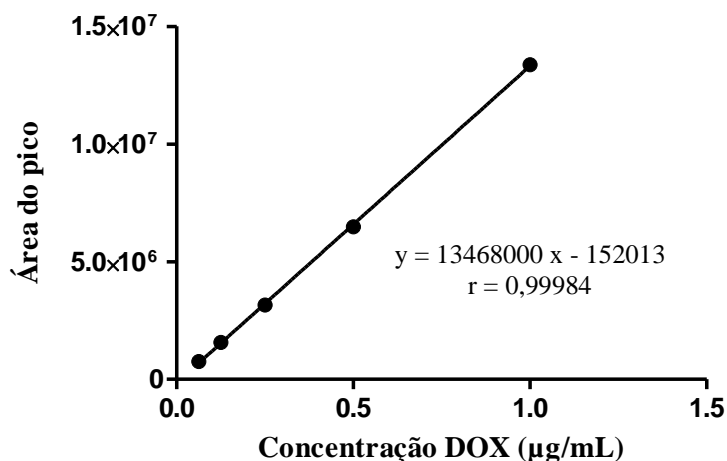
A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma faixa pré-determinada (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). O método proposto se mostrou linear para determinação de doxorubicina na faixa de 1,0 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de DOX por CLAE, em triplicata.

DOX $\mu\text{g/mL}$ (X)	N	Área do pico (Y)	Fator de Resposta (Y/X)
1,0	1	13319797	13319797
	2	13417791	13417791
	3	13377052	13377052
0,5	1	6438987	12877974
	2	6581246	13162492
	3	6424283	12848566
0,25	1	3110423	12441692
	2	3247928	12991712
	3	3123470	12493880
0,125	1	1584542	12676336
	2	1577878	12623024
	3	1536664	12293312
0,0625	1	768022	12288352
	2	754829	12077264
	3	740173	11842768
Média		-	12715467
DPR (%)		-	3,68

A curva analítica foi construída com os dados da Tabela 4 (pág. 90) e está representada na Figura 21.

Figura 21 – Curva analítica média obtida (1,0 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$) para determinação de DOX por CLAE.



A regressão linear foi calculada pelo método dos mínimos quadrados. A equação da reta obtida foi $y = 13468000 x - 152013$. O coeficiente de correlação (r) obtido (0,99984) está de acordo com a especificação ($r > 0,999$) (BRASIL, 2017). A linearidade do método foi confirmada, pois o valor do coeficiente de determinação (r^2) foi superior a 0,99 (0,99969). A análise de regressão linear desta reta revela que não há correlação significativa entre concentração e FR^2 no nível de significância de 5%, indicando assim, que há uma resposta linear para toda faixa de concentração da DOX. O valor de desvio padrão relativo dos fatores de resposta foi menor que 5%, indicando homogeneidade entre a relação dos valores de área dos picos de DOX e seus respectivos valores de concentração (GREEN, 1996). Na Tabela 5 estão listados os parâmetros obtidos na análise de regressão linear para determinação de DOX por CLAE.

Tabela 5 – Resultados da regressão linear.

Parâmetros da Regressão Linear	Método CLAE
Inclinação \pm desvio padrão	13468000 \pm 65658
Intercepto \pm desvio padrão	-152013 \pm 33899
Coeficiente de correlação (r)	0,99984
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99969
Faixa de concentração	1,0 - 0,0625 $\mu\text{g/mL}$

3.1.2 Precisão intra-dia

A precisão é a dispersão dos resultados entre ensaios repetidos em uma mesma amostra. A precisão foi avaliada através de medidas, em triplicata, realizadas no mesmo dia. Os valores de DPR estão apresentados na Tabela 6. O intervalo de confiança da média a 95% foi calculado por meio da seguinte fórmula:

$$IC_{95\%} = \text{média de } x \pm t_{n-1} (\sigma / \sqrt{n}),$$

em que: t_{n-1} , é o valor de t de Student tabelado para 2 graus de liberdade ao nível de significância de 5% (4,30); σ , é o desvio padrão dos valores de x; n, é o número de observações (RIBANI, 2004).

Tabela 6 – Resultados da precisão intra-dia para determinação de DOX por CLAE, em triplicata

Doxorrubicina (concentração teórica)	Área do Pico	DOX ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão DPR (%) Intra-dia
1,0	13319797	1,0003	0,30
	13417791	1,0076	
	13377052	1,0045	
0,5	6438987	0,4894	1,06
	6581246	0,4999	
	6424283	0,4883	
0,0625	768022	0,0683	1,27
	754829	0,0673	
	740173	0,0662	

Os valores de DPR encontrados pra precisão intra-dia são adequados e estão de acordo com as especificações da ANVISA (BRASIL, 2017) e do International Conference on Harmonisation (ICH, 2005), $DPR \leq 2\%$.

3.1.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção de uma substância refere-se ao menor valor de concentração que pode ser detectado, entretanto não pode ser quantificado de forma precisa e exata (BRASIL, 2017). O valor teórico obtido para LD da DOX foi igual a 0,0161 $\mu\text{g/mL}$.

O limite de quantificação refere-se à menor concentração de uma substância que pode ser medida de forma exata e precisa. O valor de LQ para a DOX foi de 0,0252 $\mu\text{g/mL}$,

indicando que valores superiores ou iguais a este podem ser quantificados com exatidão e precisão aceitáveis.

3.2 Desenvolvimento farmacotécnico das formulações lipossomais

Os lipossomas têm sido amplamente estudados como sistemas de entrega de fármacos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e versatilidade em carrear fármacos hidrofílicos e lipofílicos. Muitos estudos mostram que formulações lipossomais contendo agentes antitumorais apresentam menor toxicidade quando comparadas ao fármaco livre (AKBARZADEH *et al.*, 2013). No desenvolvimento de lipossomas, vários parâmetros físico-químicos, tais como diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação devem ser avaliados, isto porque eles influenciam de forma direta na estabilidade e eficiência destes sistemas (PATTNI *et al.*, 2015).

A primeira etapa para o desenvolvimento da formulação lipossomal foi investigar a composição lipídica que levaria a obtenção de um sistema com maior estabilidade. Inicialmente foi proposta uma formulação lipossomal com composição lipídica HSPC:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG), com razão molar igual 12,22:8,25:1,137. Esta composição foi baseada na formulação comercial DOXIL, que apresenta a mesma composição lipídica (HSPC:CHOL:DSPE-PEG - 12,22:8,25:1,137) (SOUNDARARAJAN *et al.* 2009). Foram preparados 3 lotes de 3 mL de lipossomas brancos, contendo os diferentes derivados de carboidratos sintetizados ou DSPE-PEG. Os lipossomas revestidos por glicose serão designados como GlcL, os revestidos por galactose como GalL, os revestidos por *N*-acetilglicosamina como GlcNAcL e os lipossomas peguilados como PegL.

Foram avaliados o diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta das formulações na condição apresentada, conforme apresentado na Tabela 7 (pág. 94). Os resultados mostram que a composição proposta inicialmente (1) não pôde ser aceita, pois os lipossomas obtidos apresentaram valores de IP superiores a 0,3, caracterizando um sistema polidisperso. A instabilidade do sistema possivelmente está relacionada à concentração elevada de colesterol na bicamada lipídica. Um estudo conduzido por Ueki e colaboradores (2015) mostrou que a adição de compostos ancorados ao colesterol deve ser acompanhada de uma redução deste lípide na composição da formulação. Dessa forma, foi proposta a segunda composição lipídica (HSPC:CHOL:Carboidrato ou DSPE-PEG), onde houve uma redução de 5,3% na concentração de colesterol adicionada, devido à presença desta substância nos derivados de carboidratos. Inicialmente os lipossomas obtidos apresentaram tamanho e índice

de polidispersão dentro do limite aceitável. Os valores de potencial zeta em todas as formulações ficaram próximos da neutralidade.

Tabela 7 – Dados das características físico-químicas dos lipossomas em função da composição e concentração lipídica.

	Composição (Lípides / Razão molar)	Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
1	HSPC:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG) (12,22:8,25:1,137)	GlcL	185,8 ± 4,1	0,51 ± 0,06	-1,23 ± 0,2
		GalL	160,0 ± 1,1	0,28 ± 0,03	-1,45 ± 0,3
		GlcNAcL	183,9 ± 2,1	0,22 ± 0,03	-1,32 ± 0,2
		PegL	148,6 ± 3,0	0,02 ± 0,01	-1,76 ± 0,4
2	HSPC:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG) (13,36:7,11:1,137)	GlcL	143,4 ± 3,2	0,10 ± 0,03	-2,68 ± 0,2
		GalL	139,3 ± 2,3	0,23 ± 0,01	-1,35 ± 0,3
		GlcNAcL	142,1 ± 3,3	0,18 ± 0,04	-1,47 ± 0,3
		PegL	132,9 ± 1,5	0,03 ± 0,02	-1,67 ± 0,2
3	HSPC:EPG:CHOL:Carboidrato (ou DSPE-PEG) (11,20:2,16:7,11:1,137)	GlcL	137,5 ± 5,8	0,04 ± 0,01	-14,2 ± 1,1
		GalL	136,6 ± 5,4	0,04 ± 0,01	-11,6 ± 1,1
		GlcNAcL	134,3 ± 0,3	0,05 ± 0,03	-13,4 ± 1,2
		PegL	129,8 ± 3,3	0,03 ± 0,01	-2,36 ± 0,3

A formulação com a composição **2** foi então avaliada em dias subsequentes para comprovar sua estabilidade. Foi observado o aumento gradual no IP das formulações, conforme mostrado na Tabela 8 (pág. 95), que ilustra os valores obtidos para os GlcL. Com o passar dos dias, observou-se o aparecimento de partículas com tamanho médio de 4000 nm. O mesmo ocorreu para os lipossomas revestidos com galactose. Uma possível explicação para o fenômeno ocorrido é a expulsão dos derivados de carboidratos da bicamada. Isso pode ocorrer devido à alta hidrofília destes compostos associada ao fato de que eles estão intimamente ligados à superfície dos lipossomas, uma vez que o espaçador utilizado entre os triazóis dos carboidratos e o colesterol foi de apenas 2 átomos de carbono.

Tabela 8 – Estabilidade dos lipossomas revestidos por glicose (GlcL).

Formulação / Composição	Dia	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
GlcL HSPC:CHOL:Carboidrato (13,36:7,11:1,137)	0	143,4 ± 3,2	0,10 ± 0,03	-2,68 ± 0,2
	7	151,2 ± 0,8	0,20 ± 0,03	-2,63 ± 0,3
	15	155,6 ± 2,3	0,25 ± 0,01	-2,79 ± 0,4
	30	203,7 ± 9,0	0,57 ± 0,10	-2,36 ± 0,3

Na literatura são descritos diversos sistemas que encapsulam substâncias na bicamada e muitos deles apresentam instabilidade, levando à expulsão da substância e consequente aumento do IP (KAN *et al.*, 2011; KOUDELKA & TURÁNEK, 2012). Para tentar contornar este inconveniente, foi proposta a adição de um lípide com carga (EPG) à formulação de forma a aumentar a hidrofília na superfície lipossomal, levando a maior estabilidade dos derivados de carboidratos.

Diferentemente da formulação composta por HSPC:CHOL:Carboidrato ou DSPE-PEG, a inclusão do EPG (Formulação 3) promoveu um aumento na estabilidade das vesículas, levando a obtenção de lipossomas com tamanho e IP adequados. Além disso, os valores de potencial zeta tornaram-se mais negativos em todas as formulações analisadas para os lipossomas contendo carboidratos. Considerando os dados apresentados na Tabela 7 e 8, a composição 3 foi selecionada para os estudos subsequentes.

O diâmetro médio das vesículas está diretamente relacionado ao sucesso terapêutico dos sistemas nanoestruturados. Lipossomas menores que 150 nm são opsonizados de forma mais lenta e em menor extensão quando comparados a lipossomas grandes (> 150 nm) e, dessa forma, são menos capturados pelas células do sistema retículo endotelial (SHARMA & SHARMA, 1997). Além disso, devido ao efeito EPR, as vesículas devem possuir um tamanho limite de aproximadamente 400 nm. Partículas maiores do que 400 nm são simplesmente incapazes de se difundir através do interstício do tumor em quantidades suficientes para ter qualquer efeito clínico ou terapêutico (STEICHEN *et al.*, 2013). Dessa forma, é importante que estes sistemas apresentem estabilidade quanto ao tamanho para garantir sua eficiência terapêutica.

A Farmacopeia Americana (USP 36, 2013) também preconiza que emulsões lipídicas injetáveis, como os lipossomas, devem possuir diâmetro médio menor que 500 nm e, além disso, a distribuição das partículas maiores que 500 nm, em termos de volume, deve ser

menor que 0,05% da formulação. Isto porque os capilares humanos possuem entre 4 a 9 μm de diâmetro, dessa forma, estas nanoestruturas devem apresentar um diâmetro bem menor, de forma a garantir que não haja oclusão dos vasos sanguíneos (DRISCOLL, 2006). A distribuição, em termos de volume, das formulações obtidas estão descritas na Tabela 9, Em todos os casos não são observadas partículas com tamanho maior que 500 nm, estando de acordo com o preconizado pela USP 36.

Tabela 9 – Distribuição do diâmetro das vesículas em termos de volume dos lotes de GlcL, GalL, GlcNAcL e PegL.

Formulação	Diâmetro Médio (nm)	Distribuição dos diâmetros médios das vesículas em termos de volume				
		$\leq 100 \text{ nm}$	$\leq 200 \text{ nm}$	200 - 300 nm	300 - 500 nm	$\geq 500 \text{ nm}$
GlcL	137,5 \pm 5,8	21,9 \pm 4,4	95,7 \pm 2,1	4,3 \pm 1,9	0	0
GalL	136,6 \pm 5,4	23,7 \pm 1,6	95,6 \pm 2,2	4,4 \pm 1,9	0,03 \pm 0,05	0
GlcNAcL	134,3 \pm 4,3	0	45,9 \pm 3,5	44,4 \pm 2,3	9,7 \pm 1,2	0
PegL	129,8 \pm 3,3	25,8 \pm 3,8	98,2 \pm 0,5	1,8 \pm 0,6	0	0

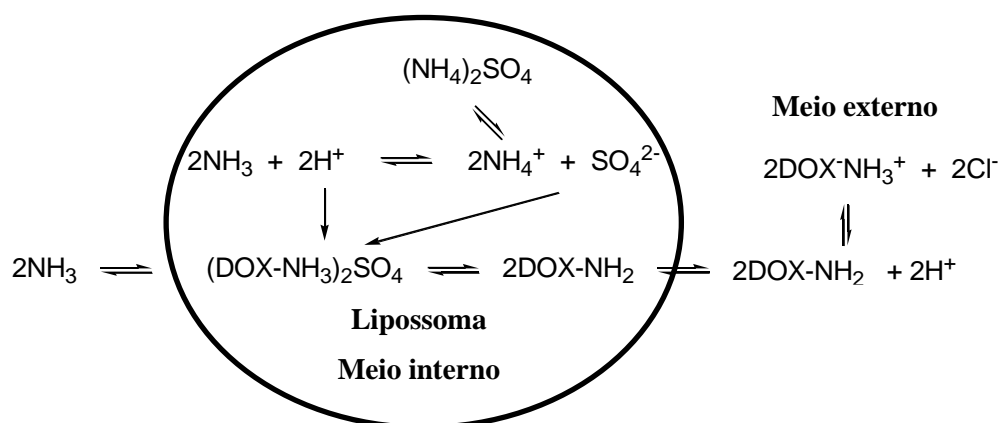
A medida do potencial zeta também é uma ferramenta útil para prever a estabilidade de um sistema coloidal. Em geral, valores de potencial zeta elevados (em módulo) indicam que as forças de repulsão entre as partículas será maior que as forças de atração, reduzindo a tendência do sistema em formar agregados. Valores de potencial zeta em torno de $\pm 30 \text{ mV}$ são geralmente considerados estáveis. Vale ressaltar que outras estratégias também podem ser aplicadas para prevenir a formação de agregados. Uma delas é a adição de substâncias que promovam uma repulsão estérica entre as vesículas, como é o caso do DSPE-PEG.

3.2.1 Determinação do Teor de Encapsulação

Após a seleção da composição lipossomal que promoveu maior estabilidade às vesículas, foi avaliada a eficiência de encapsulação do fármaco (DOX). O método utilizado para encapsular a DOX foi o gradiente de sulfato de amônio. Neste método, conforme ilustrado na Figura 22 (pág. 97), a DOX está em equilíbrio entre a forma protonada (cloridrato) e a forma neutra. A DOX na forma neutra que atravessa a membrana lipossomal é acumulada no meio interno aquoso, sob a forma de sal cristalino (sulfato de DOX) ou como agregados (BARENHOLZ, 2012). A quantidade de fármaco efetivamente encapsulada é governada pelo gradiente de sulfato de amônio presente no meio. Dessa forma, formulações

lipossomais encapsuladas com DOX possuem, em média, teor de encapsulação maiores que 90% (BARENHOLZ, 2012).

Figura 22 – Encapsulação de DOX pelo método de gradiente de sulfato de amônio.



Na Tabela 10 estão descritos os valores de teor de encapsulação para todas as formulações desenvolvidas. Uma diferença significativa foi observada na porcentagem de encapsulação de DOX nas formulações quando foram utilizadas diferentes temperaturas no processo. Como mostrado na Tabela 10, o teor de encapsulação da DOX foi de cerca de 80% quando realizada a 4 °C para todas as formulações. À temperatura de 60 °C, o valor foi próximo de 100%.

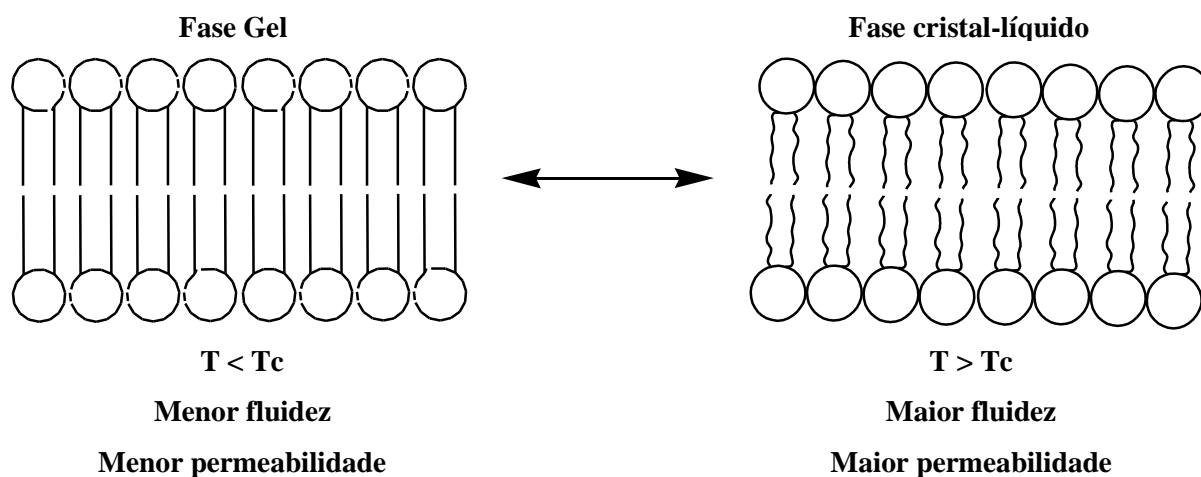
Tabela 10 – Caracterização físico-química dos lipossomas e influência da temperatura na eficiência de encapsulação (n=3).

Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Porcentagem de encapsulação a 4 °C	Porcentagem de encapsulação a 60 °C
GlcL-DOX	137,5 ± 5,8	0,10 ± 0,04	-11,0 ± 0,3	86,8 ± 5,4	100,3 ± 1,7
GalL-DOX	136,6 ± 5,4	0,20 ± 0,04	-12,1 ± 0,4	78,5 ± 7,4	90,7 ± 4,1
GlcNAcL-DOX	134,3 ± 0,3	0,07 ± 0,03	-9,3 ± 0,4	78,2 ± 1,3	96,6 ± 2,0
PegL-DOX	129,8 ± 3,3	0,11 ± 0,01	-2,6 ± 0,4	84,1 ± 1,6	100,3 ± 4,2

O aumento da temperatura durante o processo de encapsulamento é uma estratégia que pode levar a um aumento no conteúdo de encapsulamento e estabilidade do sistema (PATTNI *et al.*, 2015). Isso ocorre porque os fosfolípidos podem existir em dois estados, em função da sua temperatura de transição de fase (T_c): fase gel, quando a cadeia hidrocarbonada do lípido está organizada de forma ordenada; e uma fase cristal-líquido, no

qual as cadeias ficam com movimentos mais livres (Figura 23). Desta forma, a permeabilidade dos lipossomas será sempre maior quando a temperatura ambiente for maior que a T_c do lipossoma. No presente trabalho, os lipossomas desenvolvidos possuem o HSPC como lípide estrutural, este composto, por sua vez, apresenta uma T_c de 52 °C. Assim, temperaturas maiores que esta devem ser empregadas para aumentar a eficiência do processo de encapsulação (PATTNI *et al.*, 2015).

Figura 23 – Efeito da temperatura na permeabilidade dos fosfolipídeos.



3.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

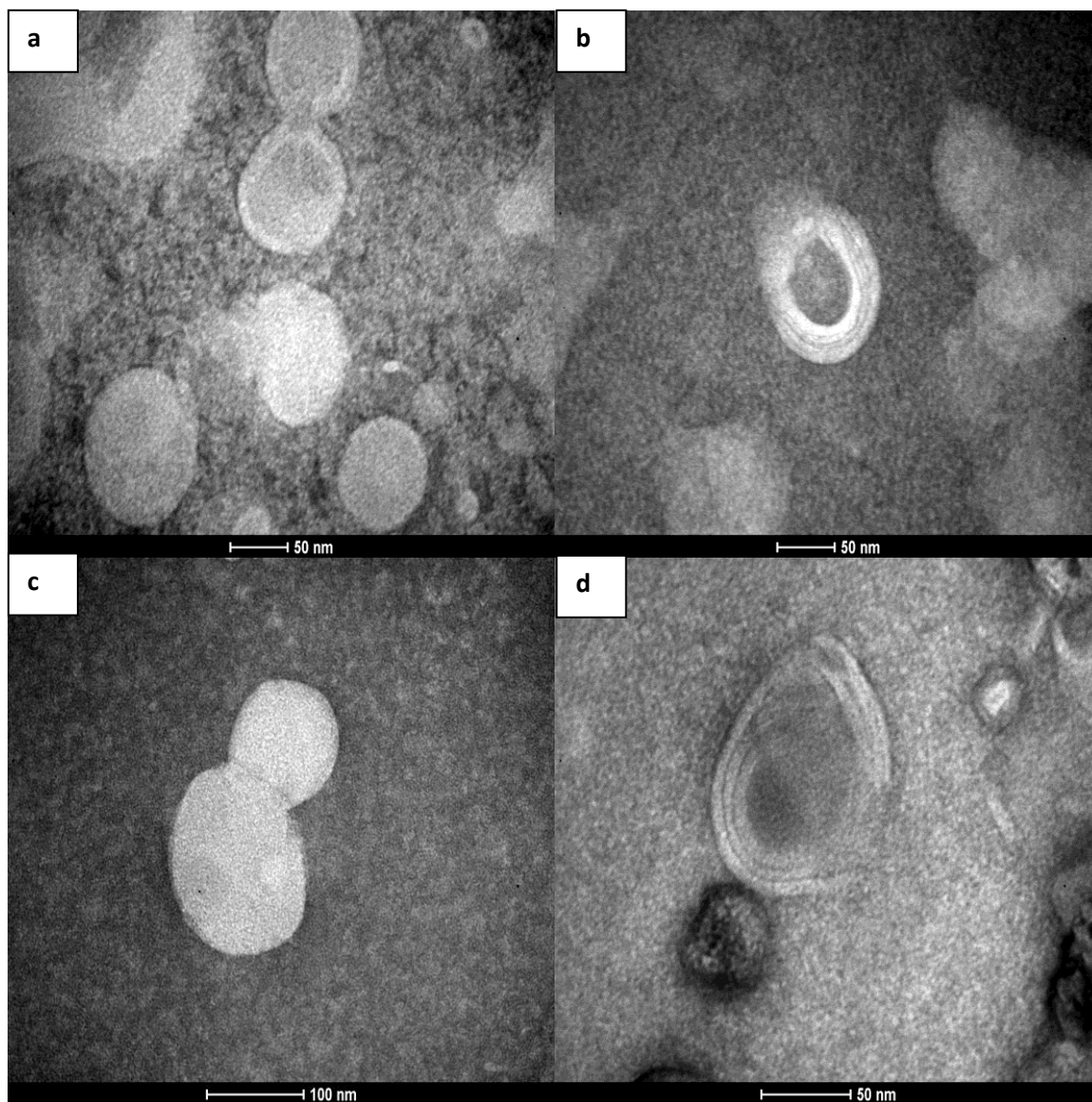
A estrutura e a morfologia dos lipossomas também foram avaliadas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As imagens dos lipossomas obtidas por MET (Figura 24, pág. 99) permitiram a visualização de vesículas unilamelares de diâmetros variados, predominantemente em torno de 100 nm, nas quais todas as nanoestruturas eram esféricas e possuíam uma superfície regular sem indicação de agregação. Os resultados foram consistentes com os diâmetros médios encontrados pela técnica de DLS (Tabela 10, pág. 97).

3.2.3 Estudo de estabilidade das formulações

Para o uso seguro e eficaz dos lipossomas é fundamental demonstrar a sua estabilidade, que depende tanto dos parâmetros da formulação quanto do método de fabricação. A instabilidade física dos lipossomas é resultante do extravasamento do fármaco encapsulado e da agregação e fusão das vesículas. Ambos os processos influenciam no desempenho *in vivo* da formulação e, portanto, podem afetar a efetividade terapêutica do fármaco (SHARMA & SHARMA, 1997). Dessa forma, a estabilidade das formulações foi verificada em termos de

teor de encapsulação, diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta durante 180 dias de armazenamento. Os resultados para as características físico-químicas das formulações são mostrados nas Figuras 25, 26 e 27 (págs. 100 e 101).

Figura 24 – Imagem dos lipossomas brancos [GlcL (a), GalL (b), GlcNAcL (c), PegL (d)] obtidas por MET.



Na figura 25 (pág. 100) são apresentados os resultados de diâmetro médio e índice de polidispersão avaliados ao longo de 180 dias. Em relação ao diâmetro médio das vesículas nenhuma alteração foi observada durante 180 dias de avaliação. O índice de polidispersão também se manteve inalterado para os lipossomas GlcL, PegL e GlcNAcL até o 180º dia. Apenas para os lipossomas GalL foi possível observar um aumento no 180º dia, variando de 0,041 para 0,092.

Na figura 26 (pág. 101) são apresentados os resultados encontrados para o potencial zeta. É possível observar que todas as formulações apresentaram estabilidade, mantendo valores constantes durante todo o período avaliado.

Figura 25 – Variação do diâmetro médio (barra) e índice de polidispersão (ponto) avaliado durante o período de armazenamento de 180 dias dos lotes de GlcL, GalL, GlcNAcL e PegL. Asterisco representa diferença significativa em relação ao dia 0 (n = 3).

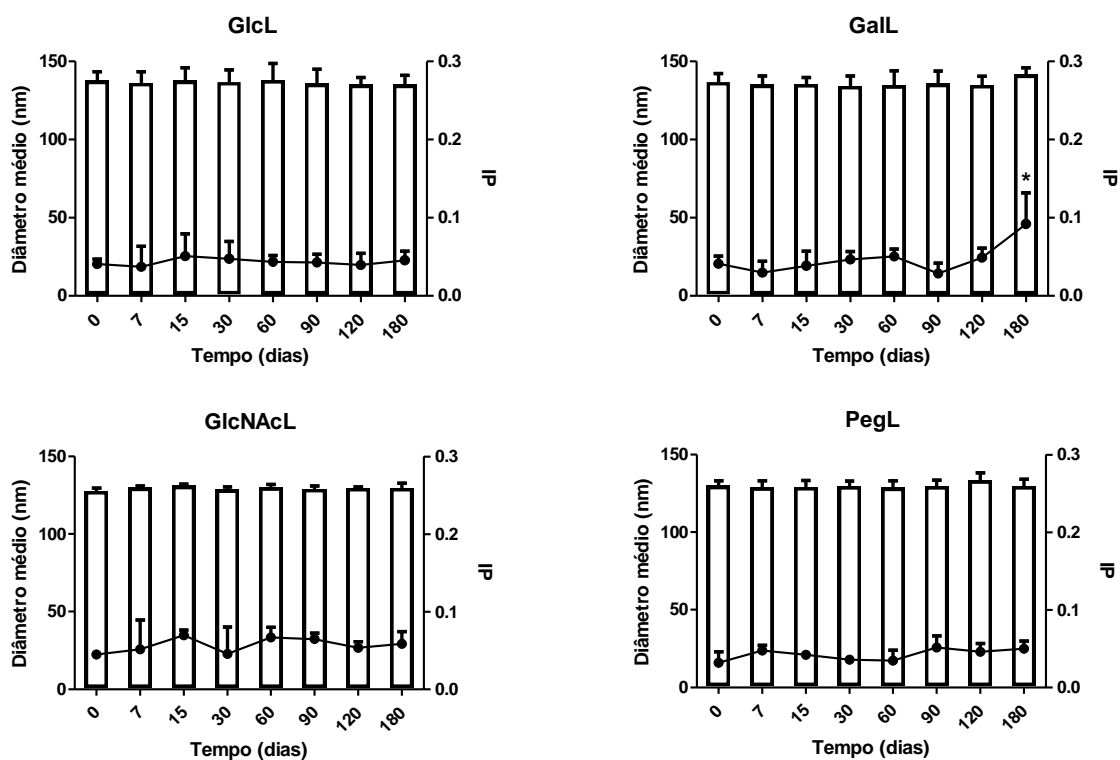


Figura 26 – Variação do potencial zeta durante o armazenamento por 180 dias dos lotes de GlcL, GalL, GlcNaCL e PegL (n=3).

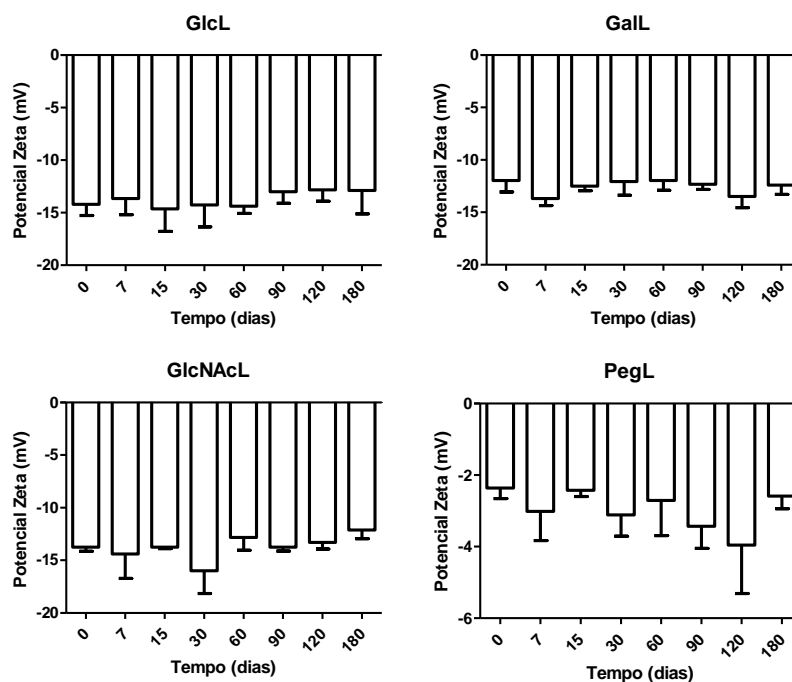
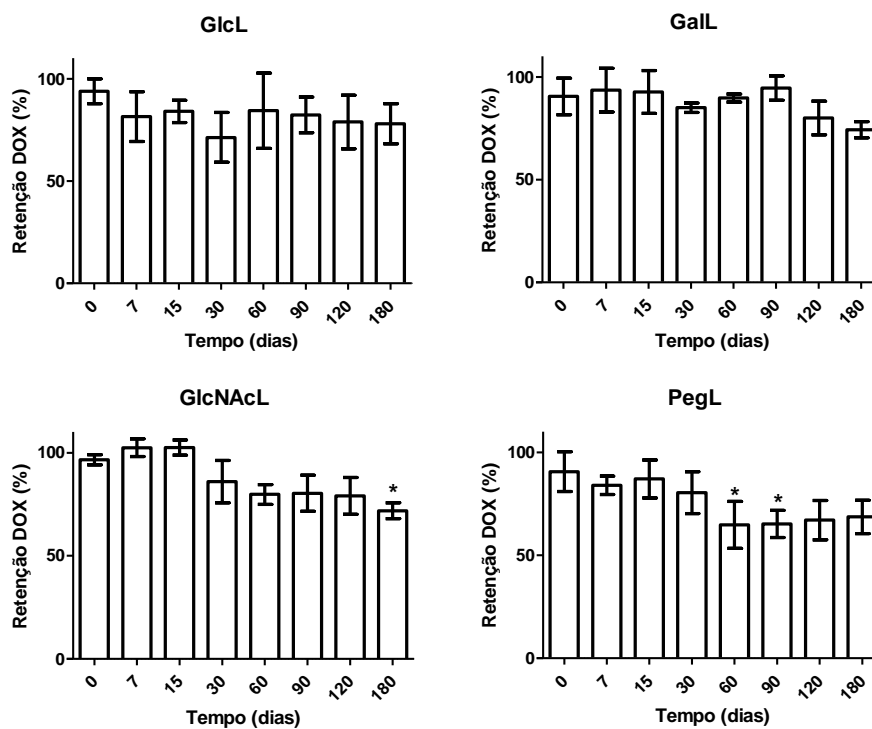


Figura 27 – Perfil de retenção de DOX durante o período de armazenamento de 180 dias. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao dia 0 (n = 3).



Os lipossomas revestidos com carboidratos apresentaram boa estabilidade em termos de retenção de DOX após armazenamento por 180 dias a 4 °C (Figura 27, pág. 101). Foi encontrada variação significativa apenas para os lipossomas GlcNaCL, aos 180 dias, e PegL aos 60 e 90° dias, que apresentaram perda de $25 \pm 4\%$ e $23 \pm 11\%$, respectivamente, quando comparados à formulação obtida no tempo zero. O lipossomas GlcL apresentaram perda de $16 \pm 9\%$ de DOX e os lipossomas GalL perda de $17\% \pm 9\%$ ao final de 180 dias. Estes resultados mostram uma maior estabilidade dos lipossomas glicosilados e galactosilados em reter o fármaco quando comparados aos lipossomas peguilados e as demais formulações contendo carboidratos na superfície.

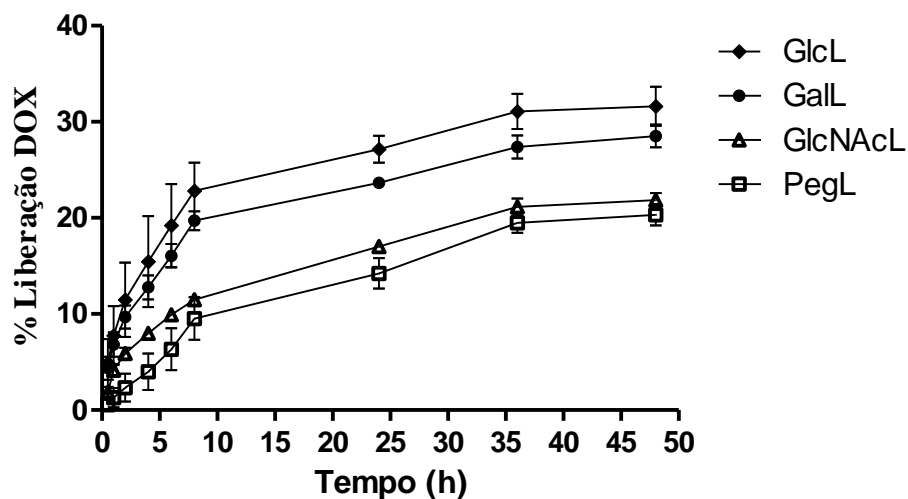
3.2.4 Estudo de liberação das formulações

A liberação *in vitro* da DOX encapsulada dos lipossomas GlcL, GalL, GlcNaCL e PegL foi realizada em PBS, pH 7,4, a 37 °C e os perfis de liberação são mostrados na Figura 28 (pág. 103). Observa-se que a porcentagem de liberação de DOX acumulada para GlcL-DOX e GalL-DOX foi maior que o apresentado para GlcNaCL-DOX e PegL-DOX. A porcentagem de doxorubicina liberada de GlcL foi de $11,2 \pm 3,1\%$ após 2 h e aumentou gradualmente para $27,1 \pm 1,1\%$ após 24 h. Um platô foi observado após 32 horas de liberação. O mesmo perfil foi obtido para lipossomas GalL. Em comparação com GlcL e GalL, PegL exibiu uma liberação mais lenta nas 2 h iniciais e teve uma liberação aumentada a partir da sexta hora. A liberação atingiu seu platô em $18,4 \pm 1,1\%$ após 32 horas de teste. Este resultado foi semelhante ao lipossoma GlcNaCL. As formulações revestidas com carboidratos mostraram maior liberação de DOX em comparação com a formulação peguilada. Acreditamos que isso se deva à presença de uma quantidade maior de fragmentos modificados com colesterol ancorados na bicamada dos lipossomas, o que resultou em uma maior permeabilidade lipossomal.

A liberação do fármaco é um passo crítico no desenho racional dos sistemas de liberação, pois determina a eficácia da administração do veículo *in vivo* e a liberação subsequente do ativo. Um perfil de liberação *in vitro* revela informações importantes acerca da estrutura e do comportamento da formulação, possíveis interações entre o fármaco e a composição transportadora e a sua influência na taxa e mecanismo de liberação do fármaco. Todas as formulações avaliadas mostraram uma taxa de liberação lenta e constante do fármaco durante as primeiras 32 horas do experimento, sem liberação de DOX observada após esse tempo. Os resultados obtidos mostraram claramente que a ancoragem de

carboidratos na superfície dos lipossomas pode melhorar significativamente sua estabilidade de armazenamento e sustentar a liberação de DOX *in vitro*.

Figura 28 – Liberação *in vitro* de doxorubicina dos lipossomas GlcL, GalL, GlcNAcL e PegL em PBS (pH 7,4).



4 Conclusão

Lipossomas revestidos por carboidratos ou polietilenoglicol foram obtidos com elevado teor de encapsulação de DOX e estabilidade físico-química. As formulações apresentaram características adequadas com relação ao tamanho e morfologia. Também foi observada liberação controlada de doxorubicina em pH fisiológico para ambos lipossomas, glicosilados e peguilados. Os resultados encontrados mostram que as formulações apresentam características ideais para serem utilizadas como sistema transportador de fármacos.

CAPÍTULO III

**Síntese do derivado colesterol-DTPA,
radiomarcção de lipossomas com ^{99m}Tc ,
estudos de depuração sanguínea,
biodistribuição e imagens cintilográficas**

1 Introdução

A capacidade de projetar lipossomas para aplicações terapêuticas e de imagem tem atraído atenção considerável nos últimos anos. Lipossomas radiomarcados podem ser utilizados para determinar a biodistribuição de um fármaco após sua administração, o que contribui de forma substancial para avaliar a eficácia do tratamento e fornece recursos para uma tomada de decisão durante a terapia (PETERSEN *et al.*, 2012).

Para a obtenção de imagens diferentes técnicas não invasivas podem ser utilizadas, dentre as quais se destacam a tomografia computadorizada por emissão de fóton único, tomografia por emissão de pósitrons, ultrassonografia, ressonância magnética e técnicas cintilográficas (SILINDIR-GUNAY & OZER, 2018).

Nas técnicas cintilográficas diversos radionuclídeos podem ser empregados, como o ^{99m}Tc ($t_{1/2}$ 6,01 h), ^{67}Ga ($t_{1/2}$ 3,26 d) e ^{123}I ($t_{1/2}$ 13,22 h). Em função das suas propriedades físicas e químicas, como tempo de meia-vida favorável e emissão gama de baixa energia (140 keV), o ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais utilizado em medicina nuclear. Além disso, o radioisótopo apresenta baixo custo e é facilmente obtido a partir de um sistema gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (PETERSEN *et al.*, 2012).

Para possibilitar a radiomarcagem dos sistemas nanoestruturados, o tecnécio pode ser complexado a agentes quelantes do tipo poliaminocarboxilatos multidentados, como o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). Diversos estudos contendo DTPA ancorado à superfície de nanoestruturas, como micelas e nanopartículas de sílica, já demonstraram que esta abordagem apresenta alta estabilidade e eficiência de marcação, permitindo, assim, o rastreamento *in vivo* das estruturas durante a realização de estudos *in vivo* (ODA *et al.*, 2017; DE BARROS *et al.*, 2015)

Desta forma, no presente capítulo foi proposta a síntese do derivado CHOL-DTPA para possibilitar a radiomarcagem dos lipossomas com ^{99m}Tc . Também foram apresentados os estudos de depuração sanguínea, biodistribuição e imagens cintilográficas conduzidos em animais saudáveis, de forma a obter informações sobre a furtividade dos lipossomas.

2 Parte experimental

2.1 Materiais

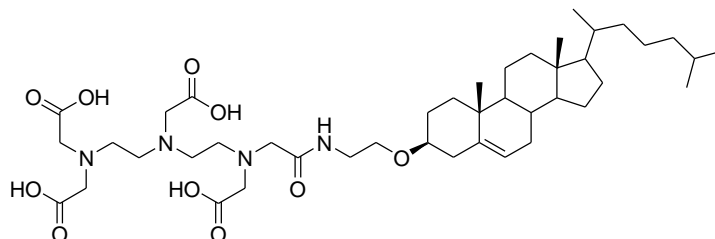
O dianidrido do ácido dietileno-triaminopentacético (DTPA dianidrido) e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (Missouri, EUA). O tecnécio-99m (^{99m}Tc) foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN – Brasil).

2.1.1 Animais

Os camundongos BALB/c (fêmeas) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram mantidos na sala de Experimentação Animal do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG sem restrição de água e ração. Todos os experimentos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob protocolo número 158/2014.

2.2 Métodos

2.2.1 Síntese do derivado CHOL-DTPA



A um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 72 mg (0,20 mmol) de aminocolesterol **10** em 5 mL de DMF. A esta mistura adicionaram-se gotas de THF até que todo o composto **10** estivesse completamente solubilizado. Em seguida, foram adicionados 87 mg (0,20 mmol) de DTPA dianidrido e a solução foi mantida sob agitação a 60 °C durante 5h. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (MeOH: EtOAc = 1:1). Após confirmação da conclusão da reação, adicionaram-se 5 mL de H₂O e a mistura reagente foi mantida sob agitação a 60 °C por 1h. Elaboração: foram adicionados 10 mL de água ao balão e a mistura foi vertida em um funil de separação. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas com Na₂SO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotatório e o produto foi purificado em coluna. Isto resultou em 122 mg do composto CHOL-DTPA.

Rendimento: 76%

Aspecto físico: sólido branco

FM: C₄₃H₇₂N₄O₁₀ **MM:** 804,5 g mol⁻¹

FF: 114,5-115,7 °C

IV (ν , cm⁻¹) (Anexo A, Figura A.82, pág. 235): 2929, 2866 (ν C-H alifático), 1720 (ν C=O ácido), 1690 (ν C=O amida), 1098 (ν C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, piridina- d_5), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.83, pág. 236): Anexo B, Tabela B.37, pág. 267.

RMN de ^{13}C (50 MHz, piridina- d_5), δ (ppm) (Anexo A, Figura A.84, pág. 237): Anexo B, Tabela B.38, pág. 267.

HRMS (ESI) m/z : (Anexo A, Figura A.86, pág. 239): $[\text{M-H}]^-$ calculado: 803,5170; encontrado: 803,5178.

2.2.2 Caracterização química do derivado CHOL-DTPA

O produto obtido foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas. As descrições das técnicas e aparelhos utilizados encontram-se no Capítulo I, item 3.1 (pág. 41).

2.2.3 Radiomarcção de lipossomas com tecnécio- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e estudos de estabilidade

Para determinar a eficiência e estabilidade de marcação do derivado CHOL-DTPA, foram preparados lipossomas constituídos por HSPC:EPG:CHOL:CHOL-DTPA:Carboidrato ou DSPE-PEG (razão molar: 11,20:2,16:6,89:1,137). Os lipossomas foram produzidos conforme a procedimento descrito no Capítulo 2, item 2.2.2, pág. 86.

Os lipossomas foram marcados com o isótopo radioativo tecnécio- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Para isso, a 100 μL de uma solução de cloreto estanoso (2,0 mg/mL), em ácido clorídrico 0,25 mol/L, com pH ajustado para 7,0-8,0 com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, foram adicionados 250 μL de lipossomas (GlcL, GalL, GlcNL, PegL). O frasco contendo o material foi lacrado e fez-se vácuo. Em seguida, foram adicionados, aproximadamente, 35 MBq de pertecnetato de sódio em solução salina 0,9% (p/v). A mistura foi agitada e mantida sob vácuo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Para avaliar a eficiência de marcação, foi realizada a quantificação das impurezas radioquímicas pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) e tecnécio coloidal ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$). O percentual de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ foi determinado por cromatografia em camada delgada, utilizando acetona como fase móvel. A porcentagem de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ foi determinada realizando a filtração do material em filtro de 0,22 μm e quantificando a radioatividade contida no filtrado e no filtro. O rendimento de marcação foi obtido segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\% \text{ } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99\text{m}}\text{TcO}_2)$$

A estabilidade de marcação dos lipossomas foi avaliada em dois meios distintos: solução salina 0,9% (p/v) e plasma de camundongo. Os lipossomas diluídos em salina foram mantidos temperatura ambiente e, nos tempos de 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h,

alíquotas foram retiradas para a quantificação da impureza ^{99m}Tc livre por CCD. Para mimetizar a estabilidade da marcação das nanoestruturas na corrente sanguínea, foi utilizada uma diluição de 100 μL de lipossomas radiomarcados para cada 1,1 mL de plasma de camundongo. A mistura obtida foi incubada, sob agitação, a temperatura de 37 °C. Nos tempos de 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h, alíquotas foram retiradas e o teor de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi quantificado por CCD.

Após o processo de marcação os lipossomas também foram avaliados em relação ao seu diâmetro médio e potencial zeta, a fim de investigar possíveis alterações das características físico-químicas das nanoestruturas.

2.2.4 Depuração sanguínea em animais BALB/c sadios

Foram utilizados vinte camundongos Balb/c fêmeas (cinco animais por grupo), pesando 20-25 g. Os animais receberam por via endovenosa, 0,1 mL de solução de lipossomas radiomarcados (^{99m}Tc -GlcL, ^{99m}Tc -GalL, ^{99m}Tc -GlcNAcL ou ^{99m}Tc -PegL). Amostras de sangue foram coletadas dos animais, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 5, 15, 30, 45, 30, 60, 120, 240, 360 e 1440 minutos após a injeção da formulação. Ao final, os tubos contendo sangue foram pesados e tiveram a radiação determinada em contador gama. Uma dose padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir o decaimento físico do ^{99m}Tc . Os resultados foram expressos em percentual da dose residual no sangue.

Para avaliar a ocorrência do efeito ABC nos animais estudados, outro grupo contendo vinte animais recebeu, por via endovenosa, 0,1 mL de solução de lipossomas (^{99m}Tc -GlcL, ^{99m}Tc -GalL, ^{99m}Tc -GlcNAcL ou ^{99m}Tc -PegL) para prévia sensibilização. Após sete dias, os animais receberam uma segunda dose de 0,1 mL de solução de lipossomas radiomarcados. Amostras de sangue foram coletadas dos animais, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 5, 15, 30, 45, 30, 60, 120, 240, 360 e 1440 minutos após a injeção da formulação radiomarcada. Ao final, os tubos contendo sangue foram pesados e tiveram a radiação determinada em contador gama. Os resultados foram expressos em percentual da dose residual no sangue.

2.2.5 Estudos de biodistribuição em animais BALB/c sadios

Foram utilizados 64 camundongos BALB/c fêmeas, pesando 20-25 g. Esses animais foram divididos em quatro grupos. Cada animal recebeu aproximadamente 3,7 MBq de solução contendo lipossomas (^{99m}Tc -GlcL, ^{99m}Tc -GalL, ^{99m}Tc -GlcNAcL ou ^{99m}Tc -PegL).

Após 1 e 4 horas, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (80 mg/Kg) e xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos a eutanásia por deslocamento cervical. Os seguintes órgãos e tecidos foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade: intestino grosso, intestino delgado, estômago, tireoide, pulmão, coração, rins, baço, fígado e sangue. Uma dose padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir o decaimento físico do ^{99m}Tc . A radioatividade medida em cada órgão foi expressa como porcentagem da dose injetada por grama de tecido %ID/g.

2.2.6 Imagens cintilográficas em animais BALB/c sadios

Para obtenção das imagens cintilográficas foram utilizados os animais do estudo de biodistribuição. Após 1 e 4 horas da administração das nanopartículas radiomarcadas, os animais foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob uma gama câmara NuclideTM TH 22 (Mediso, Budapeste, Hungria) para aquisição das imagens. Foi utilizada uma janela de 20% simétrica, para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

2.2.7 Análise estatística

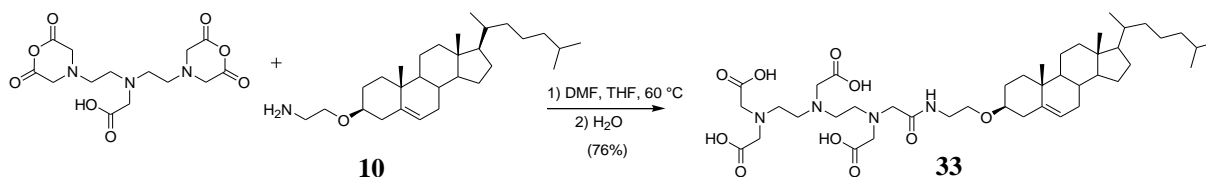
Os resultados estão representados por média \pm desvio padrão. Os dados dos estudos de estabilidade de marcação foram testados por ANOVA. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$)

3 Resultados e discussão

3.1 Síntese e caracterização química do derivado CHOL-DTPA

A obtenção do derivado CHOL-DTPA (**33**) foi realizada em apenas uma etapa de síntese (Figura 29), tendo como material de partida o derivado 2-aminoetila colesterol (**10**) previamente sintetizado, e o reagente comercial DTPA dianidrido.

Figura 29 – Síntese do derivado CHOL-DTPA (**33**).



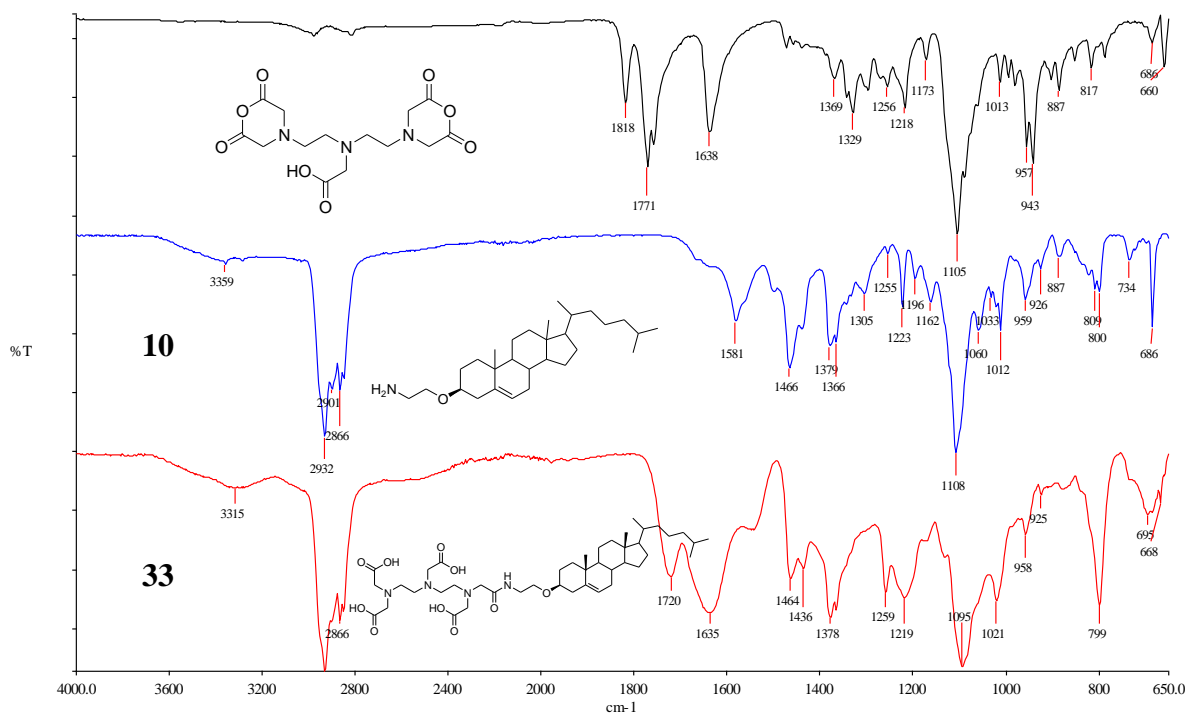
A formação do composto **33** pode ser inicialmente confirmada pela comparação dos espectros no infravermelho, conforme Figura 30 (pág. 111). Observa-se no espectro no infravermelho do composto **33** bandas em 2866 e 2929 cm⁻¹, correspondente ao estiramento C-H alifático, característico da porção esteroide presente no composto obtido. A principal evidência que comprova a formação do composto **33** é a mudança na frequência de absorção de carbonila, que para composto DTPA dianidrido encontra-se em 1818 e 1771 cm⁻¹ (ν C=O anidrido) e para o composto **33** encontra-se em 1719 e 1635 cm⁻¹ (ν C=O amida).

No espectro de RMN de ¹H de **33** (Figura A.83, pág. 236) observam-se os sinais referentes aos hidrogênios esteroidais entre δ 0,71 e 2,50. Os hidrogênios metilênicos apresentaram-se na forma de multipletos entre δ 3,23 e 4,11. Além disso, foi observado sinal largo em δ 7,85 relativo aos hidrogênios dos ácidos carboxílicos (COOH).

No espectro de RMN de ¹³C de **33** (Figura A.84, pág. 237) observa-se o sinal referente ao carbono carbonílico da amida em δ 172,0. Além disso, sinais entre δ 174,1 e 174,5 correspondentes às carbonilas dos ácidos carboxílicos também foram detectadas.

A análise do massas de alta resolução também comprova obtenção do composto pela presença do íon *quasi* molecular referente à perda de um hidrogênio em 803,5178, sendo o valor calculado 803,5170 (pág. 239).

Figura 30 – Espectros no infravermelho dos compostos DTPA dianidrido, **10** e **33**.



3.2 Radiomarcção de lipossomas com tecnécio-99m

Após confirmar a obtenção do composto CHOL-DTPA, o mesmo foi utilizado na preparação dos lipossomas para possibilitar a radiomarcção destas vesículas. Um dos parâmetros avaliados durante a radiomarcção é a eficiência e estabilidade deste processo.

As impurezas radioquímicas mais comuns para os compostos radiomarcados com ^{99m}Tc são o pertechnetato livre (^{99m}TcO₄⁻) e o tecnécio coloidal (^{99m}TcO₂). A primeira impureza é produzida quando o pertechnetato de sódio não é reduzido pelo agente redutor presente na reação (SnCl₂). Já a segunda impureza é decorrente da não-complexação do metal, que se estabiliza em um estado de oxidação menor, formando um coloide (SRIVASTAVA *et al.*, 1977).

Os resultados do estudo mostraram um alto rendimento de marcação em todos os lipossomas preparados (^{99m}Tc-GlcL, ^{99m}Tc-GalL, ^{99m}Tc-GlcNAcL ou ^{99m}Tc-PegL), conforme apresentado na Tabela 11 (pág. 112). Todas as vesículas apresentaram rendimento de marcação superior a 94%, que é essencial para obter imagens de alta qualidade. A presença de impurezas radioquímicas aumenta a captação de radioatividade por órgãos não alvo, comprometendo a qualidade das imagens e, conseqüentemente, a interpretação dos resultados obtidos nos estudos de biodistribuição (LIU, 2008).

Tabela 11 – Rendimentos de marcação obtidos para os diferentes lipossomas testados. Valores expressos como média \pm DP, n=4.

Formulação	Rendimento de marcação (%)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)
$^{99m}\text{Tc-GlcL}$	96,4 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	2,3 \pm 3,2
$^{99m}\text{Tc-GalL}$	96,4 \pm 1,1	2,4 \pm 1,1	1,2 \pm 0,6
$^{99m}\text{Tc-GlcNaCl}$	96,9 \pm 0,3	0,4 \pm 0,3	2,7 \pm 1,3
$^{99m}\text{Tc-PegL}$	93,9 \pm 1,6	4,3 \pm 1,6	1,8 \pm 1,3

Os lipossomas contendo o derivado DTPA-CHOL também foram avaliados em relação ao diâmetro médio e potencial zeta. Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que adição do derivado DTPA-CHOL na bicamada não alterou as propriedades físico-químicas das vesículas. Além disso, a radiomarcação com ^{99m}Tc também não promoveu alterações nos parâmetros avaliados, mostrando que o processo mantém o sistema estável e com características adequadas para estudos em animais.

Dessa forma, o composto CHOL-DTPA apresentou bons resultados em termos de marcação, mostrando que pode ser utilizado nas formulações lipossomais para permitir o rastreamento, em tempo real, dos lipossomas.

Tabela 12 – Parâmetros físico-químicos obtidos para as formulações de lipossomas radiomarcados. Valores expressos em média \pm DP, n=3.

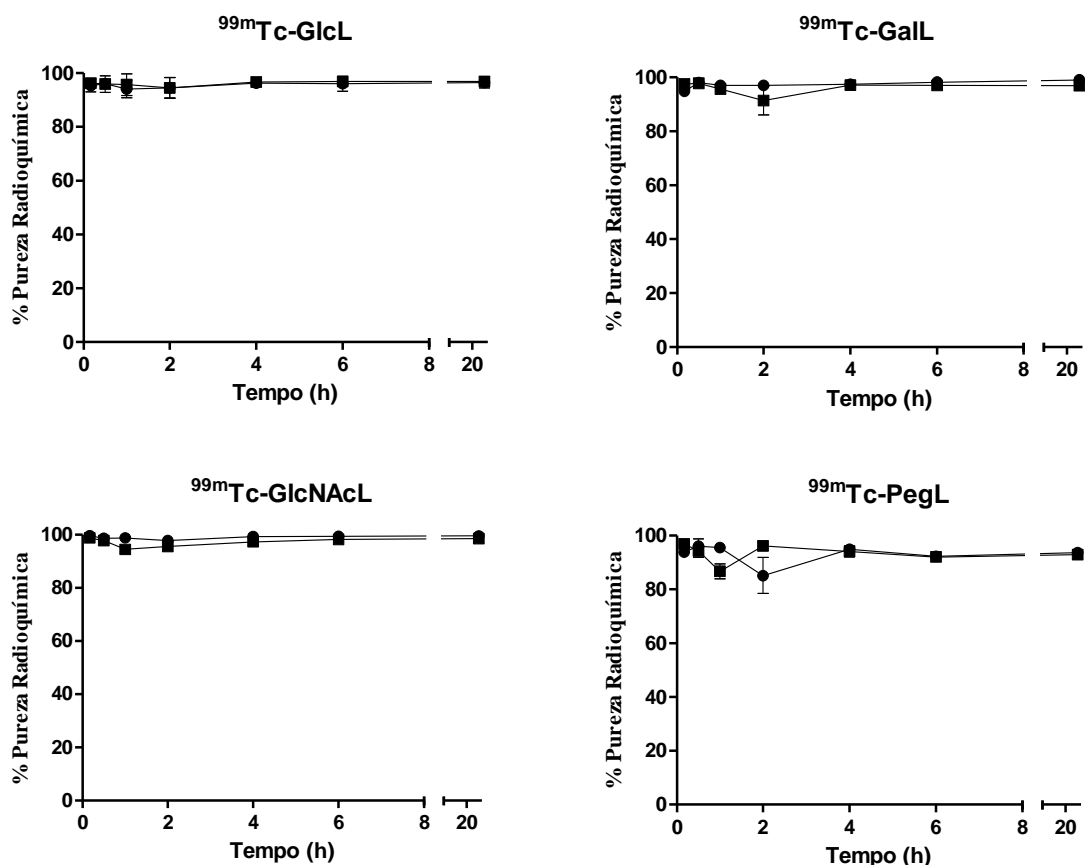
Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
$^{99m}\text{TcGlcL}$	141,1 \pm 2,8	0,048 \pm 0,02	-12,0 \pm 1,2
$^{99m}\text{TcGalL}$	137,3 \pm 2,7	0,032 \pm 0,03	-11,9 \pm 0,3
$^{99m}\text{TcGlcNaCl}$	136,9 \pm 2,0	0,07 \pm 0,01	-12,9 \pm 0,2
$^{99m}\text{TcPegL}$	148,3 \pm 2,3	0,042 \pm 0,01	-1,82 \pm 0,1

3.3 Estudo *in vitro* da estabilidade de radiomarcação

Após administração na corrente sanguínea, os lipossomas radiomarcados são expostos a diferentes moléculas e potenciais agentes quelantes, que podem desestabilizar a ligação $^{99m}\text{Tc-CHOL-DTPA}$. Dessa forma, é extremamente importante para aplicações em estudos *in vivo* que a marcação do isótopo permaneça estável durante um longo período de tempo, a fim de produzir imagens de alta qualidade (CORREA, *et al.*, 2014). Em geral, valores de impurezas maiores que 10% prejudicam a obtenção de imagens cintilográficas de qualidade

(SAHA, 2010) e comprometem os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição, uma vez que a quebra da ligação do complexo não permitiria associar a distribuição das nanopartículas com a radiação detectada.

Figura 31 – Estabilidade *in vitro* dos lipossomas radiomarcados em solução salina 0,9% (p/v) (quadrado) e em plasma de camundongo (círculo).



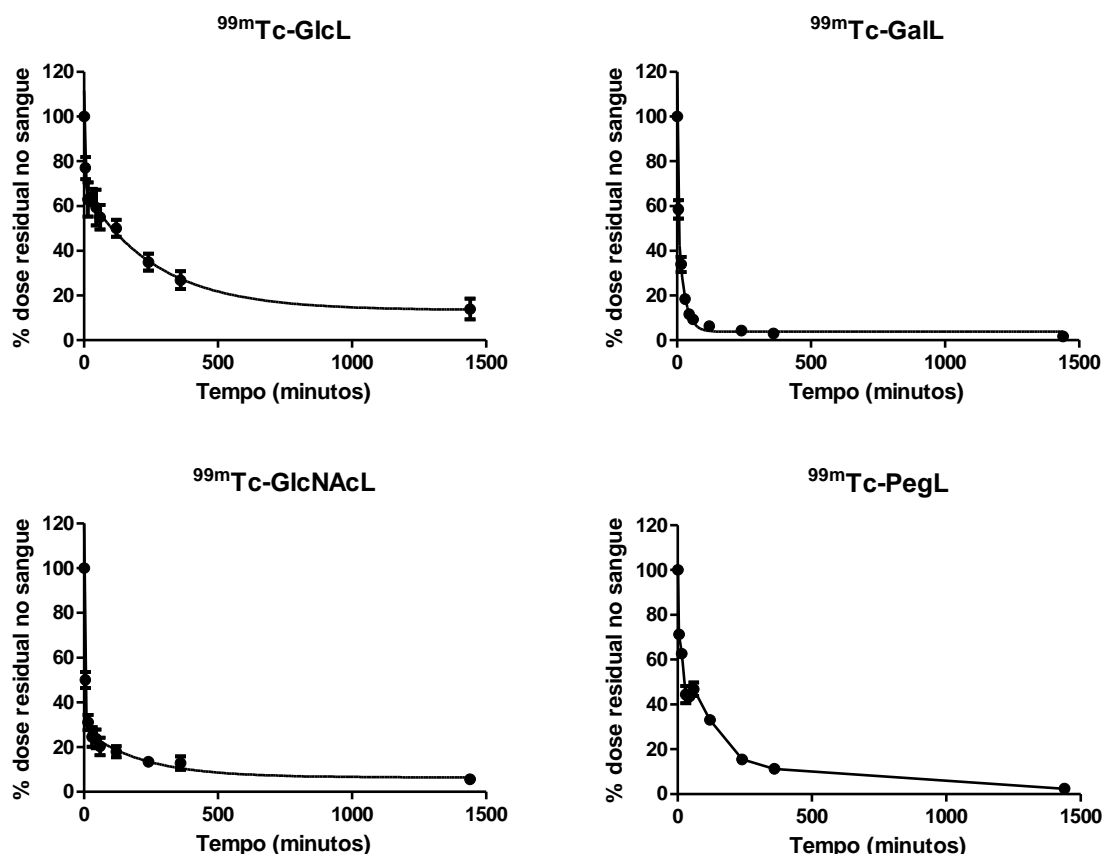
Nos estudos de estabilidade em solução de NaCl 0,9% (p/v) e em plasma a 37 °C todos os lipossomas radiomarcados apresentaram acentuada estabilidade nas 24 horas avaliadas, conforme observado na Figura 31. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas porcentagens de marcação avaliadas ($p > 0,05$), confirmando que o complexo obtido é estável e pode ser utilizado em estudos biológicos.

3.4 Depuração sanguínea em animais BALB/c sadios

Na Figura 32 (pág. 114) é mostrado o perfil de depuração sanguínea após a administração das diferentes formulações lipossomais ($^{99m}\text{Tc-GlcL}$, $^{99m}\text{Tc-GalL}$, $^{99m}\text{Tc-GlcNAcL}$ ou $^{99m}\text{Tc-PegL}$). No estudo farmacocinético, os camundongos BALB/c receberam

por via endovenosa uma das quatro formulações e o sangue foi coletado em tempos determinados para a dosagem da radiação.

Figura 32 – Curva de depuração sanguínea dos lipossomas radiomarcados avaliado em camundongos BALB/c sadios (n = 5).



Nos primeiros 30 minutos observa-se que a maior parte das vesículas é removida da circulação, possivelmente pelas células do sistema mononuclear fagocitário. Em seguida, os lipossomas que permanecem na corrente sanguínea são eliminados mais lentamente.

A partir do tempo de 120 minutos foi observada diferença estatisticamente significativa entre os perfis farmacocinéticos das formulações $^{99m}\text{Tc-GalL}$, $^{99m}\text{Tc-GlcNAcL}$ e $^{99m}\text{Tc-PegL}$ quando comparadas aos lipossomas de $^{99m}\text{Tc-GlcL}$. No tempo de 1440 minutos, a concentração residual sanguínea encontrada para $^{99m}\text{Tc-GlcL}$ foi igual a $13,97 \pm 6,6\%$, valor significativamente mais elevado que as demais formulações, que apresentaram concentração igual a $1,71 \pm 0,24$ ($^{99m}\text{Tc-GalL}$), $2,38 \pm 0,07$ ($^{99m}\text{Tc-PegL}$) e $5,61 \pm 1,35$ ($^{99m}\text{Tc-GlcNAcL}$).

A Tabela 13 (pág. 115) apresenta os valores de área sob a curva (ASC) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) obtidos no programa GraphPad Prism a partir de um modelo de decaimento

bifásico. De acordo com os resultados, a formulação $^{99m}\text{Tc-GlcL}$ apresentou $t_{1/2\beta}$ 2,4 vezes maior que aquele observado para a formulação $^{99m}\text{Tc-PegL}$, 18,5 vezes maior que $^{99m}\text{Tc-GalL}$ e 1,3 vezes maior que o observado para a formulação $^{99m}\text{Tc-GlcNaCL}$. O $t_{1/2\alpha}$ para a formulação $^{99m}\text{Tc-PegL}$ foi o mais elevado, sendo 1,2 vezes maior que a formulação $^{99m}\text{Tc-GlcL}$ e $^{99m}\text{Tc-GlcNaCL}$ e 1,6 vezes maior que $^{99m}\text{Tc-GalL}$. A área sob a curva da formulação $^{99m}\text{Tc-GlcL}$ foi 6,6 vezes maior que a da formulação $^{99m}\text{Tc-GalL}$, 2,3 vezes maior que a da formulação $^{99m}\text{Tc-PegL}$ e 2,2 vezes maior que a da formulação $^{99m}\text{Tc-GlcNaCL}$.

A análise dos resultados indica que a formulação com o ligante derivado da glicose foi capaz de aumentar o tempo de circulação dos lipossomas e desta forma, poderá contribuir para o tratamento de tumores, através do direcionamento passivo. Já o $t_{1/2}$ expressivamente menor encontrado para os lipossomas galactosilados sugere um possível direcionamento destas nanopartículas para alvos específicos, como o fígado.

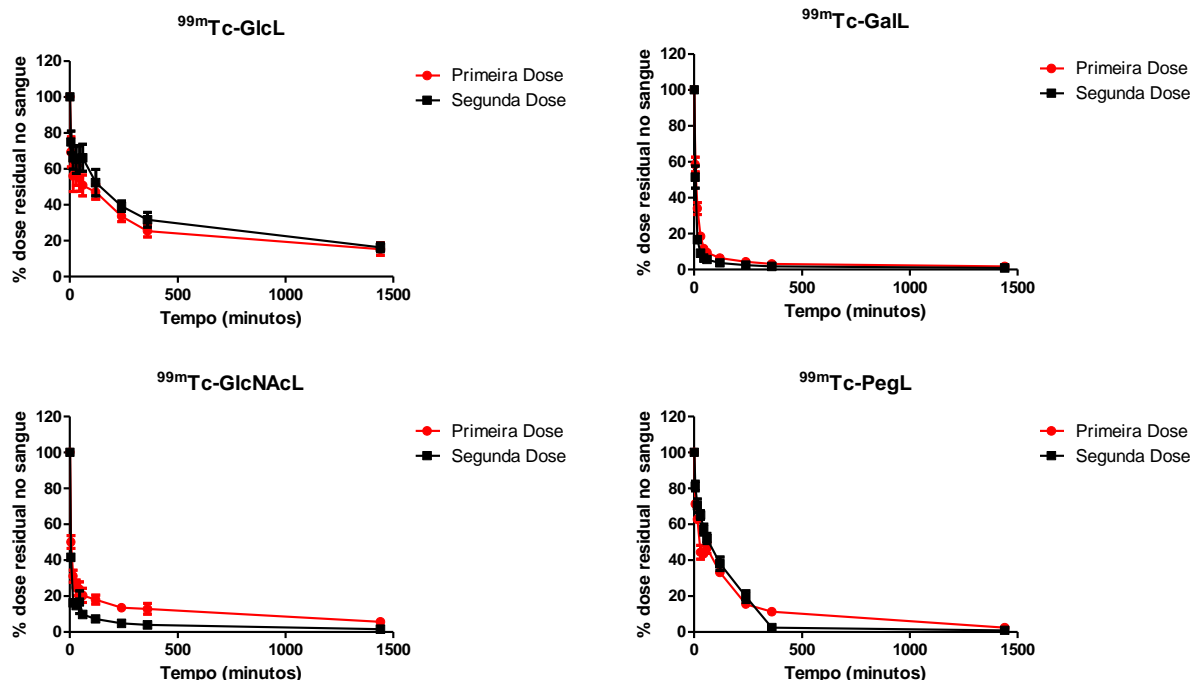
Tabela 13 – Parâmetros farmacocinéticos após injeção intravenosa de diferentes formulações lipossomais.

Formulação	ASC (% DI·min ⁻¹)	α T _{1/2} (min)	β T _{1/2} (min)
$^{99m}\text{Tc-GlcL}$	37810	2,35	303,3
$^{99m}\text{Tc-GalL}$	5686	1,84	16,4
$^{99m}\text{Tc-PegL}$	17423	2,89	123,6
$^{99m}\text{Tc-GlcNaCL}$	16421	2,45	239,2

Para avaliar a imunogenicidade dos lipossomas, o estudo de depuração sanguínea também foi realizado em animais previamente sensibilizados com as formulações. Sete dias após esta sensibilização, os animais receberam novamente 100 μL de formulação e a concentração dos lipossomas foi avaliada durante um período de 24 horas.

A comparação dos perfis farmacocinéticos dos lipossomas está representada na Figura 33 (pág. 116). A segunda dose administrada não mostrou diferença significativa quando comparada aos animais que receberam uma única dose, nem mesmo para os lipossomas peguilados, onde seria esperado encontrar um menor tempo de meia vida, conforme descrito em diversos estudos (KIERSTEAD *et al.*, 2015; LILA *et al.*, 2013; ISHIDA *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2014).

Figura 33 – Comparação entre as curvas de depuração sanguínea obtidas para a primeira e segunda dose de lipossomas radiomarcados avaliado em camundongos BALB/c sadios (n = 5).



Alguns estudos mostram que a resposta imune desencadeada após a primeira injeção de lipossomas revestidos com PEG se deve à ligação de imunoglobulinas específicas à subunidade $(OCH_2CH_2)_n$ do PEG presentes no baço, o que desencadeia a produção de IgM anti-PEG (ISHIDA *et al.*, 2006b; WANG *et al.*, 2007). Tanto a ocorrência quanto a intensidade do efeito ABC são influenciados por diversos fatores, como: intervalo de tempo entre as administrações, propriedades físico-químicas dos lipossomas, tipo de fármaco encapsulado e espécie animal utilizada.

Ishihara e colaboradores (2009) investigaram o comportamento farmacocinético de nanopartículas de ácido polilático (PLA) peguiladas administradas em ratos em intervalos de tempo de 3, 5, 7, 14 ou 28 dias. Os estudos mostraram que a segunda dose administrada com intervalo de 7 dias foi eliminada mais rapidamente da circulação quando comparada às doses administradas em intervalos de tempo de 3, 14 ou 28 dias. Alguns estudos também mostram que a concentração de PEG utilizada nas formulações é capaz modular o efeito, sendo descrito que lipossomas contendo 5 mol % de DSPE-PEG provocam uma resposta mais efetiva do que concentrações superiores ou inferiores a esta (ISHIDA *et al.*, 2005). Outro fator crítico para ocorrência do efeito ABC é a dose lipídica utilizada nos estudos. Ishida e

colaboradores (2005) mostraram que o efeito ABC é potencialmente maior quando doses inferiores a 0,001-0,1 μmol fosfolípidios/kg são administrados como a primeira dose. Nos estudos conduzidos com doses mais elevadas (≥ 5 μmol fosfolípidios/kg) o fenômeno não foi observado. A produção de anticorpos IgM anti-PEG ocorre apenas quando doses baixas são administradas, uma vez que doses elevadas podem levar as células da zona marginal esplênica a induzir uma tolerância imunitária ou a tornarem-se anérgicas, sendo, portanto, incapazes desencadear uma resposta imune contra as nanoestruturas peguiladas.

Outro fator que também contribui para a ausência do efeito é o modelo animal utilizado. Vários trabalhos mostram que o efeito ABC apresenta variações com relação ao intervalo entre as doses e a carga lipídica dependendo da espécie. Dams e colaboradores (2000) mostraram a ocorrência do efeito ABC em macacos-rhesus e ratos, não sendo observado o fenômeno em camundongos.

No presente estudo, o fator que pode ter contribuído para ausência do efeito ABC seria modelo animal utilizado (camundongos), uma vez que a formulação apresentava 5,2% de PEG em sua composição e dose lipídica equivalente a 0,11 μmol fosfolípide/kg. Alguns estudos conduzidos com camundongos, onde o efeito é observado, apresenta intervalo de administração de 10 dias (ISHIDA *et al.*, 2003), diferente do protocolo utilizado, onde a segunda dose foi administrada 7 dias após a primeira.

3.5 Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais BALB/c sadios

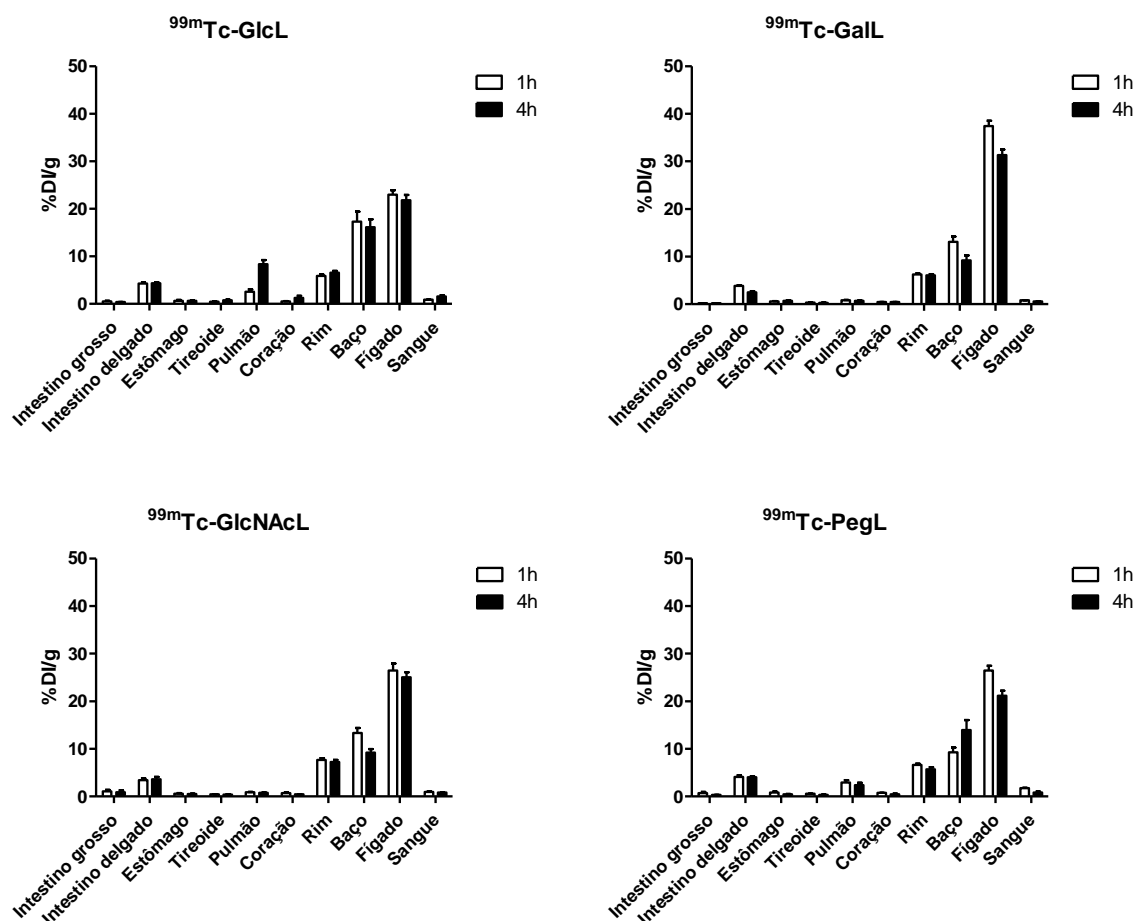
Os estudos de biodistribuição revelam que nos dois tempos avaliados (1h e 4h) os lipossomas apresentaram alta captação pelo fígado e baço (Figura 34, pág. 118). Este acúmulo ocorre devido à ação do sistema mononuclear fagocitário, principal responsável pelo reconhecimento e remoção dos lipossomas da corrente sanguínea. O perfil de distribuição dos lipossomas não revela acúmulo significativo em órgãos como tireoide e estômago, onde impurezas de radiomarcção, como $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, são preferencialmente captadas (FUSCALDI *et al.*, 2016). O resultado encontrado está de acordo com a elevada estabilidade do composto $^{99\text{m}}\text{Tc-CHOL-DTPA}$ demonstrada *in vitro*.

A considerável captação das nanopartículas pelos rins indica a depuração renal como principal via para eliminação das nanoestruturas avaliadas. Além disso, é observada uma captação substancial pelo intestino delgado, sugerindo que a via fecal também contribui para a excreção das partículas.

No tempo de 1h e 4h a captação no fígado foi estatisticamente maior para $^{99\text{m}}\text{Tc-Gall}$ quando comparada as demais formulações (Tabela 14, pág. 119). Os lipossomas

galactosilados apresentaram captação de 37,4% (1h) e 31,3% (4h). As demais formulações apresentaram resultados substancialmente menores, sendo encontrados os seguintes valores: 22,9% (1h) e 21,8% (4h) para $^{99m}\text{Tc-GlcL}$, 25,4% (1h) e 24,2% (4h) para $^{99m}\text{Tc-GlcNAcL}$ e 26,4% (1h) e 21,2% (4h) para $^{99m}\text{Tc-PegL}$.

Figura 34 – Perfil de biodistribuição dos lipossomas em animais BALB/c sadios.



A retenção aumentada dos lipossomas galactosilados provavelmente é devida à maior afinidade entre as lectinas presentes nos hepatócitos e os resíduos de galactose ancorados à superfície dos lipossomas (SILVA *et al.* 2018a). Estes resultados corroboram a hipótese levantada nos estudos de depuração sanguínea, sugerindo a maior captação no fígado para $^{99m}\text{Tc-GalL}$ como a razão para o curto $t_{1/2}$ deste lipossoma.

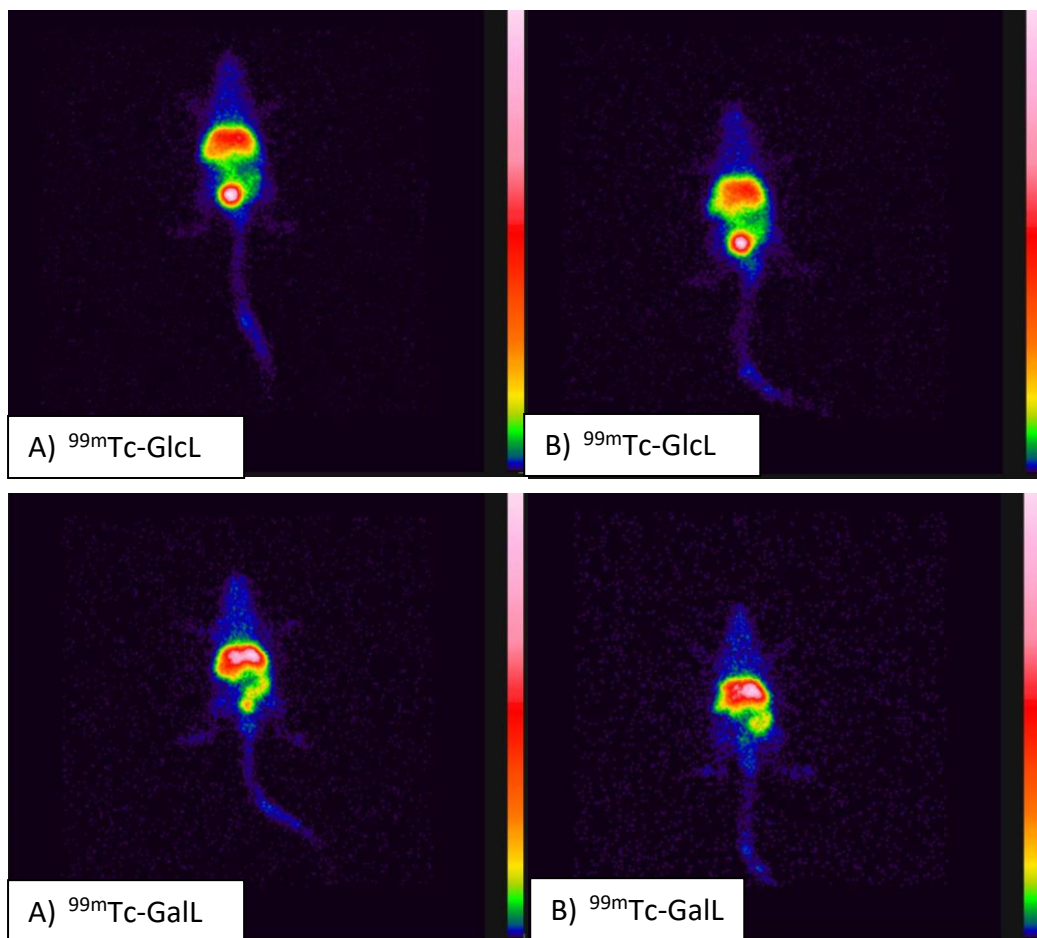
Os resultados do estudo de biodistribuição foram coerentes com as imagens cintilográficas, mostrando acentuada captação no fígado, baço e rins, como pode ser observado na Figura 35 (pág. 119).

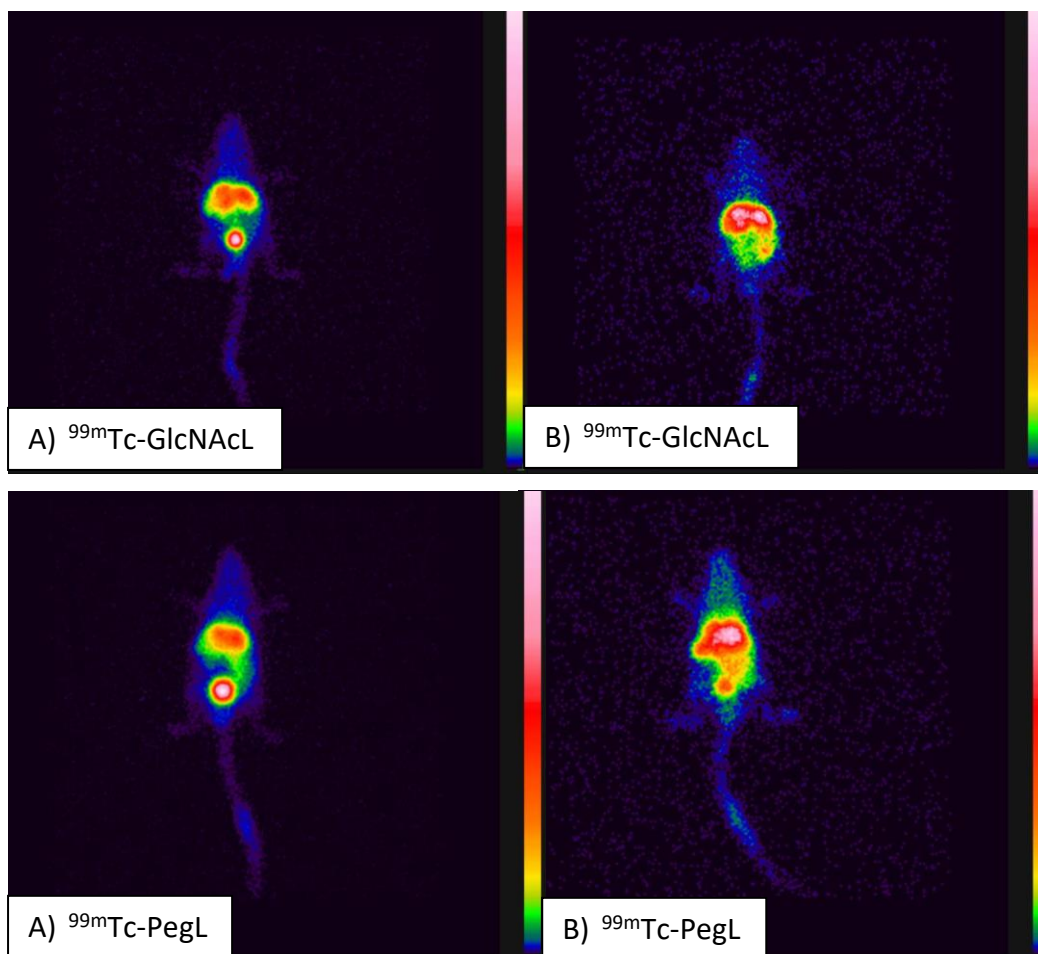
Tabela 14 – Biodistribuição hepática dos lipossomas nos tempos de 1h e 4h em animais BALB/c sadios.

Formulação	Fígado	
	1h	4h
$^{99m}\text{Tc-GlcL}$	$22,9 \pm 2,3^a$	$21,8 \pm 2,8^a$
$^{99m}\text{Tc-GalL}$	$37,4 \pm 2,3$	$31,3 \pm 2,6^b$
$^{99m}\text{Tc-GlcNAcL}$	$25,4 \pm 2,4^a$	$24,2 \pm 1,5^a$
$^{99m}\text{Tc-PegL}$	$26,4 \pm 2,6^a$	$21,2 \pm 2,7^{a,b}$

* Valores expressos em média \pm DP, n=8. ^a Representa diferença significativa quando comparado com valores de $^{99m}\text{Tc-GalL}$ na mesma coluna. ^b Representa diferença significativa quando comparado à mesma formulação em tempos diferentes.

Figura 35 – Imagens cintilográficas de camundongos BALB/c sadios obtidas 1 hora (A) e 4 horas (B) após administração de diferentes formulações lipossomais.





4 Conclusão

O composto CHOL-DTPA foi obtido com sucesso e incorporado nos lipossomas para estudos de biodistribuição e depuração sanguínea. A adição de CHOL-DTPA em uma concentração menor que 1% permitiu a obtenção de lipossomas com rendimento e estabilidade de radiomarcagem elevados. Os estudos *in vivo*, realizados em camundongos BALB/c sadios, mostraram que os lipossomas revestidos por glicose apresentaram tempo de meia vida superior aos lipossomas peguilados, indicando que derivados carboidratos possuem características promissoras para aumentar a furtividade de sistemas nanoestruturados. Além disso, foi observado um direcionamento hepático para os lipossomas galactosilados. Este resultado sugere que o sistema pode ser utilizado como uma plataforma promissora na entrega de fármacos em doenças hepáticas.

CAPÍTULO IV

Estudos da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de lipossomas revestidos com carboidratos em modelo murino de câncer de mama

1 Introdução

A terapia do câncer, em geral, é baseada principalmente na tríade cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Com base no tipo e no estágio do tumor, terapias específicas ou tratamentos combinados estão disponíveis. Em numerosas situações estas abordagens não se mostram eficazes, principalmente em estágios metastáticos da doença, onde a radioterapia e a cirurgia já não são capazes de fornecer perspectivas de cura para um tratamento a longo prazo. Nestes casos, os medicamentos quimioterápicos são a principal alternativa para tentar tratar a doença sistemicamente.

A quimioterapia sistêmica, no entanto, está associada a diversos problemas, dentre os quais se destacam: a biodisponibilidade inadequada do fármaco no tecido tumoral e os altos níveis de acúmulo do ativo em regiões não alvo, que culminam na elevada toxicidade dos regimes terapêuticos existentes. Essas limitações exemplificam que, apesar dos esforços no desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas, mais eficazes e mais específicas, o principal obstáculo para o tratamento do câncer continua sendo o desenvolvimento de materiais e métodos que possibilitem a entrega do fármaco de forma específica a regiões tumorais (THEEK *et al.*, 2014).

Neste contexto, muitos estudos descrevendo a atividade antitumoral de sistemas nanoestruturados vêm sendo realizado com o objetivo de potencializar os efeitos do fármaco e minimizar sua toxicidade. Diante disso, nessa etapa do trabalho, foi realizada a avaliação *in vitro* da atividade antitumoral dos lipossomas peguilados e revestidos por carboidratos em células da linhagem 4T1. Também foi avaliada a toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* dos lipossomas glicosilados e peguilados em camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1.

2 Parte experimental

2.1 Materiais

Os meios de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI-1640), o soro fetal bovino (SFB), a tripsina EDTA 0,25%, o azul de Tripán, o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e o solvente DMSO foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Os kits diagnósticos utilizados para análise bioquímica foram obtidos do Laboratório Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil)

2.2 Métodos

2.2.1 Estudos *in vitro* em células 4T1

2.2.1.1 Cultivo celular

Os estudos *in vitro* foram conduzidos com as linhagens de células tumorais aderentes 4T1 (modelo tumoral murino de mama). A linhagem foi mantida congelada em criotubos com 5% de DMSO e meio de cultura RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para iniciar o cultivo, os conteúdos dos criotubos foram descongelados e transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 2 mL de meio RPMI-1640 com 10% SFB, e então submetidos à centrifugação de 800 rpm durante 5 minutos (CS-6R, Beckman, EUA). Em seguida descartou-se o sobrenadante. A massa celular presente no fundo do tubo foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura. A suspensão celular foi transferida para uma garrafa plástica de cultivo celular T75 (75 cm², volume de 250 mL) (Corning Costar Inc., EUA) e mantida em estufa (Thermo Electron Co. EUA) a 37 °C com atmosfera úmida de 5% de CO₂.

Após a adesão celular realizou-se a manutenção da linhagem, no qual o meio foi trocado a cada 48 horas para garantir a renovação dos nutrientes. Com o auxílio de um microscópio invertido (Olympus, CKX 41) foram observadas a morfologia celular e formação de monocamada.

Quando a cultura celular apresentou aproximadamente 80% de confluência fez-se um repique utilizando-se a solução tripsina-EDTA (0,25%) para remover as células aderidas ao fundo da garrafa. Após as células serem soltas, elas foram transferidas para tubo de centrífuga de 15 mL e foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI-1640 com 10% SFB. Este tubo foi centrifugado por 4 minutos a 800 rpm e seu sobrenadante descartado. A massa celular foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura novo. Desta suspensão de células foi retirado 50 µL para misturar com 50 µL de azul de Tripán para contagem manual de células viáveis em câmara de Neubauer. O azul de Tripán corou o citoplasma de células mortas possibilitando assim a contagem de células inviáveis. Posteriormente à contagem, a suspensão celular (1 x 10⁶ células/100 µL por poço) foi distribuída em placas de 96 poços (Corning Costar Inc., EUA) para realização do ensaio de viabilidade celular.

2.2.1.2 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade das formulações lipossomais contendo doxorubicina e do respectivo fármaco isolado foi avaliada através do ensaio do MTT. Este método é baseado na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase que se encontra ativa

apenas em células metabolicamente funcionais. Essa enzima reduz o sal de tetrazólio solúvel de cor amarela em um produto insolúvel de cor violeta, cristais de formazan (CARMICHAEL *et al.*, 1987) cuja quantidade pode ser determinada por espectrofotometria, onde a intensidade da cor resultante da dissolução dos cristais é proporcional à atividade da enzima e, por conseguinte, ao número de células viáveis.

Para a avaliação da atividade citotóxica foi feita um plaqueamento de 1×10^6 de células em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 acrescido de 10% de SFB (PARK *et al.*, 1987). Após o plaqueamento celular, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido, para conseguinte adição das amostras a serem testadas.

Os testes de citotoxicidade foram realizados em dez diluições a partir da solução estoque (formulações e controle positivo), utilizando RPMI-1640 com 1% de suplementação de SFB. Cada concentração foi testada em triplicata e cada ensaio foi também repetido em triplicata. Após uma incubação de 48 horas, o meio em cada poço foi recolhido. Para determinar a viabilidade das células, 100 µL do sal tetrazólico MTT (5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e as células foram cultivadas em adicional incubação durante 3 horas. Retirou-se o sobrenadante e aplicou-se 50 µL de DMSO em cada poço, para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 no comprimento de onda de 550 nm. A concentração que inibe 50% do crescimento das células (IC₅₀) na presença das formulações e do controle positivo foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença das formulações (consideradas 100% de crescimento).

2.2.2 Citometria de fluxo

2.2.2.1 Análise da apoptose/necrose pelo método da anexina-V/iodeto de propídio

Para avaliar as células em apoptose foi utilizado o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (BD biosciences, EUA) seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, pelo método de citometria de fluxo. Neste teste, células apoptóticas são marcadas com Anexina V-FITC que se liga à fosfatidilserina externalizada destas células, enquanto células com rompimento de membrana coram com o iodeto de propídio (IP).

Os tratamentos foram realizados 48 horas em células 4T1, com uma quantidade de 1×10^6 células/tubo. Após os tratamentos as células foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato (PBS) à 4 °C e ressuspensas em 0,15 mL de tampão de ligação de anexina (1x). As células foram marcadas com 50 µL do mix de marcação contendo 2,5 µL anexina V-FITC e 2,5 µL

IP (3mM) e incubadas por 15 minutos à 4 °C em ausência de luz. Vinte mil eventos foram utilizados para a quantificação celular em citômetro de fluxo (LSR Fortessa BD biosciences). Controles não corados foram utilizados para avaliar a autofluorescência das células e controles de células não tratadas foram marcadas com anexina e iodeto de propídio para avaliar a morte celular das células sem tratamento. A população de células em cada quadrante foi determinada usando o software FlowJo x10.0.7.

2.2.3 Estudos *in vivo*

2.2.3.1 Cultivo celular

As células 4T1 foram cultivadas conforme descrito no item 2.2.1.1 deste capítulo.

2.2.3.2 Animais

Trinta e dois camundongos BALB/c fêmeas com 7 a 8 semanas de vida (aproximadamente 20 g) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram mantidos sob cuidados na sala de Experimentação Animal do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Todos os ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo número 158/2014.

2.2.3.3 Desenvolvimento do tumor

Alíquotas 100 µL contendo $2,5 \times 10^6$ células 4T1 foram inoculadas no flanco esquerdo de cada camundongo. Os animais foram acompanhados em relação ao aparecimento e crescimento do tumor.

2.2.3.4 Tratamento

No sétimo dia após a inoculação do tumor os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo 1 – animais sem tratamento, administração de tampão (Controle), Grupo 2 – doxorrubicina livre (DOX livre), Grupo 3 – doxorrubicina encapsulada em lipossomas revestidos por glicose (GlcL-DOX), Grupo 4 – doxorrubicina encapsulada em lipossomas peguilados (PegL-DOX). O tratamento foi realizado com quatro doses, a cada três dias, equivalente a 5,0 mg de doxorrubicina/kg/dia. O volume de solução de doxorrubicina ou formulação administrado foi de 100 µL, por via endovenosa, realizadas pela veia caudal utilizando seringas de insulina de 1 mL.

2.2.3.5 Avaliação da eficácia

A partir do início do tratamento (Dia 0), os animais foram acompanhados, a cada dois dias, em relação às medidas dos tumores utilizando um paquímetro. Os volumes tumorais foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$V(mm^3) = D^2 \times d \times 0,5$$

Onde D = diâmetro maior, d = diâmetro menor (FERNANDES *et al.*, 2016).

O Volume Relativo do Tumor (VRT), correspondente à relação entre o volume final do tumor no último dia analisado e o volume inicial, foi avaliado da seguinte forma (FERNANDES *et al.*, 2016):

$$VRT = \frac{\text{Volume do tumor no dia 12}}{\text{Volume do tumor no dia 0}}$$

Os valores obtidos para o VRT foram utilizados no cálculo do índice de Inibição do Crescimento (IC) do tumor (FERNANDES *et al.*, 2016):

$$IC = 1 - \left(\frac{\text{Média VRT grupo tratado}}{\text{Média VRT grupo controle}} \right) \times 100$$

O acompanhamento dos animais foi feito até o Dia 12 a partir do início do tratamento, correspondente ao 19º dia após o inóculo das células. Após dois dias, os animais foram anestesiados, eutanasiados. Foram registrados os valores de peso dos animais e calculada a variação, conforme equação a seguir:

$$\text{Variação peso (g)} = \text{Peso do dia X} - \text{Peso dia 0}$$

Onde X corresponde ao dia da avaliação.

2.2.3.6 Avaliação da toxicidade

A avaliação da toxicidade foi feita para todos os animais após o tratamento com tampão, DOX livre, GlcL-DOX ou PegL-DOX. Os animais foram anestesiados e o sangue total foi coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo solução de EDTA (anticoagulante). O sangue total coletado foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 min. O plasma obtido foi utilizado para a quantificação dos parâmetros hepáticos, renais e cardíacos. Para a determinação da função hepática foram realizadas dosagens de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST). A nefrotoxicidade foi determinada mediante medidas da concentração de uréia e creatinina. A função cardíaca foi avaliada por meio da dosagem de creatino quinase isoforma MB (CK-MB). Todos os testes bioquímicos foram realizados mediante análise espectrofotométrica em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) e kits de diagnóstico.

2.2.3 Análise estatística

Os valores médios e desvios-padrão foram calculados para os experimentos. As análises estatísticas foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA). Um nível de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

3 Resultados e discussão

3.1 Estudos *in vitro* em células 4T1

Na Figura 36 (pág. 129) encontram-se os dados de citotoxicidade obtidos para os lipossomas avaliados em cultura celular de adenocarcinoma de mama murino 4T1. Os resultados estão apresentados na forma de curvas de porcentagem de viabilidade celular. Os valores de IC₅₀ obtidos para as amostras testadas encontram-se descritos na Tabela 15 (pág. 129).

A atividade citotóxica obtida para os lipossomas brancos foi insignificante, não sendo possível determinar o valor de IC₅₀ nas concentrações avaliadas. Para os tratamentos associados à doxorrubicina observa-se que a atividade citotóxica foi dose dependente para todas as formulações. O mesmo perfil foi observado para o tratamento com doxorrubicina livre. Na concentração mais alta (64 µM) a viabilidade celular encontrada para as formulações foram: 13,2 ± 0,8% para GlcL-DOX, 19,0 ± 3,2% para GalL-DOX, 18,2 ± 3,1% para GlcNAcL-DOX e 42,2 ± 8,4% para PegL-DOX. A doxorrubicina livre apresentou maior atividade citotóxica, com viabilidade celular igual a 3,6 ± 2,1% na concentração de 64 µM. Isto possivelmente ocorre devido à maior facilidade de penetração da DOX no núcleo celular (TANG *et al.*, 2018), o que não é observado para formulações lipossomais, que são inicialmente internalizadas por um processo, muitas vezes, dependente de energia para, em seguida, liberarem o fármaco. Vale ressaltar que não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a formulação GlcL-DOX e a DOX livre na maior concentração (64 µM).

A partir da concentração de 8 µM observou-se redução da viabilidade celular estatisticamente significativa para DOX livre em comparação com os demais grupos avaliados. Os lipossomas GlcL-DOX, GalL-DOX e GlcNAc-DOX não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre eles nas concentrações avaliadas. Ressalta-se que os lipossomas revestidos com carboidratos apresentaram efeito citotóxico superior aos lipossomas peguilados, sendo os valores encontrados para GlcL-DOX, GalL-DOX e GlcNAc-DOX estatisticamente superiores a PegL-DOX a partir da concentração de 4 µM.

A maior citotoxicidade alcançada com lipossomas revestidos por carboidratos pode ser resultado de uma captação celular aumentada, como já foi observado para lipossomas carregados com doxorrubicina destinados ao tratamento de células 4T1 (LIU *et al.*, 2013). Já o menor efeito citotóxico encontrado para os lipossomas peguilados pode ser explicado por uma menor internalização destas vesículas. Uma hipótese é que as cadeias de PEG agiriam diretamente nas interações célula-lipossoma, criando uma "lacuna" que impediria um contato

direto com a superfície da célula (MARTINA *et al.*, 2007; DAN, 2002). Além disso, os lipossomas peguilados apresentaram menor liberação de DOX nos estudos previamente realizados (Figura 28, pág. 103), o que poderia resultar em um menor efeito citotóxico, conforme foi observado.

Figura 36 – Viabilidade celular mediada pelo ensaio do MTT para DOX Livre, GlcL-DOX, GalL-DOX, GlcNAcL-DOX e PegL-DOX em células das linhagens tumorais 4T1.

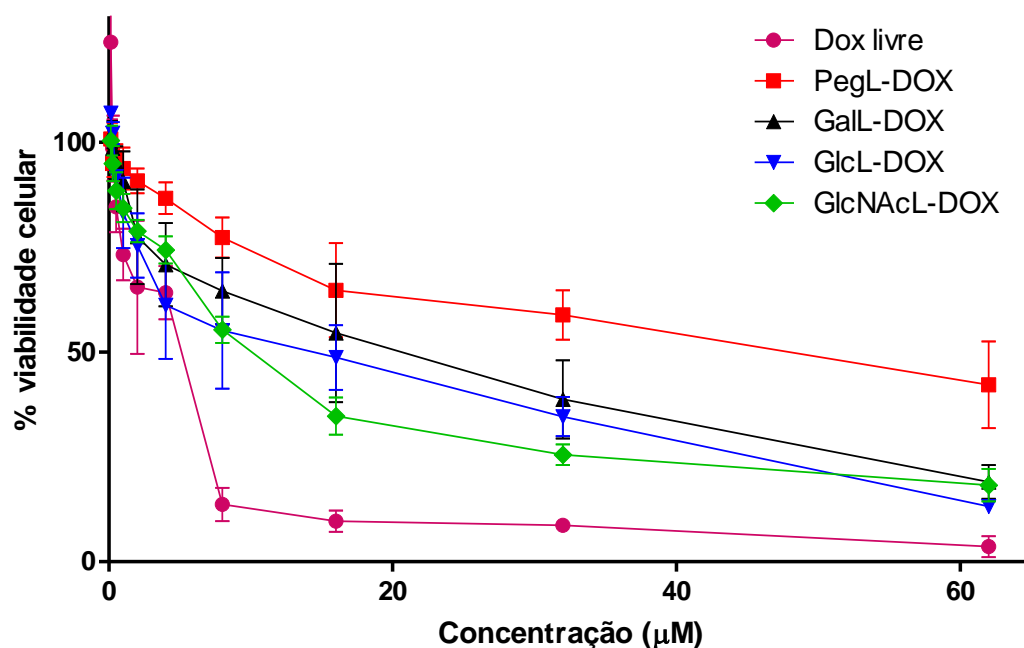


Tabela 15 – Valores de IC_{50} obtidos para linhagem de células 4T1. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas entre as formulações lipossomais e a DOX livre.

Amostra	IC_{50} (µM)
GlcL	>62
GalL	>62
GlcNAcL	>62
PegL	>62
DOX livre	$3,15 \pm 0,22$
GlcL-DOX	$14,50 \pm 1,60^*$
GalL-DOX	$18,50 \pm 2,10^*$
GlcNAcL-DOX	$9,22 \pm 1,05^*$
PegL-DOX	$42,35 \pm 2,85^*$

3.2 Quantificação de células apoptóticas

A presença de apoptose celular induzida pelos tratamentos foi determinada por citometria de fluxo, onde se avaliou a marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI), para caracterizar os diferentes estágios de apoptose das células. A Anexina V possui alta afinidade pela molécula de fosfatidilserina, sendo, por isso, utilizada como ferramenta para visualizações de células apoptóticas por citometria de fluxo. Um dos primeiros eventos que ocorre durante o processo de apoptose é a exteriorização da molécula de fosfatidilserina, dessa forma, a marcação de células com Anexina V pode indicar apoptose em um estágio recente (VERMES *et al.*, 1995). Além disso, a utilização de Anexina V juntamente com Iodeto de Propídeo serve como marcador vital de células. Em células mortas, a membrana plasmática não se apresenta íntegra e, dessa forma, é permeável ao corante vital PI, que se incorpora ao DNA. Portanto, a partir destes marcadores é possível identificar células viáveis (Anexina V e PI negativas), células em um estágio recente de apoptose (Anexina V positivas e PI negativas) e células que estão em um estágio tardio de apoptose/necrose (Anexina V e PI positivas) e células necróticas (PI positivas), (KOOPMAN *et al.*, 1994).

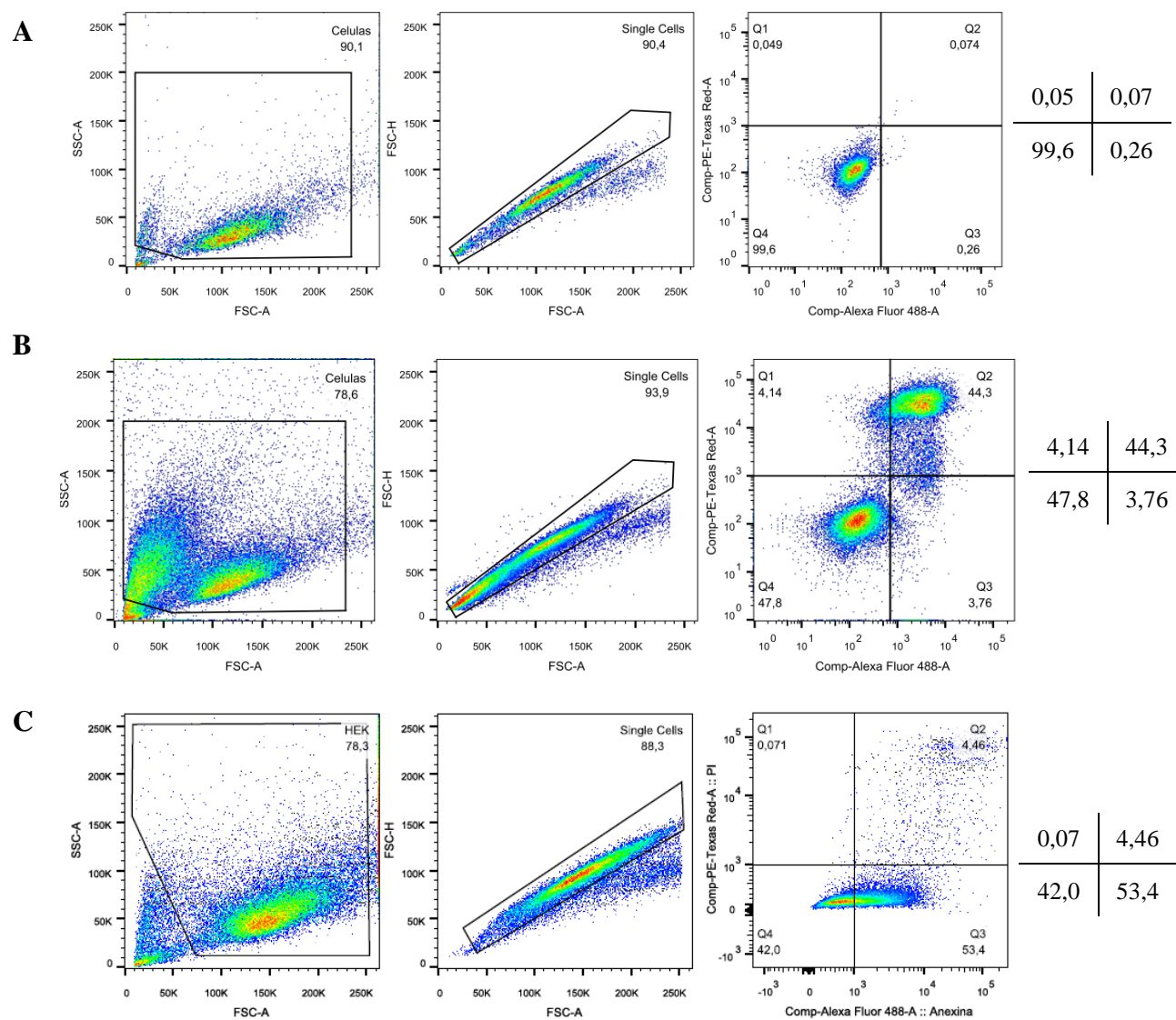
É possível observar na Figura 37 (pág. 131) que houve diminuição significativa do número de células viáveis em todos os grupos tratados, conforme esperado. Os tratamentos com as formulações lipossomais apresentaram aumento na população celular em apoptose recente, com percentual de 53,4% para GlcL-DOX, 44,6% para GalL-DOX, 41% para GlcNAcL-DOX e 42,6% para PegL-DOX. Já o tratamento com DOX livre resultou em aumento na porcentagem de células em apoptose tardia/necrose, com valor de 48,8% de células na concentração avaliada e apenas 3,8% de células em apoptose recente.

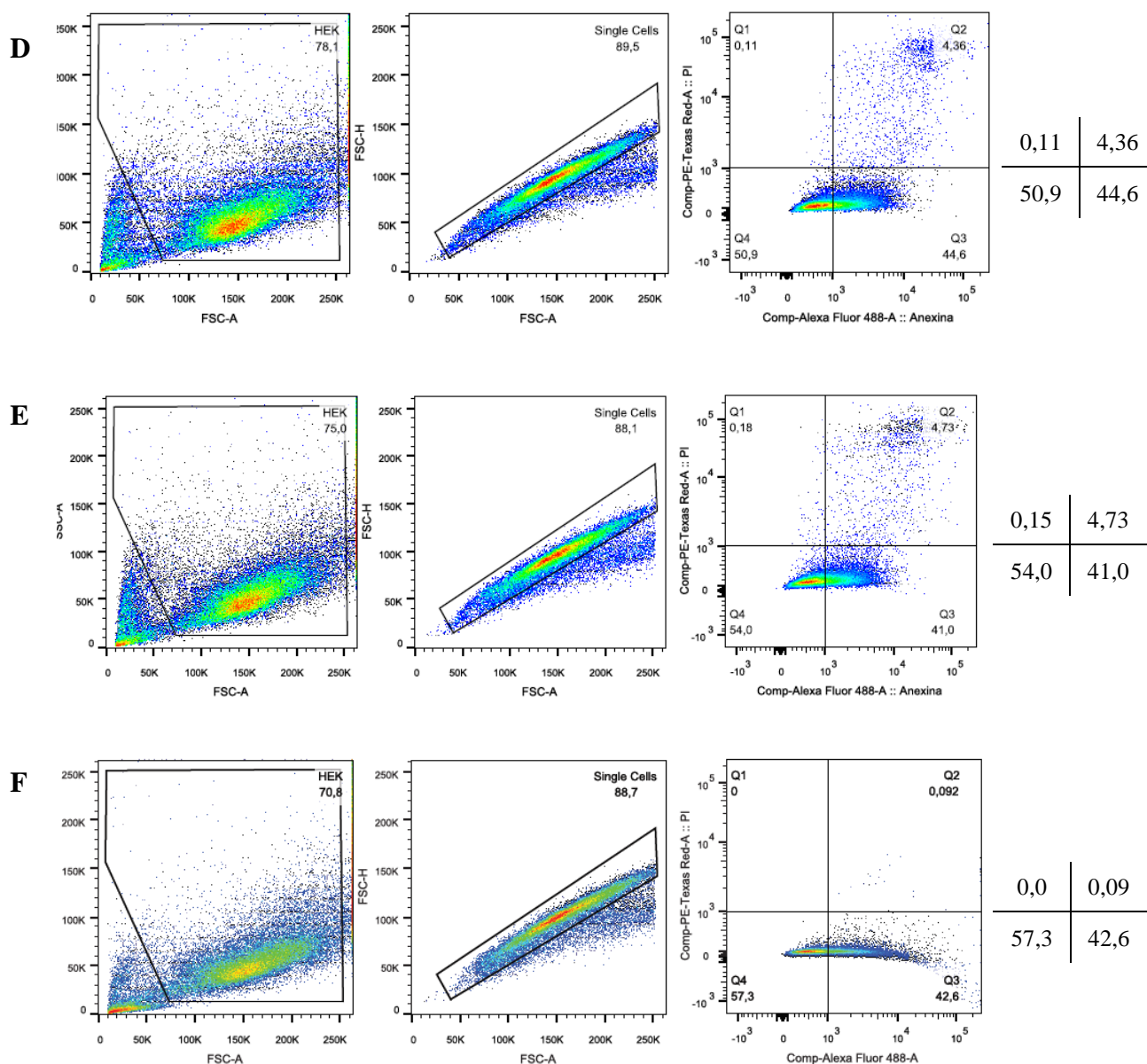
A apoptose é um fenômeno em que a célula aciona mecanismos que culminam com sua morte. Este processo resulta sempre em ativação das proteases, que pode ocorrer por duas principais vias: ativação das caspases por via direta (via extrínseca) e ativação das caspases via alteração mitocondrial (via intrínseca). Na literatura a DOX foi relacionada à apoptose induzida pelas duas vias (MINOTTI *et al.*, 2004; RENU *et al.*, 2018).

Compostos que induzem a apoptose recente, em geral, são menos agressivos, uma vez que há uma lesão menos intensa na membrana celular. Já os compostos que induzem a apoptose tardia/necrose prejudicam a permeabilidade da membrana citoplasmática e, em geral, apresentam maior toxicidade, uma vez que tais processos são acompanhados de respostas inflamatórias. De acordo com os dados obtidos nos estudos por citometria o tratamento com DOX livre apresentou um maior número de células em apoptose

tardia/necrose, o que sugere uma maior toxicidade do composto quando comparado com as formulações lipossomais, que apresentaram majoritariamente células em apoptose inicial.

Figura 37 – Perfil de morte das células 4T1 coradas com Anexina-V FITC e solução PI em amostras não tratadas (A) e após o tratamento com DOX livre (B), GlcL-DOX (C), GalL-DOX (D), GlcNAcL-DOX (E) e PegL-DOX (F).





3.3 Estudos *in vivo*

Para o estudo *in vivo* foram selecionados os lipossomas revestidos por glicose e lipossomas peguados, tendo em vista que os resultados apresentados nas etapas anteriores (estudos biodistribuição, clearance, liberação e atividade *in vitro*) sugerem que GlcL pode apresentar resultados mais promissores no tratamento do câncer de mama murino 4T1 em modelo animal. O modelo tumoral 4T1 possui características que se assemelham ao câncer de mama humano, dentre as quais se destaca o desenvolvimento espontâneo de metástases a partir do tumor primário (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2001), o que justifica sua escolha.

A Figura 38 (pág. 134) apresenta os resultados de variação do crescimento tumoral em função do tempo para os diversos tratamentos. A variação foi determinada considerando-se o volume inicial como 100% e calculando-se a porcentagem de aumento ou redução do volume de acordo com o valor inicial. Os animais não tratados (grupo controle) apresentaram a maior porcentagem de crescimento tumoral, que aumentou de forma contínua até o último dia de avaliação, quando o valor foi $6497 \pm 5596\%$. Dentre os grupos que receberam tratamento, a DOX livre apresentou menor controle sobre a progressão tumoral, onde foi observado um crescimento de 1260% ao final do tratamento, valor estatisticamente maior que as formulações GlcL-DOX e PegL-DOX. Pode-se observar que a administração de GlcL-DOX demonstrou maior controle na progressão do crescimento tumoral, resultando praticamente na ausência de alteração do volume tumoral a partir do 16º dia. No grupo de animais tratados com o PegL-DOX também foi observado controle da progressão do tumor quando comparados à DOX livre. Entretanto, esta formulação mostrou-se menos efetiva no controle do crescimento tumoral quando comparada com a formulação GlcL-DOX. No último dia de tratamento, os lipossomas PegL-DOX apresentaram um crescimento tumoral igual a 896% e a formulação GlcL-DOX apresentou resultado de 631%.

Na Tabela 16 (pág. 134) estão descritos os dados encontrados com os cálculos de VRT e IC. Os valores de VRT foram mais expressivos para o grupo Controle e para DOX livre, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre eles. Já os animais tratados com GlcL-DOX apresentaram baixo VRT, sendo o valor significativamente menor que o observado para os grupos controle, PegL-DOX e DOX livre, com diminuição de aproximadamente 2,4 vezes em relação ao controle, 1,6 vezes em relação a PegL-DOX e 1,9 vezes em relação a DOX livre. Já os animais tratados com PegL-DOX também apresentaram um valor de VRT menor que o grupo controle, entretanto o valor encontrado não possui diferença significativa quando comparado aos animais tratados com DOX livre. Por fim, os resultados relativos à IC demonstraram que houve uma inibição do crescimento do tumor de 58,5% para os animais tratados com GlcL-DOX, 35,3% para o grupo PegL-DOX e 24,3% para aqueles tratados com DOX livre.

Figura 38 – Avaliação do crescimento tumoral em função do tempo. O tratamento constituiu-se de 4 doses de 5 mg/kg. N = 8; Média \pm DP. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas entre as formulações GlcL-DOX e PegL-DOX.

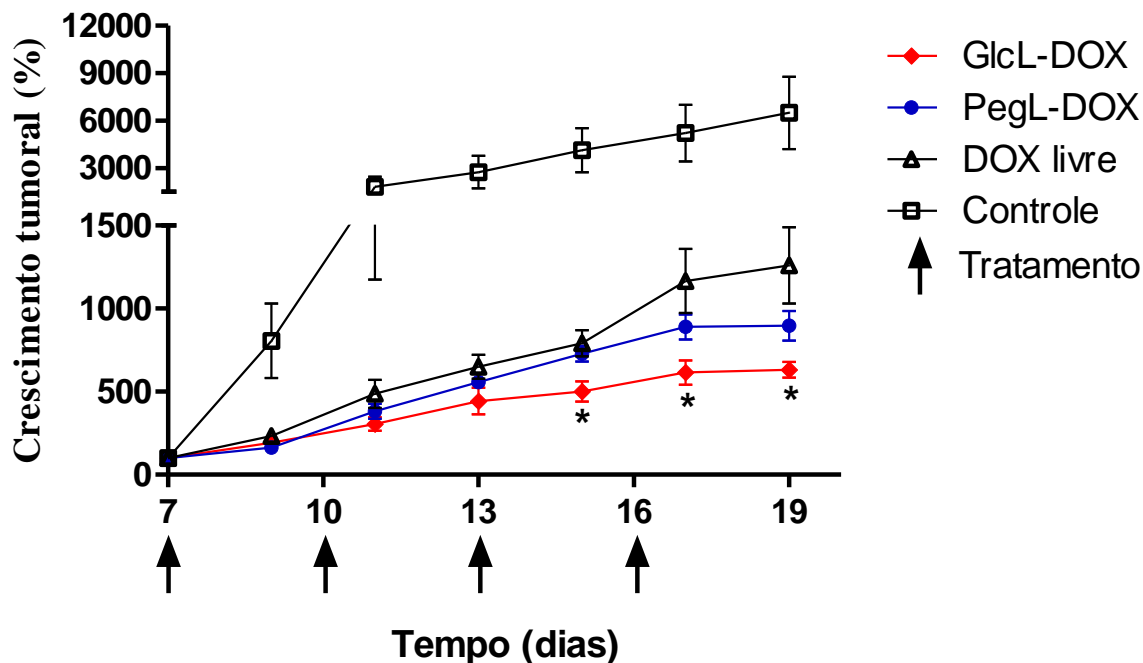


Tabela 16 – Valores de Volume Relativo do Tumor (VRT) e Inibição do Crescimento (IC) dos grupos em função do tratamento.

Tratamento	VRT (média \pm DP)	IC (%)
GlcL-DOX	3,49 \pm 1,05 ^{a,b}	58,5
PegL-DOX	5,43 \pm 1,46 ^a	35,3
DOX livre	6,54 \pm 1,29	24,3
Controle	8,41 \pm 2,56	-

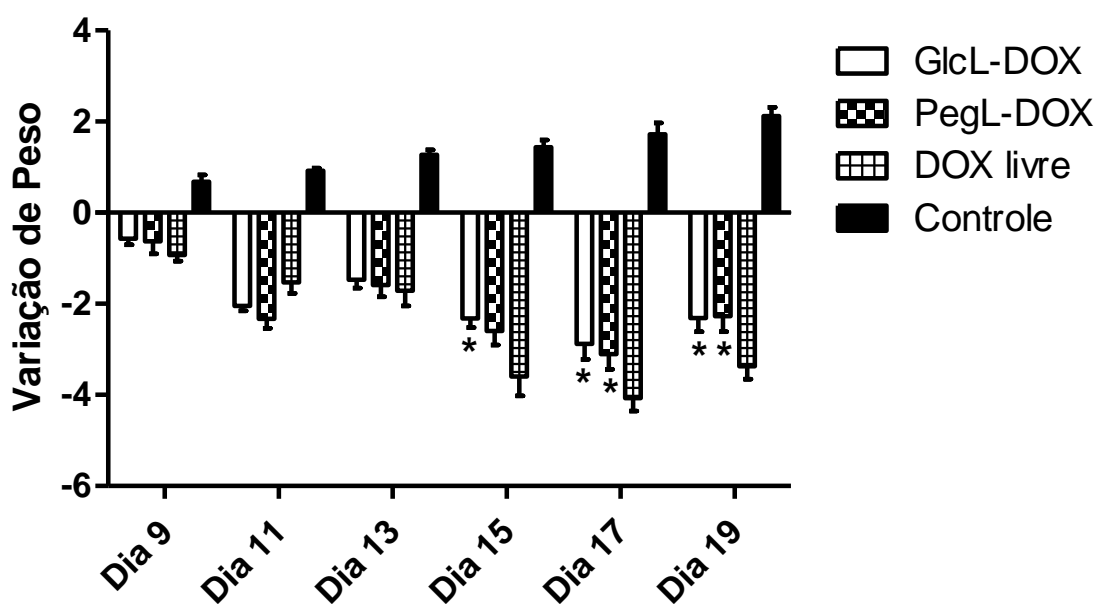
^a Representa diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o grupo controle

^b Representa diferença estatística significativa em comparação com o grupo tratado com DOX livre

A alteração no peso corporal dos animais foi utilizada como indicador indireto de toxicidade sistêmica. Na Figura 39 (pág. 135) está representada a variação do peso corporal dos animais acometidos com tumor e tratados com as diferentes formulações contendo DOX e com o controle. Observa-se uma perda de peso significativa em relação ao grupo controle, independente da formulação contendo DOX que foi administrada. Apenas para os animais do grupo controle foi verificado um ganho de peso do dia 9 (início do tratamento) até o dia 19.

Cabe ressaltar que quando comparamos, ao final do experimento, o peso dos animais que receberam os diferentes tratamentos, observamos que o grupo tratado com GlcL-DOX e PegL-DOX apresentaram peso 10% superior ao grupo tratado com DOX livre. Além disso, uma taxa de mortalidade de 12,5% foi observada no grupo tratado com DOX livre, enquanto nenhuma morte foi observada nos grupos tratados com as formulações lipossomais. Estes achados sugerem que a utilização da formulação lipossomal é capaz de reduzir a toxicidade da DOX.

Figura 39 – Avaliação da variação do peso corpóreo dos animais em função do tempo e do tipo de tratamento. N = 8; Média \pm DP. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significativas entre as formulações GlcL-DOX e PegL-DOX comparadas a DOX livre.



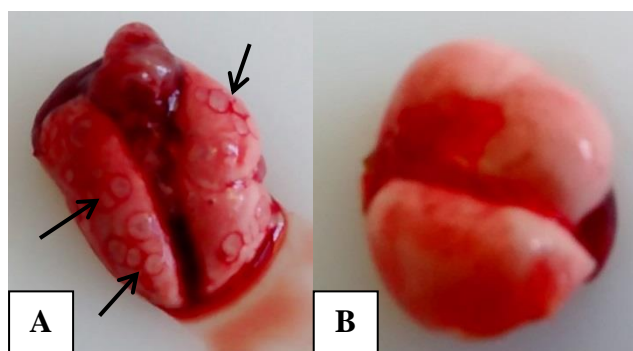
Os dados encontrados revelam que o tratamento com GlcL-DOX foi mais efetivo no controle da progressão tumoral quando comparado aos demais tratamentos (PegL-DOX e DOX livre). Embora no estudo *in vitro* a encapsulação de DOX nos lipossomas GlcL tenha levado a um aumento da IC₅₀ para a linhagem celular avaliada, o estudo *in vivo* demonstrou que os lipossomas GlcL-DOX promoveram um maior controle do crescimento tumoral, além de fornecer dados que indicam uma redução da toxicidade sistêmica.

De acordo com os valores de IC, a formulação GlcL-DOX inibiu o crescimento tumoral 1,7 vezes mais quando comparada a PegL-DOX e 2,4 vezes mais que a DOX livre. A maior eficácia encontrada para os lipossomas GlcL-DOX pode ser explicada por diversos

fatores. Entre eles, o maior tempo de circulação encontrado nos estudos de clearance, que associado ao efeito EPR, contribuem para um acúmulo mais expressivo dos lipossomas GlcL-DOX na região tumoral. O maior $t_{1/2}$ observado para estes lipossomas permite maior número de passagens através da área tumoral, que associado a permeabilidade aumentada dos vasos sanguíneos, leva a um aumento das vesículas nesta região. Além disso, a modificação da superfície dos lipossomas com ligantes direcionadores, como a glicose, pode favorecer a distribuição intratumoral e a liberação intracelular da DOX. Entretanto, para confirmar esta possibilidade, experimentos delineados especificamente para avaliar a internalização das vesículas ainda precisam ser realizados.

Além dos resultados relatados acima, observou-se que os animais tratados com doxorubicina (lipossomal e livre) não apresentaram metástases pulmonares visíveis, conforme mostrado na Figura 40. De acordo com Souza (2013), as metástases pulmonares são encontradas a partir do 14º dia após a implantação do tumor. Considerando-se que após o inóculo das células decorreram-se 19 dias, podemos sugerir que os tratamentos inibiram a metástase nos animais. Análises histopatológicas serão realizadas nos órgãos para confirmar a observação.

Figura 40 – Aspecto dos pulmões dos animais do grupo controle (A) e após tratamento com GlcL-DOX (B). As setas indicam a presença de metástases.



3.3 Estudos toxicidade

Embora a doxorubicina seja um agente anticancerígeno de primeira linha, seus efeitos colaterais limitam severamente sua utilização. Dessa forma, visando avaliar possíveis alterações causadas pelos tratamentos, foram investigados os parâmetros bioquímicos indicativos de lesões hepáticas, renais e cardíacas dos animais tratados com DOX.

A lesão hepática induzida pela doxorubicina é consequência da formação de radicais livres e geração de espécies reativas de oxigênio que induzem a peroxidação lipídica e

promovem danos oxidativos às células. Uma vez iniciado, o estresse oxidativo induz graves danos à síntese de DNA, RNA e proteínas, interferindo na capacidade regenerativa das células hepáticas. Nesse caso, estas alterações irreversíveis levam à apoptose ou necrose dos hepatócitos e aumento intensivo de enzimas hepáticas no sangue, principalmente ALT e AST (JACEVIC *et al.*, 2017; SAAD *et al.*, 2001). Dessa forma, os níveis plasmáticos destas enzimas são comumente utilizados para avaliar lesões e distúrbios hepáticos. Observa-se na Tabela 17 que atividade enzimática da transaminase AST permaneceu inalterada em todos os grupos tratados. Já os níveis de ALT foram estatisticamente superiores para o grupo tratado com DOX livre e PegL-DOX. Vale ressaltar que não foram observadas alterações na concentração sérica destes marcadores para os animais tratados com GlcL-DOX, sugerindo que a formulação não produziu hepatotoxicidade detectável.

Um dos efeitos que mais limitam a utilização clínica da doxorubicina é sua elevada cardiotoxicidade, que pode progredir para insuficiência cardíaca terminal (ZORDOKY, *et al.*, 2010). O mecanismo exato da cardiotoxicidade induzida pela DOX e sua progressão para insuficiência cardíaca ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, vários mecanismos foram propostos, entre eles estão o aumento do estresse oxidativo e a alteração do metabolismo energético do miocárdio (NAKAMURA *et al.*, 2000; UENO *et al.*, 2006; TAKEMURA E FUJIWARA, 2007).

Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos avaliados em animais tratados com tampão (controle), DOX livre, GlcL-DOX e PegL-DOX. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Controle	DOX Livre	GlcL-DOX	PegL-DOX
ALT (U/L)	21,3 \pm 1,8	43,6 \pm 14,5 ^a	32,3 \pm 2,6 ^b	40,1 \pm 7,8 ^a
AST (U/L)	109,4 \pm 15,2	121,6 \pm 17,5	120,9 \pm 10,7	123,8 \pm 9,1
Creatinina (mg/dL)	0,46 \pm 0,06	0,36 \pm 0,03 ^a	0,35 \pm 0,02 ^a	0,35 \pm 0,03 ^a
Ureia (mg/dL)	54,7 \pm 10,5	78,8 \pm 10 ^a	64,9 \pm 5,4 ^b	64,8 \pm 8,3 ^b
CK-MB (U/L)	34,7 \pm 3,1	42,5 \pm 4,7 ^a	25,6 \pm 5,2 ^b	25,6 \pm 6,1 ^b

^a Representa diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o grupo controle

^b Representa diferença estatística significativa entre o grupo tratado com DOX livre e o grupo tratado com GlcL-DOX ou PegL-DOX.

A presença de lesão cardíaca pode ser caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos de CK-MB. No presente estudo observou-se aumento de CK-MB nos animais tratados com DOX livre, sendo estes valores significativamente menores nos animais tratados com as formulações lipossomais. Estes dados corroboram diversos estudos que mostram que a encapsulação de DOX nos lipossomas leva a uma diminuição da sua toxicidade cardíaca (SILVA *et al.*, 2018).

A nefrotoxicidade também se configura como um dos fatores limitantes à utilização da DOX. Os mecanismos responsáveis pela toxicidade renal induzida pela DOX são multifatoriais e, até o momento, não foram totalmente elucidados (EL-MOSELHY & EL-SHEIKH, 2014). Para avaliar a disfunção renal foram quantificados os níveis séricos de ureia e creatinina nos animais após os diferentes tratamentos. Observa-se na Tabela 17 (pág. 137) que não houve alteração significativa nos níveis de creatinina para os animais tratados com DOX livre, GlcL-DOX e PegL-DOX quando comparados ao grupo controle. Já os níveis de ureia apresentam-se significativamente superiores no grupo tratado com DOX livre. Os GlcL-DOX e PegL-DOX apresentaram concentrações de ureia estatisticamente menores que os animais tratados com DOX. A ureia é o produto final do metabolismo das proteínas e pode encontrar-se elevada em muitos casos, incluindo, mas não se limitando, a disfunção renal. Dessa forma, a creatinina sérica é mais específica para avaliar a função renal, devido ao seu metabolismo constante e sua eliminação pelos rins (EL-ASHMAWY, 2018). Neste estudo, não foram observadas evidências de nefrotoxicidade para os tratamentos com DOX livre, GlcL-DOX e PegL-DOX. Embora o tratamento com DOX livre tenha demonstrado um aumento no nível de uréia, estudos histomorfológicos são necessários para comprovar a lesão renal.

4 Conclusão

A avaliação da atividade *in vitro* demonstrou que os lipossomas revestidos por carboidratos apresentaram maior citotoxicidade quando comparados aos lipossomas peguilados, sugerindo uma melhor internalização das vesículas. No estudo *in vivo* a formulação glicosilada demonstrou maior atividade antitumoral em comparação com a doxorrubicina livre e lipossomas peguilados. Os resultados dos testes bioquímicos mostraram que as formulações lipossomais foram capazes de reduzir a toxicidade cardíaca da DOX. Diante do exposto, pode-se concluir que a incorporação de carboidratos na superfície de lipossomas é uma alternativa promissora para o tratamento de tumores.

3 DISCUSSÃO GERAL

Várias ferramentas diagnósticas e terapêuticas direcionadas ao câncer foram desenvolvidas nas últimas décadas. Apesar dos grandes avanços tecnológicos na medicina, as taxas de mortalidade ainda são elevadas e o tratamento do câncer continua sendo um campo desafiador (JEONG *et al.*, 2016).

Conforme discutido ao longo deste trabalho, inúmeros estudos publicados na literatura mostram que os lipossomas são uma plataforma promissora para entrega e direcionamento de fármacos na terapia do câncer. Entretanto, algumas limitações, principalmente relacionadas a inserção do PEG nas nanoestruturas, indicam a necessidade de desenvolver novos compostos para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas e, com isso, melhorar seus efeitos no tratamento do câncer.

Nesse contexto, o planejamento dessa tese baseou-se em responder as seguintes perguntas:

É possível utilizar derivados de carboidratos como alternativa ao PEG, com resultados satisfatórios em termos de tempo de meia vida e biodistribuição?

Lipossomas contendo carboidratos apresentam características físico-químicas e estabilidade adequada para serem utilizados na terapia do câncer?

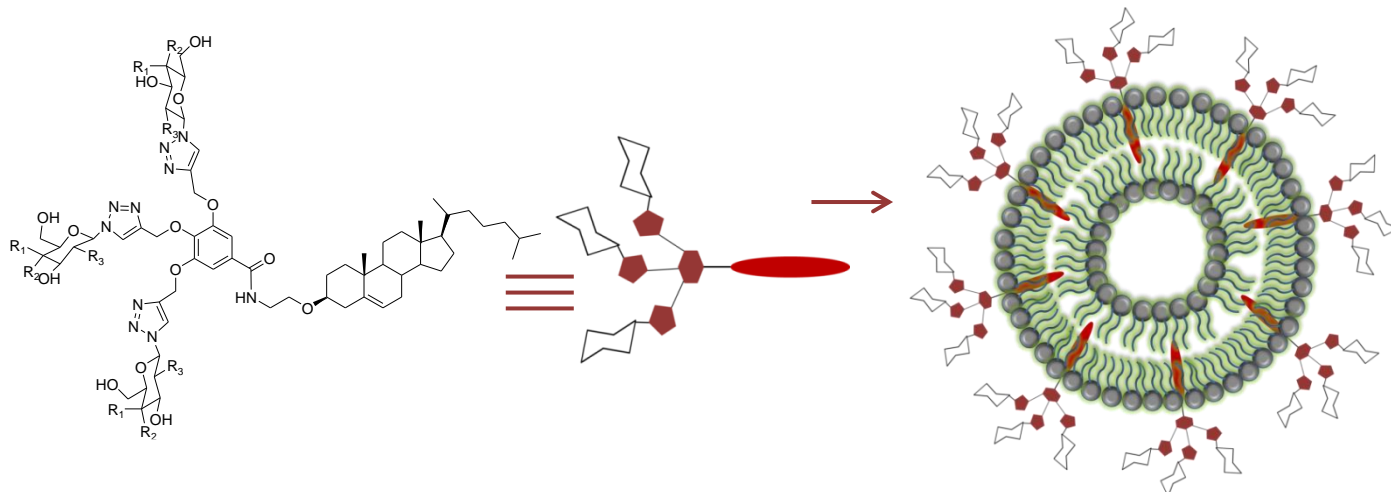
A adição de carboidratos pode contribuir para um direcionamento ativo, com consequente aumento da atividade antitumoral?

Para responder estas perguntas o objetivo geral deste trabalho consistiu em: (i) sintetizar e caracterizar três derivados de carboidratos para serem incorporados na superfície de lipossomas contendo doxorubicina; (ii) caracterizar físico-quimicamente e avaliar *in vitro* e *in vivo* as propriedades furtiva e antitumoral destes lipossomas.

A primeira etapa deste trabalho envolveu a síntese e caracterização dos glicosiltriazóis ancorados ao colesterol, que viabilizaria a inserção destes compostos na bicamada lipídica dos lipossomas (Figura 41, pág. 140). Duas rotas sintéticas foram utilizadas, na primeira os triazóis seriam obtidos para, em seguida, serem conectados ao colesterol. Para o derivado da *N*-acetilglicosamina este método mostrou-se ineficiente, uma vez que não foi possível eliminar o cobre utilizado na reação click. Foi, então, proposta a modificação na ordem de obtenção dos derivados, onde primeiro seria realizada a ligação entre o composto tripropargílico e o colesterol, para, em seguida, obter os triazóis. Desta forma, foi possível sintetizar todos os glicosiltriazóis de forma mais rápida e eficiente.

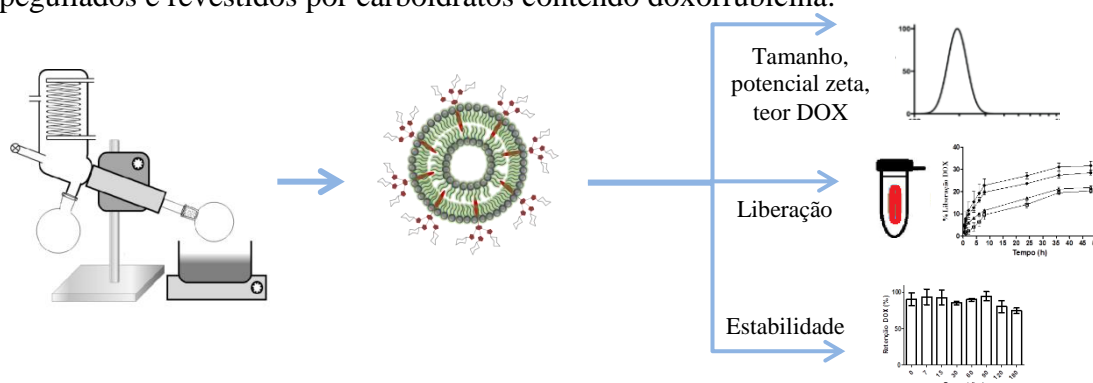
A próxima etapa do trabalho consistiu no desenvolvimento, caracterização físico-química e morfológica, estudos de estabilidade e liberação das formulações lipossomais (Figura 42).

Figura 41 – Representação esquemática dos lipossomas revestidos com carboidratos.



Os lipossomas contendo doxorrubicina apresentaram teor de encapsulação próximo a 100%, diâmetro médio de 130 nm, baixo índice de polidispersabilidade e potencial zeta negativo. Sabe-se que as estruturas neovasculares presentes no interior do tecido tumoral são geralmente desorganizadas e apresentam fenestrações de 100-600 nm de diâmetro, características que as diferenciam da vasculatura encontrada nas demais regiões do corpo. Estas condições resultam em canais que permitem a permeação de materiais nanométricos, normalmente com diâmetro menor que 200 nm. Além disso, a neovasculatura do tumor possui um sistema de drenagem linfática ineficiente, resultando na retenção e acumulação dos lipossomas por períodos prolongados de tempo (JEONG *et al.*, 2016). O índice de polidispersabilidade baixo e potencial zeta negativo também são fatores importantes no desing dos lipossomas. O primeiro, devido a uma redução no risco de obstrução dos vasos sanguíneos; o segundo, por minimizar os efeitos de agregação entre as partículas.

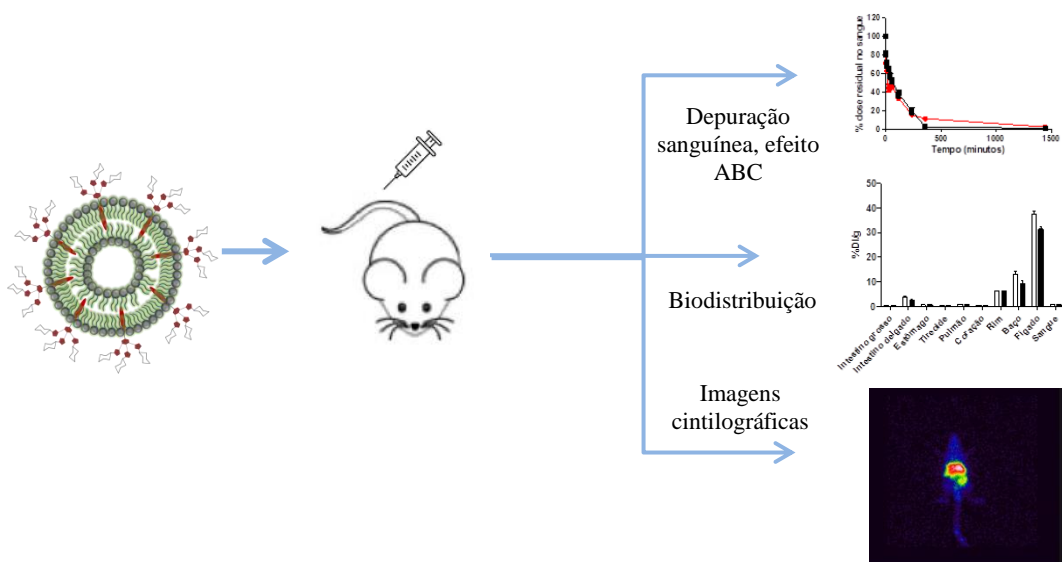
Figura 42 – Preparação, caracterização, perfil de liberação e estabilidade de lipossomas peguizados e revestidos por carboidratos contendo doxorrubicina.



Os resultados dos estudos de liberação e estabilidade de armazenamento também foram satisfatórios e mostraram que os lipossomas preparados neste trabalho possuem características adequadas para serem utilizadas no tratamento de tumores.

Em seguida, foram realizados os estudos de depuração sanguínea, avaliação do efeito ABC nos lipossomas, biodistribuição e imagens cintilográficas (Figura 43). Para viabilizar estes estudos, foi necessária a radiomarcagem dos lipossomas com tecnécio-99m. Desta forma, foi feita a síntese e incorporação do composto colesterol-DTPA nos lipossomas. Os resultados obtidos em termos de tamanho e potencial zeta não mostraram alterações nas formulações, indicando que os lipossomas mantiveram-se estáveis após o processo.

Figura 43 – Estudos de depuração sanguínea, avaliação do efeito ABC, biodistribuição e imagens cintilográficas de lipossomas peguillados e revestidos por carboidratos.



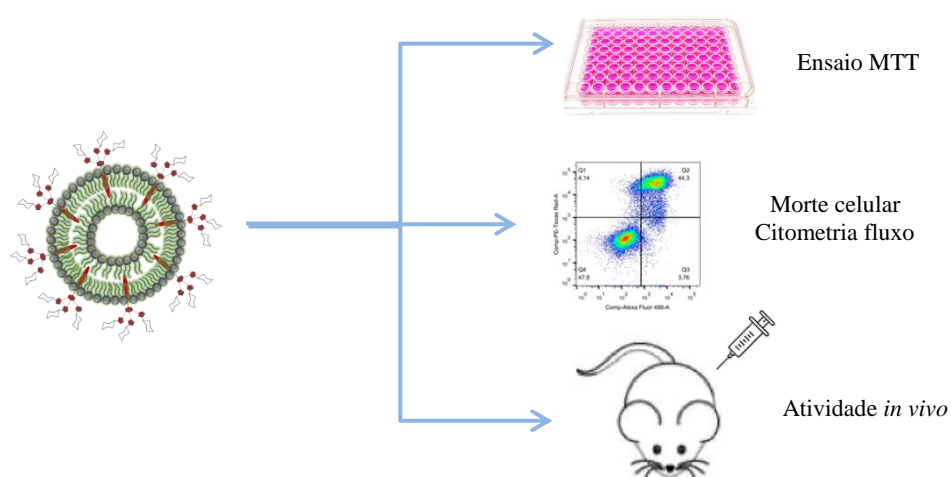
Após a radiomarcagem dos lipossomas, o tempo de meia vida das formulações foi avaliado para duas doses de lipossomas, administrados com intervalo de 7 dias. Os estudos com a primeira dose mostraram que os lipossomas contendo carboidratos apresentaram características furtivas, uma vez que o perfil de eliminação mostrou-se semelhante aos lipossomas peguillados. Vale ressaltar que os lipossomas glicosilados apresentaram $t_{1/2}$ superior aos lipossomas peguillados, indicando que este ligante pode apresentar atividade antitumoral promissora. Apenas para os lipossomas galactosilados foi observado tempo de meia vida substancialmente menor, possivelmente devido ao direcionamento hepático, revelado nos estudos de biodistribuição. Outros trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa também mostraram este direcionamento para ligantes contendo resíduos de

galactose (DE BARROS *et al.*, 2010). O resultado mostra que este componente é adequado para o tratamento de tumores presentes no fígado, uma vez que este direcionamento indica uma maior captação pelas células hepáticas, ricas em lectinas, e não somente para macrófagos, como é observado para as demais formulações.

Visando avaliar a imunogenicidade dos lipossomas glicosilados, foi realizado o estudo de depuração sanguínea de uma segunda dose das formulações, administradas 7 dias após a primeira. Apesar de não terem sido observadas diferenças nos perfis de eliminação para as formulações, inclusive as peguiladas, na qual o efeito ABC já é bem estabelecido, o estudo ainda não é conclusivo. Conforme descrito neste trabalho, diversos fatores podem influenciar na ocorrência e magnitude do efeito ABC, entre eles destacam-se o intervalo entre as doses e o modelo animal utilizado. Desta forma, novos estudos focados nestas variáveis devem ser realizados para confirmar a imunogenicidade dos lipossomas contendo carboidratos.

Na última etapa deste trabalho foram realizados os estudos de viabilidade celular *in vitro*, empregando o ensaio do MTT, e estudos da atividade antitumoral *in vivo* (Figura 44). Em ambos foi utilizado o modelo tumoral 4T1 que apresenta capacidade de metastatização semelhante ao câncer de mama humano (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Além disso, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada em mulheres e a segunda mais frequente no mundo (SIEGEL *et al.*, 2016).

Figura 44 – Estudos de *in vitro* e *in vivo* da atividade antitumoral de lipossomas peguilados e revestidos por carboidratos frente ao modelo tumoral 4T1.



Os resultados demonstraram que os lipossomas contendo carboidratos na superfície apresentaram citotoxicidade maior que os lipossomas peguilados, possivelmente devido a

melhor internalização das vesículas. O ensaio de citometria indicou que a morte celular envolve, possivelmente, mecanismos apoptóticos. Entretanto, estudos mais detalhados devem ser conduzidos para elucidar os mecanismos de morte das células tumorais.

Para o estudo da atividade antitumoral *in vivo* a formulação revestida com glicose foi selecionada, uma vez que ela apresentou os resultados mais promissores nas etapas anteriores do trabalho. A formulação peguilada também foi avaliada para possibilitar um comparativo com a formulação glicosilada. Os resultados encontrados indicaram um maior controle da progressão tumoral para a formulação contendo carboidrato, que inibiu o crescimento tumoral 1,7 vezes mais quando comparada a PegL-DOX e 2,4 vezes mais que a DOX livre. Devido ao maior tempo de meia vida, sugerimos que esta formulação se acumule de forma mais expressiva na região do tumor. Indicativos de redução da toxicidade, como aumento da sobrevida e diminuição da toxicidade cardíaca, também foram observados para esta formulação.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem claramente que os carboidratos constituem um arsenal valioso para utilização em sistemas transportadores de fármacos.

4 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram sintetizados três glicosiltriazóis inéditos, derivados de D-glicose, D-galactose e *N*-acetilglicosamina. Os compostos foram utilizados no preparo de lipossomas que apresentaram adequada estabilidade química e físico-química. O derivado CHOL-DTPA também foi sintetizado com sucesso e adicionado aos lipossomas para estudos de biodistribuição. Os estudos de depuração sanguínea e da atividade antitumoral *in vivo* indicaram que os lipossomas glicosilados apresentaram tempo de meia vida superior aos lipossomas peguilados, além de maior controle na progressão do tumor. Os estudos de biodistribuição revelaram um direcionamento preferencial para o fígado dos lipossomas galactosilados. Estes resultados iniciais mostram que a adição de carboidratos à superfície de nanoestruturas representa uma alternativa promissora para entrega e direcionamento de fármacos.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 66, 144-150, **2014**.

Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S. W.; Zarghami, N.; Hanifehpour Y.; Samiei, M.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.*, 8(1), 102, **2013**.

Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics*, 5(4), 505-515, **2008**.

Allen, T. M. The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 13(3), 285-309, **1994**.

Alvarez-Cedrón, L.; Sayalero, M. L.; Lanao, J. M. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 721, 271-278, **1999**.

Alving, C. R.; Steck, E. A.; Chapman Jr., W. L.; Waits, V. B.; Hendricks, L. D., Swartz Jr., G. M.; Hanson, W. L. Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75(6), 2959-2963, **1978**.

Auge, C.; Gautheron, C.; Pora, H. Enzymic synthesis of the sialylglycopeptide, α -D-NeupAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4N)-L-Asn. *Carbohydr. Res.*, 193, 288-293, **1989**.

Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. Synthesis and Gene Transfection Efficacies of PEI-Cholesterol-Based Lipopolymers. *Bioconjugate Chem.*, 19, 1640-1651, **2008**.

Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 13, 238-52, **1965**.

Barbosa, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Editora UFV, 1^a. Ed., **2011**.

Barros, A. L.; Mota, L. D.; Coelho, M. M.; Corrêa, N. C.; Góes, A. M.; Oliveira, M. C.; Cardoso, V. N. Bombesin Encapsulated in Long-Circulating pH-Sensitive Liposomes as a Radiotracer for Breast Tumor Identification. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 11(2), 342-50, **2015**.

Belfiore, L.; Saunders, D. N.; Ranson, M.; Thurecht, J. K.; Storm, G.; Vine, K. L. Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities. *J. Controlled Release*, 277, 1-13, **2018**.

Barenholz, Y. Doxil(R)-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*, 160(2), 117-134, **2012**.

Batista, C. M.; Carvalho, C. M. B.; Magalhães, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 43(2), 167-179, **2007**.

Bernardes, G. J.; Kikkeri, R.; Maglinao, M.; Laurino, P.; Collot, M.; Hong, S. Y.; Lepenies, B.; Seeberger, P. H. Design, synthesis and biological evaluation of carbohydrate-functionalized cyclodextrins and liposomes for hepatocyte-specific targeting. *Org Biomol Chem.*, 8(21), 4987-4896, **2010**.

Bertrand, N.; Leroux, J. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *J. Control. Release*, 161, 152-163, **2012**.

Boons, G. Liposomes modified by carbohydrate ligands can target B cells for the treatment of B-cell lymphomas. *Expert. Rev. Vaccines.*, 9(11), 1251-1256, **2010**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC n° 166, de 24 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras

providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Poder Executivo, de 25 Jul. **2017**.

Butera, A. P.; Filho, J. D. S.; Carvalho, D. T.; Figueiredo, R. C.; Faria, L. C. A.; Nunes, M. A.; Prado, M. A. F.; Alves, R. J.; Andrade, M. H. G.; Silva, K. T. S. Synthesis of amides and sulfonamides of β -D-galactopyranosylamine and β -lactosylamine and evaluation of their interactions with the lectins from *Erythrina cristagalli* and *Ricinus communis*. *Quím. Nova*, 30(5), 1267-1274, **2007**.

Caliceti, P.; Veronese, F. M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 1261-1277, **2003**.

Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47(4), 936-42, **1987**.

Carvalho, C.; Santos, R. X.; Cardoso, S.; Correia, S.; Oliveira, P. J.; Santos, M. S.; Moreira, P. I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr. Med. Chem.*, 16, 3267-3285, **2009**.

Chanan-Khan, A.; Szebeni, J.; Savay, S.; Liebes, L.; Rafique, N. M.; Alving, C. R.; Muggia, F. M. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann. Oncol.*, 14, 1430-1437, **2003**.

Chen, D.; Liu, W.; Shen, Y.; Mu, H.; Zhang, Y.; Liang, R.; Wang, A.; Sun, K.; Fu, F. Effects of a novel pH-sensitive liposome with cleavable esterase-catalyzed and pH-responsive double smart mPEG lipid derivative on ABC phenomenon. *Int. J. Nanomedicine*, 6, 2053-2061, **2011**.

Chen, J.; Son, H. N.; Hill, J.; Srinivasan, S.; Su, F. Y.; Stayton, P. S.; Convertine, A. J.; Ratne, D. M. Nanostructured glycopolymer augmented liposomes to elucidate carbohydrate-mediated targeting. *Nanomed-Nanotechnol.*, 12(7), 2031-2041, **2016**.

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. Organic chemistry. 1^a ed. Oxford: Oxford university press, **2001**.

Correa, C. R.; Barros, A. L. B.; Ferreira, C. A.; Goes, A. M.; Cardoso, V. N.; de Andrade, A. S. Aptamers directly radiolabeled with technetium-99m as a potential agent capable of identifying carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor cells T84. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24(8), 1998-2001, **2014**.

Dams, E. T. M.; Laverman, P.; Oyen, W. J. G.; Storm, G.; Scherphof, G. L.; Van Der Meer, J. W. M.; Corstens, F. H. M.; Boerman, O. C. Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292(3), 1071-1079, **2000**.

Dan, N. Effect of liposome charge and PEG polymer layer thickness on cell–liposome electrostatic interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1564, 343-348, **2002**.

Danhier, F.; Pourcelle, V.; Marchand-Brynaert, J.; Jérôme, C.; Feron, O.; Pr at, V. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles. *Methods Enzymol.*, 508, 157-175, **2012**.

De Barros, A. L.; Cardoso, V. N.; Mota, L.G.; Alves, R. J. Synthesis and biodistribution studies of carbohydrate derivatives radiolabeled with technetium-99m. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20(1), 315-317, **2010**.

De Barros, A. L. B.; Ferraz, K. S. O.; Dantas, T. C. S.; Andrade, G. F.; Cardoso, V. N.; De Sousa, E. M. B. Synthesis, characterization, and biodistribution studies of ^{99m}Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles. *Materials Science and Engineering C.* 56, 181-188, **2015**.

Driscoll, D. F. Lipid injectable emulsions: 2006. *Nutr. Clin. Pract.* 21, 381-386, **2006**.

El-Moselhy, M. A.; El-Sheikh, A. A. Protective mechanisms of atorvastatin against doxorubicin-induced hepato-renal toxicity. *Biomed Pharmacother.* 68(1), 101-110, **2014**.

El-Ashmawy, N. E.; Khedr, E. G.; Ebeid, E. M.; Salem, M. L.; Mosalam, E. M.; Zidan, A. A. Loading of doxorubicin and thymoquinone with F2 gel nanofibers improves the antitumor activity and ameliorates doxorubicin-associated nephrotoxicity. *Life Sci.* 207, 461-470, **2018**.

Fernandes, R. S.; Silva, J. O.; Monteiro, L. O. F.; Leite, E. A.; Cassali, G. D.; Rubello, D.; Cardoso, V. N.; Ferreira, L. A. M.; Oliveira, M. C.; de Barros, A. L. B. Doxorubicin-loaded nanocarriers: A comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* 84, 252-257, **2016**.

Ferreira, V. F. Alguns aspectos sobre a secagem dos principais solventes orgânicos. *Quim. Nova*, 15, 348-350, **1992**.

Figueiredo, R. C.; Meyer, N. B.; Prado, M. A. F.; Alves, R. J. Síntese de β -D-galactopiranosídeos de arila diméricos para avaliação de sua interação com a lectina de *Erythrina cristagalli*. *Quim. Nova*, 32(8), 2128-2132, **2009**.

Franco, L. L. Síntese de N-glicosilssulfonamidas, de Aza-açúcares Derivados de N-Acetilglicosamina e D-Glicose e Tentativa de síntese de inibidores potenciais de quitinases. Tese doutorado. Belo Horizonte, **2015**.

Franco, L. L.; Brandão, M. C.; Filho, J. D. S.; Alves, R. J. Síntese de N-glicosilsulfanamidas derivadas de D-glicose e N-acetilglicosamina. *Quim. Nova*, 38(8), 1044-1052, **2015**.

Freitas, L. B. O.; Ruela, F. A.; Pereira, G. R.; Alves, R. B.; Freitas, R. P. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Quim. Nova*, 34(10), 1791-1804, **2011**.

Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quím. Nova*, 28(3), 511-518, **2005**.

Fukuda, T.; Matsumoto, E.; Onogi, S.; Miura, Y. Aggregation of Alzheimer Amyloid β Peptide (1-42) on the Multivalent Sulfonated Sugar Interface. *Bioconjugate Chem.*, 21, 1079-1086, **2010**.

Fuscaldi, L. L.; dos Santos, D. M.; Pinheiro, N. G. S.; Araújo, R. S.; de Barros, A. L. B.; Resende, J. M.; Fernandes, S. O. A.; Lima, M. E.; Cardoso, V. N. Synthesis and antimicrobial evaluation of two peptide LyeTx I derivatives modified with the chelating agent HYNIC for radiolabeling with technetium-99m. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 22, 1-8, **2016**.

Gabizon, A.; Papahadjopoulos, D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 6949-6953, **1988**.

Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Grenader, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45, 388-398, **2012**.

Ghazarian, H.; Idoni, B.; Oppenheimer, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.*, 113, 236-247, **2011**.

Gholap, A. R.; Venkatesan, K.; Daniel, T.; Lahoti, R. J.; Srinivasan, K. V. Ultrasound promoted acetylation of alcohols in room temperature ionic liquid under ambient conditions. *Green Chem.*, 5, 693-696, **2003**.

Green, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Anal. Chem. News & Features*, 68, 305A-309A, **1996**.

Gregoriadis, G.; Ryman, B. E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem. J.*, 124(5), 58, **1971**.

Heidlas, J. E.; Lees, W. J.; Pale, P.; Whitesides, G. M. Gram-Scale Synthesis of Uridine 5'-Diphospho-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc: Comparison of Enzymatic and Chemical Routes. *J. Org. Chem.* 57, 146-151, **1992**.

ICH. Steering Committee. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2(R1), **2005**.

Immordino, M. L.; Dosio, F; Cattel, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine*, 1(3), 297-315, **2006**.

Ishida, T.; Atobe, K.; Wang, X.; Kiwada, H. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes upon repeated injections: Effect of doxorubicin-encapsulation and high-dose first injection. *J. Control. Release*, 115, 251-258, **2006a**.

Ishida, T.; Harada, M.; Wang, X. Y.; Ichihara, M.; Irimura, K.; Kiwada, H. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. *J. Control. Release*. 105, 305-317, **2005**.

Ishida, T.; Ichihara, M.; Wang, X.; Kiwada, H. Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, 115, 243-250, **2006b**.

Ishida, T.; Ichihara, M.; Wang, X.; Yamamoto, K.; Kimura, J.; Majima, E.; Kiwada, H. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, 112, 15-25, **2006c**.

Ishida, T.; Masuda, K.; Ichikawa, T.; Ichihara, M.; Irimura, K.; Kiwada, H. Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int. J. Pharm.*, 255, 167-174, **2003**.

Ishihara, T.; Takeda, M.; Sakamoto, H.; Kimoto, A.; Kobayashi, C.; Takasaki, N.; Yuki, K.; Tanaka, K.; Takenaga, M.; Igarashi, R.; Maeda, T.; Yamakawa, N.; Okamoto, Y.; Otsuka, M.; Ishida, T.; Kiwada, H.; Mizushima, Y.; Mizushima, T. Accelerated blood clearance

phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharmaceut. Res.*, 26(10), 2270-2279, **2009**.

Jacevic, V.; Djordjevic, A.; Srdjenovic, B.; Milic-Tores, M.; Segrt, Z.; Dragojevic-Simic, V.; Kuca, K. Fullerenol nanoparticles prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity in rats. *Exp. Mol. Patholog.*, 102(2), 360-369, **2017**.

Jebali, A.; Nayeri, E. K.; Roohana, S.; Aghaei, S.; Ghaffari, M.; Daliri, K.; Fuente, G. Nano-carbohydrates: Synthesis and application in genetics, biotechnology, and medicine. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 240, 1-14, **2017**.

Jeong, K.; Kang, C. S.; Kim, Y.; Lee, Y. D.; Kwon, I. C.; Kim, S. Development of highly efficient nanocarrier-mediated delivery approaches for cancer therapy. *Cancer Lett.*, 374(1), 31-43, **2016**.

Johnstone, K. D.; Dieckelmann, M.; Jennings, M. P.; Toth, I.; Blanchfield, J. T. Chemo-Enzymatic Synthesis of a Trisaccharide-Linked Peptide Aimed at Improved Drug-Delivery. *Curr. Drug Deliv.*, 2, 215-222, **2005**.

Kabayama, M. A.; Patterson, D. The thermodynamics of mutarotation of some sugars: II. Theoretical considerations. *Can. J. Chem.*, 36(3), 563-573, **1958**.

Kan, P.; Tsao, C.; Wang, A.; SU, W.; Liang, H. A liposomal formulation able to incorporate a high content of paclitaxel and exert promising anticancer effect. *J. Drug Deliv.*, 2011, 1-9, **2011**.

Kierstead, P. H.; Okochi, H.; Venditto, V. J.; Chuong, T. C.; Kivimae, S.; Fréchet, J. M. J.; Szoka, F. C. The Effect of Polymer Backbone Chemistry on the Induction of the Accelerated Blood Clearance in Polymer Modified Liposomes. *J. Control Release*, 213, 1-9, **2015**.

Kizek, R.; Adam, V.; Hrabeta, J.; Eckschlager, T.; Smutny, S.; Burda, J. V.; Frei, E.; Stiborova, M. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol. Ther.*, 133, 26-39, **2012**.

Koide, H.; Asai, T.; Hatanaka, K.; Akai, S.; Ishii, T.; Kenjo, E.; Ishida, T.; Kiwada, H.; Tsukada, H.; Oku, N. T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. Pharm.*, 392, 218-223, **2010**.

Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; van Oers, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84(5), 1415-1420, **1994**.

Koudelka, S.; Turanek, J. Liposomal paclitaxel formulations. *J. Control. Release*, 163, 322-334, **2012**.

Krishnan, B. P.; Sureshan, K. M. A Spontaneous Single Crystal to Single Crystal Polymorphic Transition Involving Major Packing Changes. *J. Am. Chem. Soc.*, 137(4), 1692-1696, **2015**.

Kushwaha, D.; Tiwari V. K, Click Chemistry Inspired Synthesis of Glycoporphyrin Dendrimers. *J. Org. Chem.*, 78, 8184-8190, **2013**.

Laverman, P.; Carstens, M. G.; Boerman, O. C.; Dams, E. T. M.; Oyen, W. J. G.; Rooijen, N. V.; Corstens, F. H. M.; Storm, G. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298(2), 607-612, **2001**.

Lehner, R.; Wang, X.; Marsch, S; Hunziker, P. Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine*, 9, 742-757, **2013**.

Leong, W. L.; Vittal, J. J. Synthesis, characterization and structures of copper(II) complexes containing carboxylate and sulfonate groups. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 71(3), 557-56, **2011**.

Li, C.; Cao, J.; Wang, Y.; Zhao, X.; Deng, C.; Wei, N.; Yang, J.; Cui, J. Accelerated blood clearance of pegylated liposomal topotecan: influence of polyethylene glycol grafting density and animal species. *J. Pharm. Sci.*, 101, 3864-3876, **2012**.

Li, C.; Zhao, X.; Wang, Y.; Yang, H.; Li, H.; Li, H.; Tian, W.; Yang, J.; Cui, J. Prolongation of time interval between doses could eliminate accelerated blood clearance phenomenon induced by pegylated liposomal topotecan. *Int. J. Pharm.*, 443, 17-25, **2013**.

Lila, A. S. S.; Kiwada, H.; Ishida, T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *J. Controlled Release*, 172, 38-47, **2013**.

Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60(12), 1347-1370, **2008**.

Liu, Y.; Ji, M.; Wong, M. K.; Joo, K. I.; Wang, P. Enhanced Therapeutic Efficacy of iRGD-Conjugated Crosslinked Multilayer Liposomes for Drug Delivery. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1-13, **2013**.

Liu, D.; Mori, A.; Huang, L. Large liposomes containing ganglioside GM1 accumulate effectively in spleen. *Biochim. Biophys. Acta*, 1066(2), 159-165, **1991**.

Lu, W.; Wan, J.; She, Z.; Jiang, X. Brain delivery property and accelerated blood clearance of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle. *J. Control. Release*, 118, 38-53, **2007**.

Martina, M. S.; Nicolas, V.; Wilhelm, C.; Ménager, C.; Barratt, G.; Lesieur, S. The *in vitro* kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages. *Biomaterials*. 28, 4143-4153, **2007**.

Maruyama, K.; Okamoto, A.; Ishida, O.; Kojima, S.; Suginaka, A.; Huang, L.; Iwatsuru, M. Biodistribution and Antitumor Effect of Adriamycin Encapsulated in Long-Circulating Liposomes Containing Amphipathic Polyethylene Glycol or Ganglioside GM1. *J. Liposome Res.*, 4(1), 701-723, **1994**.

Metselaar, J. M.; Bruin, P.; Boer, L. W. T.; Vringer, T.; Snel, C.; Oussoren, C.; Wauben, M. H. M.; Crommelin, D. J. A.; Storm, G.; Hennink, W. E. A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating

liposomes with effective drug-targeting capacity. *Bioconjugate Chem.*, 14(6), 1156-1164, **2003**.

Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56(2), 185-229, **2004**.

Monegal, A.; Planas, A. Chemical Rescue of α 3-Galactosyltransferase. Implications in the Mechanism of Retaining Glycosyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(50), 16030-16031, **2006**.

Mostafa, M.; Nahar, N.; Mosihuzzaman, M.; Sokeng, S. D.; Fatima, N.; Atta-Ur-Rahman; Choudhary, M. I. Phosphodiesterase-I inhibitor quinovic acid glycosides from *Bridelia ndellensis*. *Nat. Prod. Res.*, 20(7), 686-692, **2006**.

Nakamura, T.; Ueda, Y.; Juan, Y.; Katsuda, S.; Takahashi, H.; Koh, E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: in vivo study. *Circulation*. 102, 572-578, **2000**.

Nikolaeva, I. A.; Morozova, J. V.; Zavialova, M. G.; Novikov, R. A.; Tkachev, Y. V.; Timofeev, V. P.; Misharin, A. Y.; Ponomarev, G. V. Natural chlorins modified with cholesterol moiety. Synthesis, characteristics, copper complexes, and entrapping in phospholipid vesicles. *Macroheterocycles*, 3(2-3), 150-156, **2010**.

Nogueira, E.; Gomes, A. C.; Preto, A.; Cavaco-Paulo, A. Design of liposomal formulations for cell targeting. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 136, 514-526, **2015**.

Oda, C. M. R.; Fernandes, R. S.; de Araújo Lopes, S. C.; de Oliveira, M. C.; Cardoso, V. N.; Santos, D. M.; de Castro Pimenta, A. M.; Malachias, A.; Paniago, R.; Townsend, D. M.; Colletti, P. M.; Rubello, D.; Alves, R. J.; de Barros, A. L. B.; Leite, E. A. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. *Biomed. Pharmacother.* 89, 268-275, **2017**.

Pain, D.; Das, P. K.; Ghosh, P.; Bachhawat, B. K. Increased circulatory half-life of liposomes after conjunction with dextran. *J. Biosc.*, 6(6), 811-816, **1984**.

Park, J. G.; Kramer, B. S.; Steinberg, S. M.; Carmichael, J.; Collins, J. M.; Minna, J. D.; Gazdar, A. F. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* 47(22), 5875-5879, **1987**.

Pattni, B. S.; Chupin, V. V.; Torchilin, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem. Rev.*, 115(19), 10938-10966, **2015**.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. Introdução à espectroscopia. 4ª ed., São Paulo, Cengage Learning, 700 p., **2010**.

Percec, V.; Glodde, M.; Peterca, M.; Rapp, A.; Schnell, I.; Spiess, H. W.; Bera, T. K.; Miura, Y.; Balagurusamy, V. S. K.; Aqad, E.; Heiney, P. A. Self-assembly of semifluorinated dendrons attached to electron-donor groups mediates their π -stacking via a helical pyramidal column. *Chem. Eur. J.*, 12(24), 6298-6314, **2006**.

Petersen, A. L.; Hansen, A. E.; Gabizon, A.; Andresen, T. L. Liposome imaging agents in personalized medicine. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 64, 1417-1435, **2012**.

Pétursson, S. Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry. *J. Chem. Educ.*, 74(11), 1297-1303, **1997**.

Pulaski, B. A.; Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 20 (20.2), **2001**.

Renu, K.; Abilash, V. G.; Tirupathi Pichiah, P. B.; Arunachalam, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur. J. Pharmacol.* 818, 241-253, **2018**.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quím. Nova*, 27(5), 771-780, **2004**.

Rizea, S. C.; Ionescu, C.; Barragan-Montero, V.; Neamtu, J. Characterization of a tosylated cholesteryl derivative. *Curr. Health Sci. J.*, 38(4), 183-187, **2012**.

Saad, Y.S.; Najjar, A. T.; Al-Rikabi, A. C. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol. Res.* 43, 211-218, **2001**.

Safra, T. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Oncologist*, 8(2), 17-24, **2003**.

Sagrístá, M. L.; Mora, M.; Madariaga, M. A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 5, 19-33, **2000**.

Saha, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. New York, EUA, Springer. 6, **2010**. 427 p.

Saltão, R.; Veiga, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 37, 1-17, **2001**.

Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quim. Nova*, 25, 1181-1185, **2002**.

Scheinberg, D. A.; Villa, C. H.; Escorcia, F. E; Mcdevitt, M. R. Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 7, 266-276, **2010**.

Sen, K.; Mandal, M. Second generation liposomal cancer therapeutics: transition from laboratory to clinic. *Int. J. Pharm.*, 448(1), 28-43, **2013**.

Sessa, G.; Weissmann, G. Incorporation of lysozyme into liposomes. *J. Biol. Chem.*, 245(13), 3295-3301, **1970**.

Sharma, A., Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, 154, 123-140, **1997**.

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 66, 7-30, **2016**.

Silindir-Gunay, M.; Ozer, A. Y. Liposomes and micelles as nanocarriers for diagnostic and imaging purposes. *Design of Nanostructures for Theranostics Applications.* 305-340, **2018**.

Silva, A. T. M.; Maia, A. L. C.; Silva, J. O.; de Barros, A. L. B.; Soares, D. C. F.; de Magalhães, M. T. Q.; Alves, R. J.; Ramaldes, G. A. Synthesis of cholesterol-based neoglycoconjugates and their use in the preparation of liposomes for active liver targeting. *Carbohydr. Res.* 465, 52-57, **2018a**.

Silva, J. O.; Miranda, S. E. M.; Leite, E. A.; Sabino, A. P., Borges, K. B. G.; Cardoso, V. N.; Cassali, G. D.; Guimarães, A. G.; Oliveira, M. C.; Barros, A. L. B. Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 352, 162-169, **2018b**.

Soares, D. C. F.; Cardoso, V. N.; Barros, A. L. B.; Souza, C. M.; Cassali, G. D.; Oliveira, M. C.; Ramaldes, G. A. Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing ¹⁵⁹Gd-DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45, 58-64, **2012**.

Soares, D. C. F.; Oliveira, M. C.; Barros, A. L. B.; Cardoso, V. N.; Ramaldes, G. A. Liposomes radiolabeled with (159)Gd: in vitro antitumoral activity, biodistribution study and scintigraphic image in Ehrlich tumor bearing mice. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 43, 290-296, **2011**.

Soundararajan, A.; Bao, A.; Phillips, W. T.; Perez III, R.; Goins, B. A. [¹⁸⁶Re]Liposomal doxorubicin (Doxil): in vitro stability, pharmacokinetics, imaging and biodistribution in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model. *Nucl. Med. Biol.*, 36, 515-524, **2009**.

Souza, C. M. Carcinoma Mamário Murino 4T1: Características Morfológicas, Imunofenotípicas, Bioquímicas e Ensaio Pré-Clínicos com Talidomida/ Carboplatina. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte Faculdade de Medicina - UFMG, **2013**.

Srivastava, S. C.; Meinken, G.; Smith, T. D.; Richards, P. Problems associated with stannous ^{99m}Tc- radiopharmaceuticals. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 28 (1-2), 83-95, **1977**.

Steichen, S. D.; Caldorera-Moore, M.; Peppas, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48, 416-427, **2013**.

Sun, Q.; Cai, S.; Peterson, B. R. Practical synthesis of 3β-amino-5-cholestene and related 3β-halides involving i-steroid and retro-i-steroid rearrangements. *Org. Lett.*, 11(3), 567-570, **2009**.

Sunamoto, J. Application of polysaccharide-coated liposomes in chemotherapy and immunotherapy. *Medical Applications of Liposomes*, Japan Scientific Society Press, Tokyo; Karger, Basel, 121-131, **1986**.

Suzuki, T.; Ichihara, M.; Hyodo, K.; Yamamoto, E.; Ishida, T.; Kiwada, H.; Ishihara, H.; Kikuchi, H. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes containing doxorubicin upon repeated administration to dogs. *Int. J. Pharm.*, 436, 636-643, **2012**.

Suzuki, T.; Ichihara, M.; Hyodo, K.; Yamamoto, E.; Ishida, T.; Kiwada, H.; Kikuchi, H.; Ishihara, H. Influence of dose and animal species on accelerated blood clearance of PEGylated liposomal doxorubicin. *Int. J. Pharm.*, 476, 205-212, **2014**.

Szebeni, J., F. Muggia, and Y. Barenholz. Case Study: Complement Activation Related Hypersensitivity Reactions to PEGylated Liposomal Doxorubicin? Experimental and Clinical Evidence, Mechanisms and Approaches to Inhibition. *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials*. 331-361, **2016**.

Swierczewska, M.; Han, H. S.; Kim, K.; Park, J. H.; Lee, S. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99, 70-84, **2016**.

Takemura, G.; Fujiwara, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49, 330-352, **2007**.

Takeuchi, H.; Kojima, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats. *J. Control. Release*, 75, 83-91, **2001**.

Tang, H.; Zhang, J.; Tang, J.; Shen, Y.; Guo, W.; Zhou, M.; Wang, R.; Jiang, N.; Gan, Z.; Yu, Q. Tumor specific and renal excretable star-like tri-block polymer doxorubicin conjugates for safe and efficient anticancer therapy. *Biomacromolecules*. 19(7), 2849-2862, **2018**.

Theek, B.; Rizzo, L. Y.; Ehling, J.; Kiessling, F.; Lammers, T. The Theranostic Path to Personalized Nanomedicine. *Clin. Transl. Imaging*. 2(1), 66-76, **2014**.

Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov*, 4, 145-160, **2005**.

Torchilin, V. P.; Levchenko, T. S.; Whiteman, K. R.; Yaroslavov, A. A.; Tsatsakis, A. M.; Rizos, A. K.; Michailova, E. V.; Shtilman, M. I. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification. *Biomaterials*, 22, 3035-3044, **2001**.

The United States Pharmacopeial Convention, USP 36 NF 31. General Chapter (729) *Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsions*, **2013**.

Ueki, A.; Un, K.; Mino, Y.; Yoshida, M.; Kawakami, S.; Ando, H.; Ishida, H.; Yamashita, F.; Hashida, M. Kiso, M. Synthesis and evaluation of glyco-coated liposomes as drug carriers for active targeting in drug delivery systems. *Carbohydr. Res.*, 405, 78-86, **2015**.

Ueno, M.; Kakinuma, Y.; Yuhki, K.; Murakoshi, N.; Iemitsu, M.; Miyauchi, T.; Yamaguchi, I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 151-158, **2006**.

Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*. 184(1), 39-51, **1995**.

Xu, H.; Deng, Y.; Chen, D.; Hong, W.; Lu, Y.; Dong, X. Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable PEG-lipid derivatives. *J. Control. Release*, 130, 238-245, **2008**.

Xu, H.; Wang, K. Q.; Deng, Y. H.; Chen, D. W. Effects of cleavable PEG-cholesterol derivatives on the accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *Biomaterials*, 31, 4757-4763, **2010**.

Wang, X.; Ishida, T.; Kiwada, H. Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*. 119, 236-244, **2007**.

Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, **2009**.

Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control Release.*, 200, 138-157, **2015**.

Williams, D. B. G.; Lawton, M. Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccant. *J. Org. Chem.*, 75(24), 8351-8354, **2010**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014. WHO: Geneva, Switzerland, 280p., **2018**.

Worrel, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*, 340, 457-460, **2013**.

Yang, Y.; Yang, Y.; Xie, X.; Cai, X.; Zhang, H.; Gong, W.; Wang, Z.; Mei, X. PEGylated liposomes with NGR ligand and heat-activable cell-penetrating peptide-doxorubicin conjugate for tumor-specific therapy. *Biomaterials*, 35, 4368-4381, **2014**.

Zhang, S.; Zhao, Y. Controlled Release from Cleavable Polymerized Liposomes upon Redox and pH Stimulation. *Bioconjugate Chem.*, 22(4), 523-528, **2011**.

Zordoky, B. N.; Anwar-Mohamed, A.; Aboutabl, M. E.; El-Kad, A. O. Acute doxorubicin cardiotoxicity alters cardiac cytochrome P450 expression and rachidonic acid metabolism in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 38-46, **2010**.

Anexo A

Espectros dos Capítulos I e III

Figura A.1 – Espectro de absorção na região do IV do 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de metila (2).

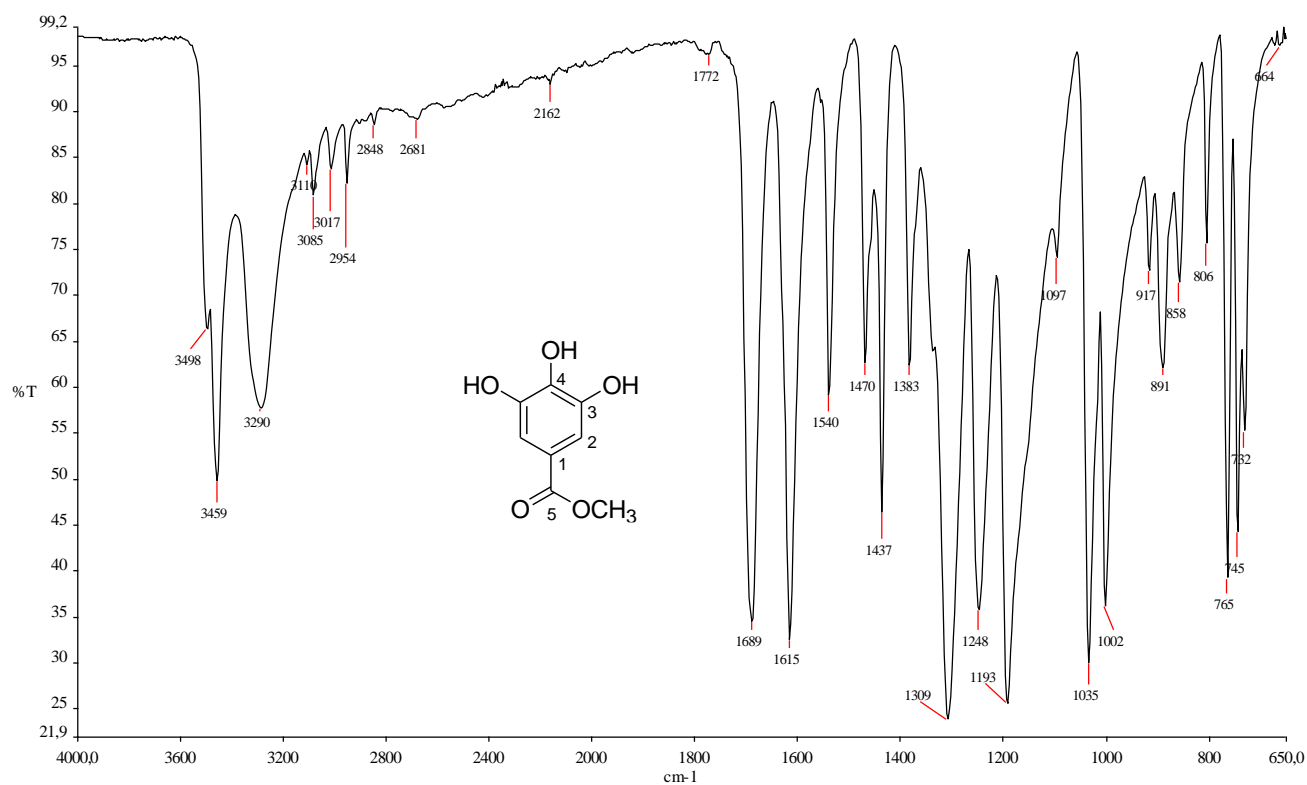


Figura A.2 – Espectro de absorção na região do IV de 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoato de metila (3).

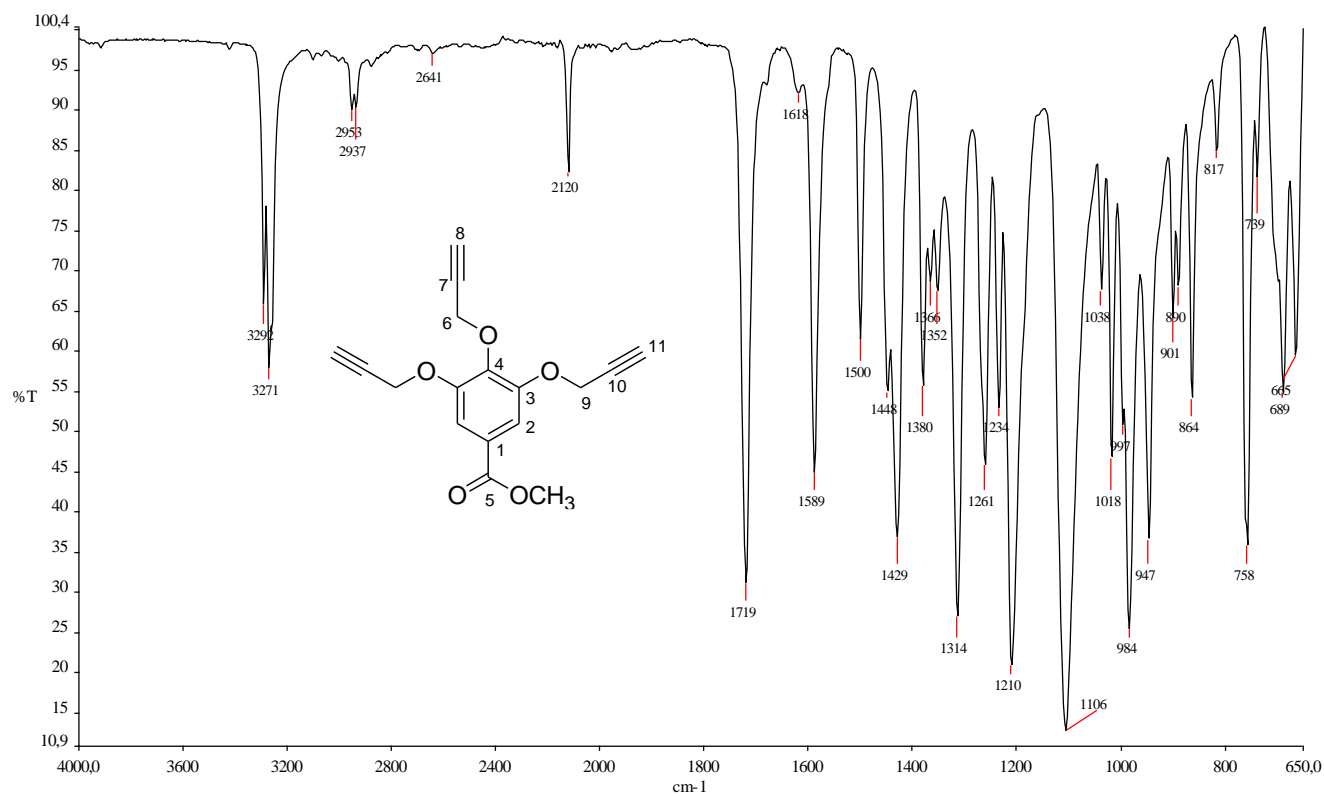


Figura A.3 – Espectro de absorção na região do IV do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (**4**).

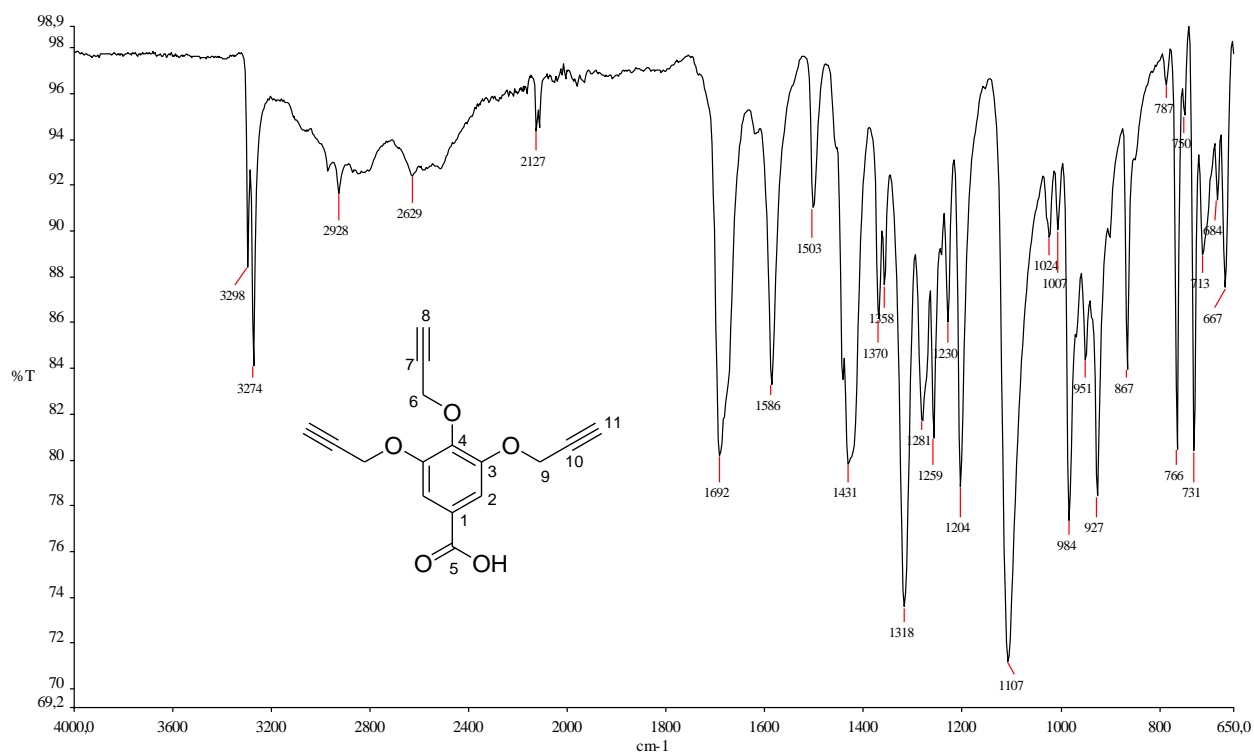


Figura A.4 – Espectro de RMN de ^1H do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (**4**) (200 MHz, acetona- d_6).

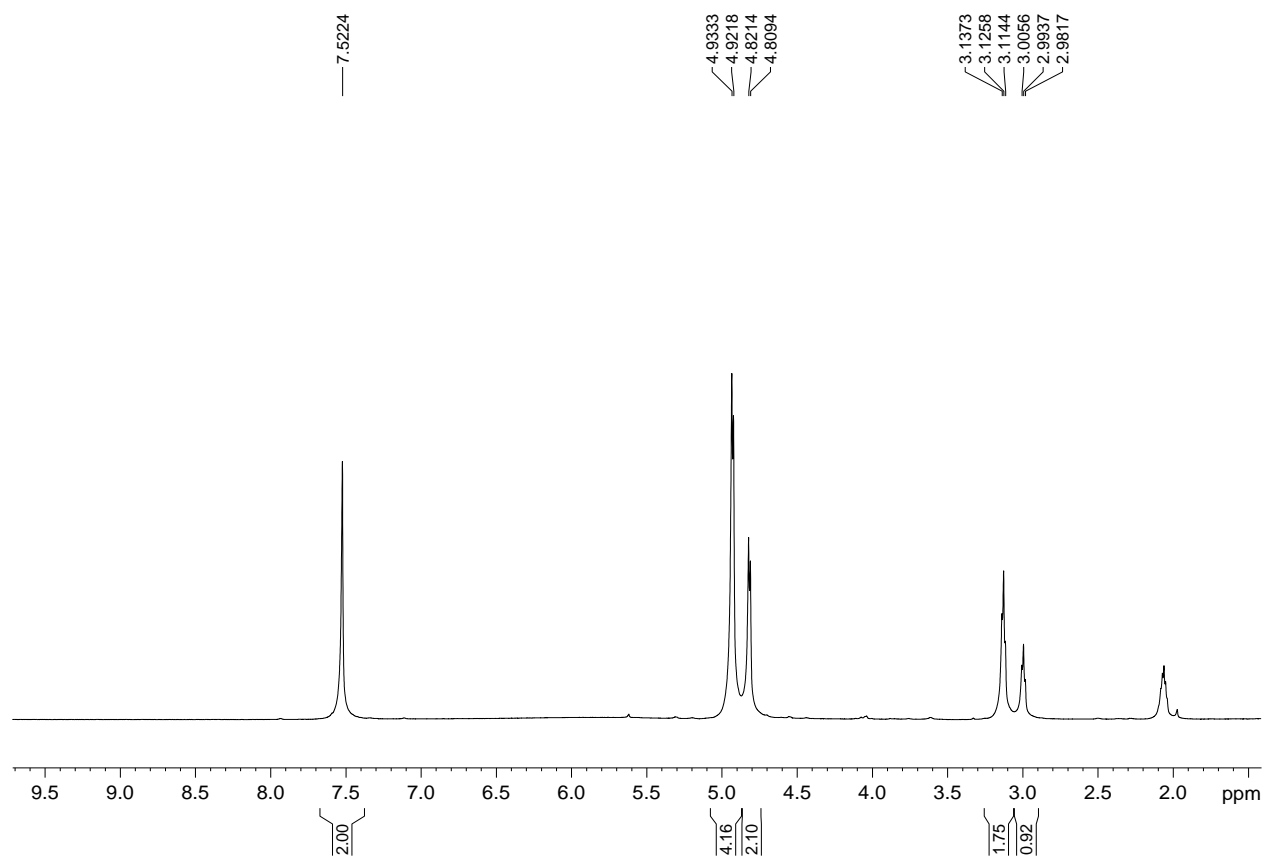


Figura A.5 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (**4**) (50 MHz, acetona- d_6).

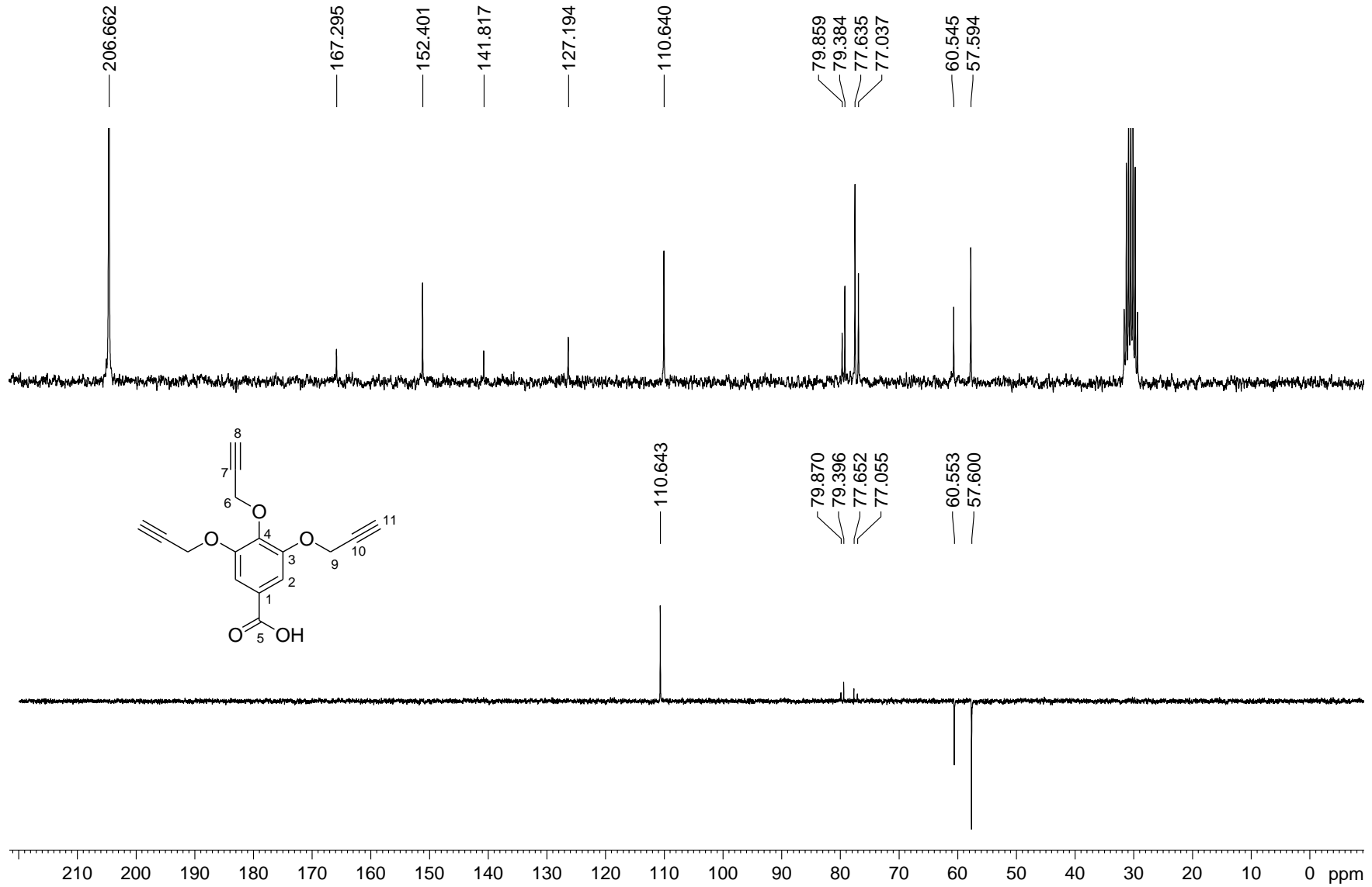


Figura A.6 – Espectro de massas (ESI) do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (**4**).

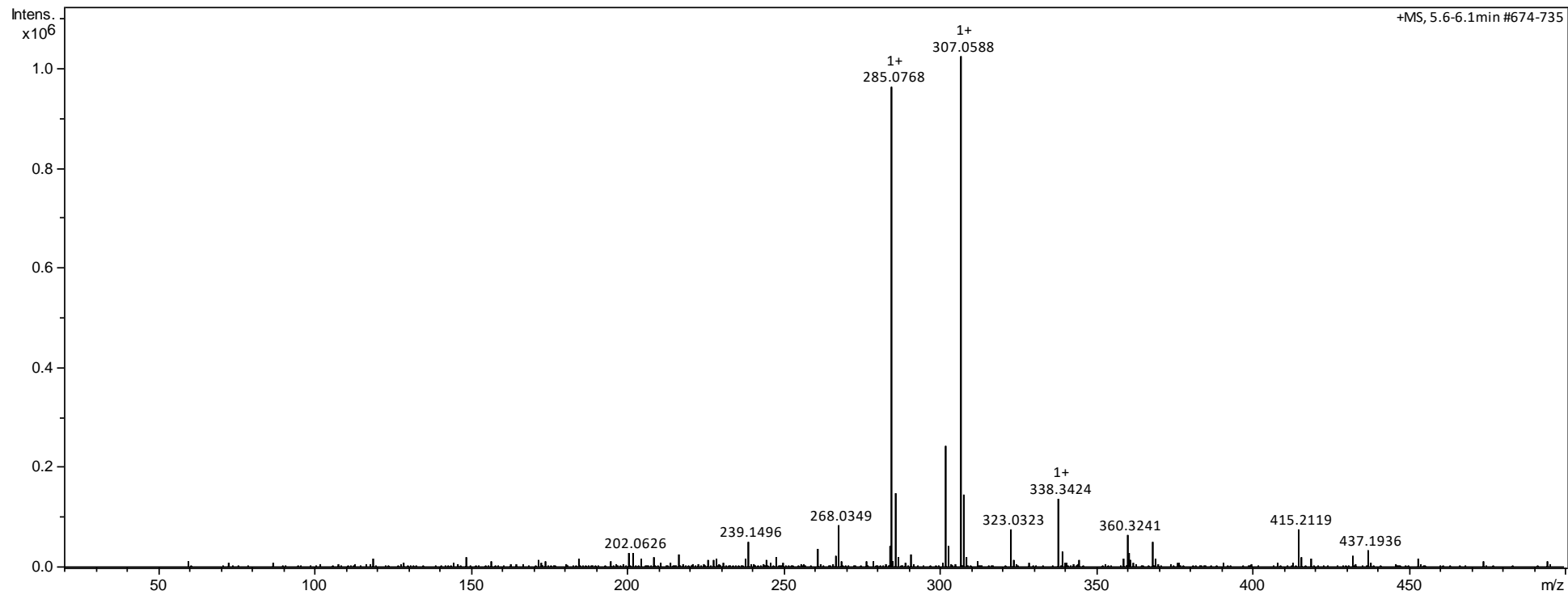


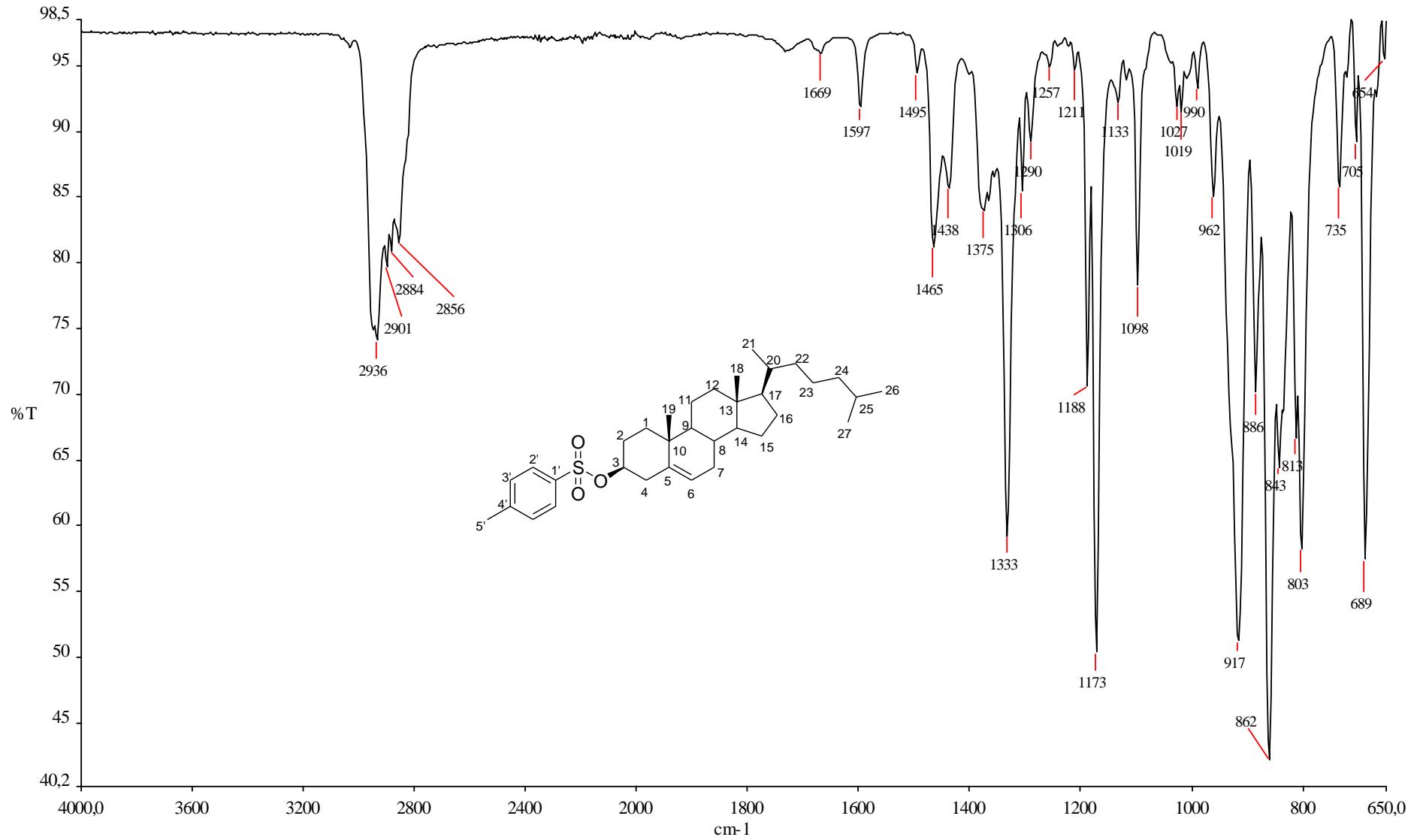
Figura A.7 – Espectro de absorção na região do IV de 3- β -[(*p*-toluenossulfonil)oxi]colest-5-eno (**6**).

Figura A.8 – Espectro de RMN de ^1H de 3- β -[(*p*-toluenossulfonyl)oxi]colest-5-eno (**6**) (400 MHz, CDCl_3).

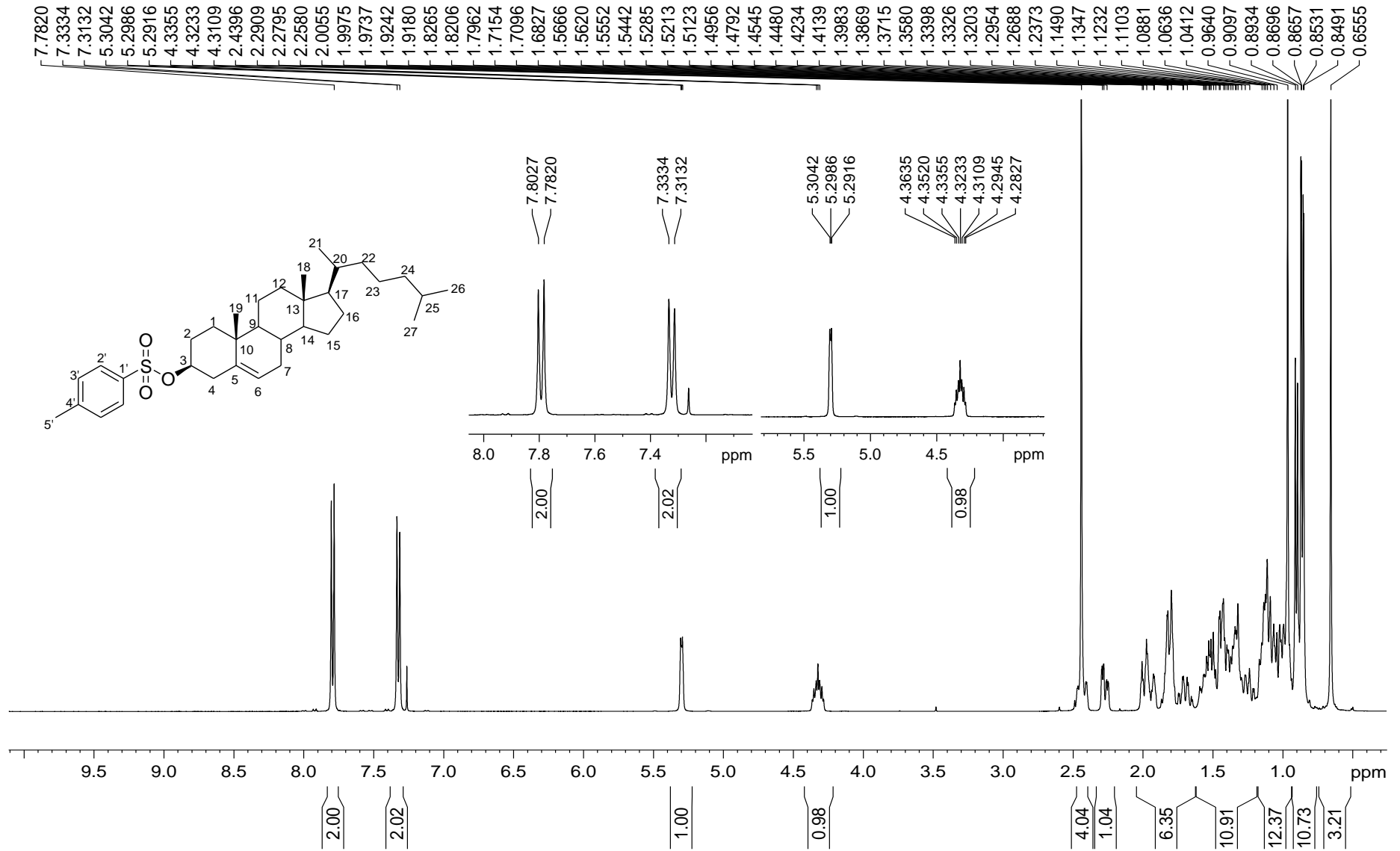


Figura A.9 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de 3- β -[*p*-toluenossulfonil]oxi]colest-5-eno (**6**) (100 MHz, CDCl_3).

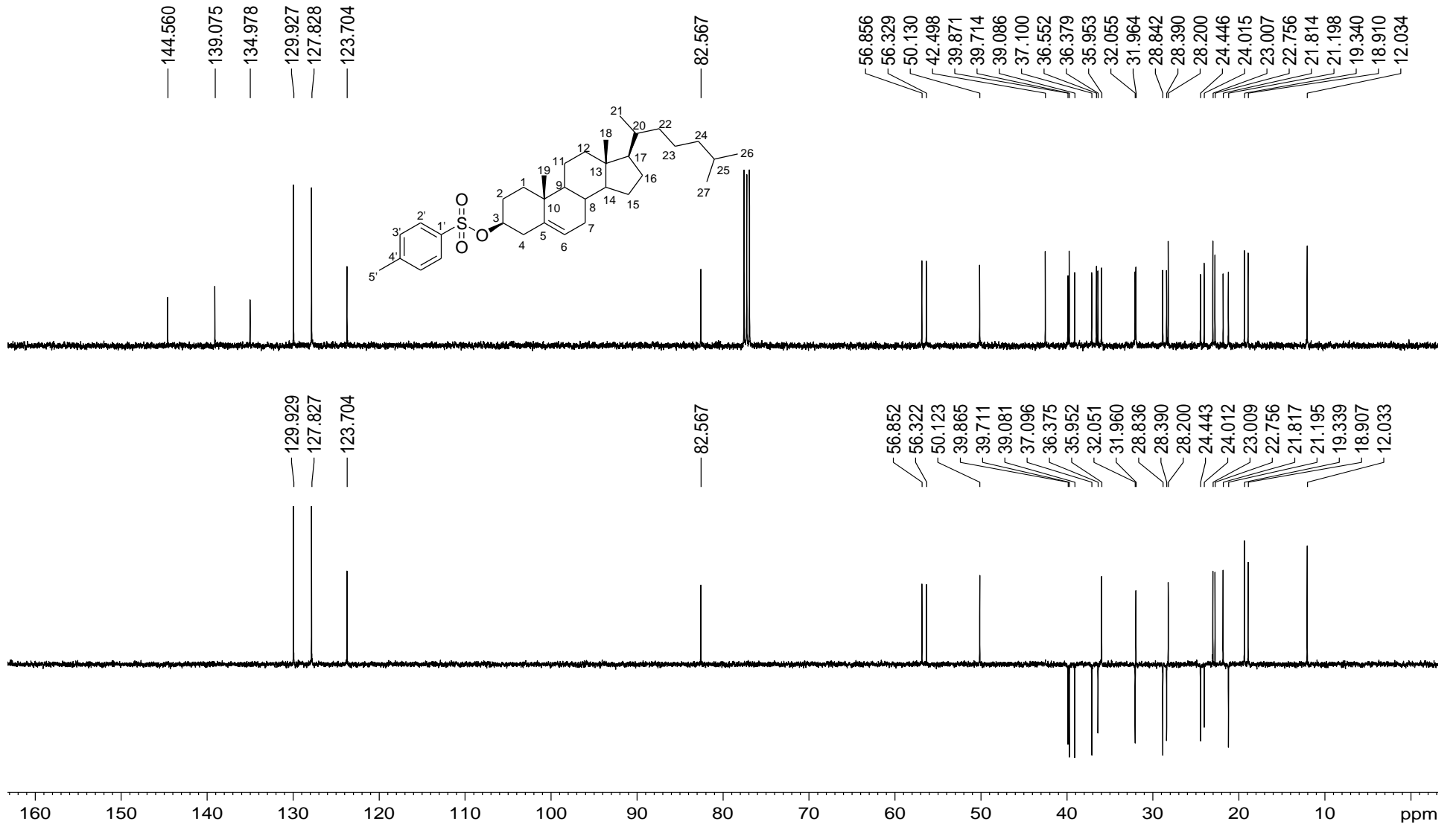


Figura A.10 – Espectro de absorção na região do IV de 3- β -[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (7).

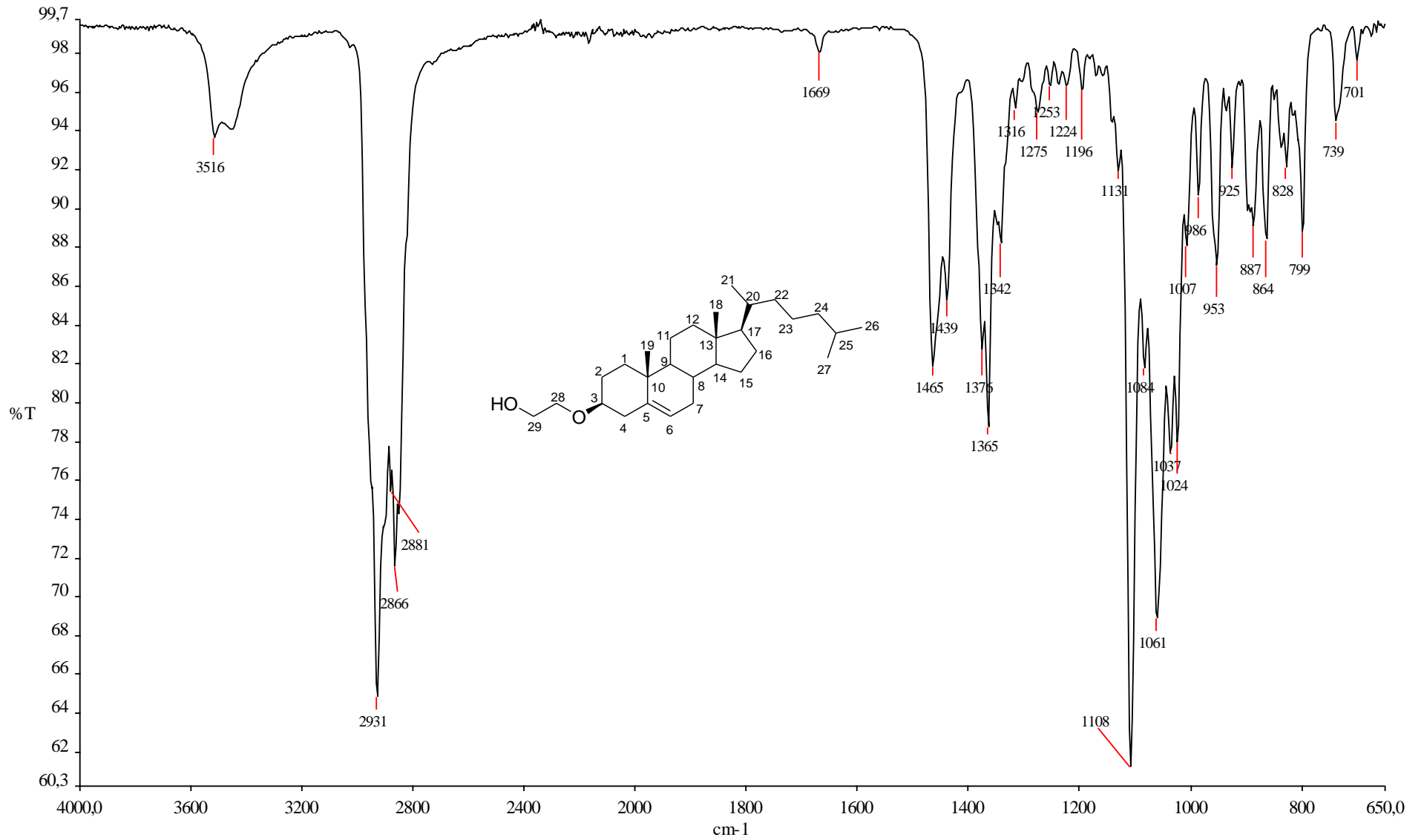


Figura A.11 – Espectro de RMN de ^1H de 3- β -[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (**7**) (400 MHz, CDCl_3).

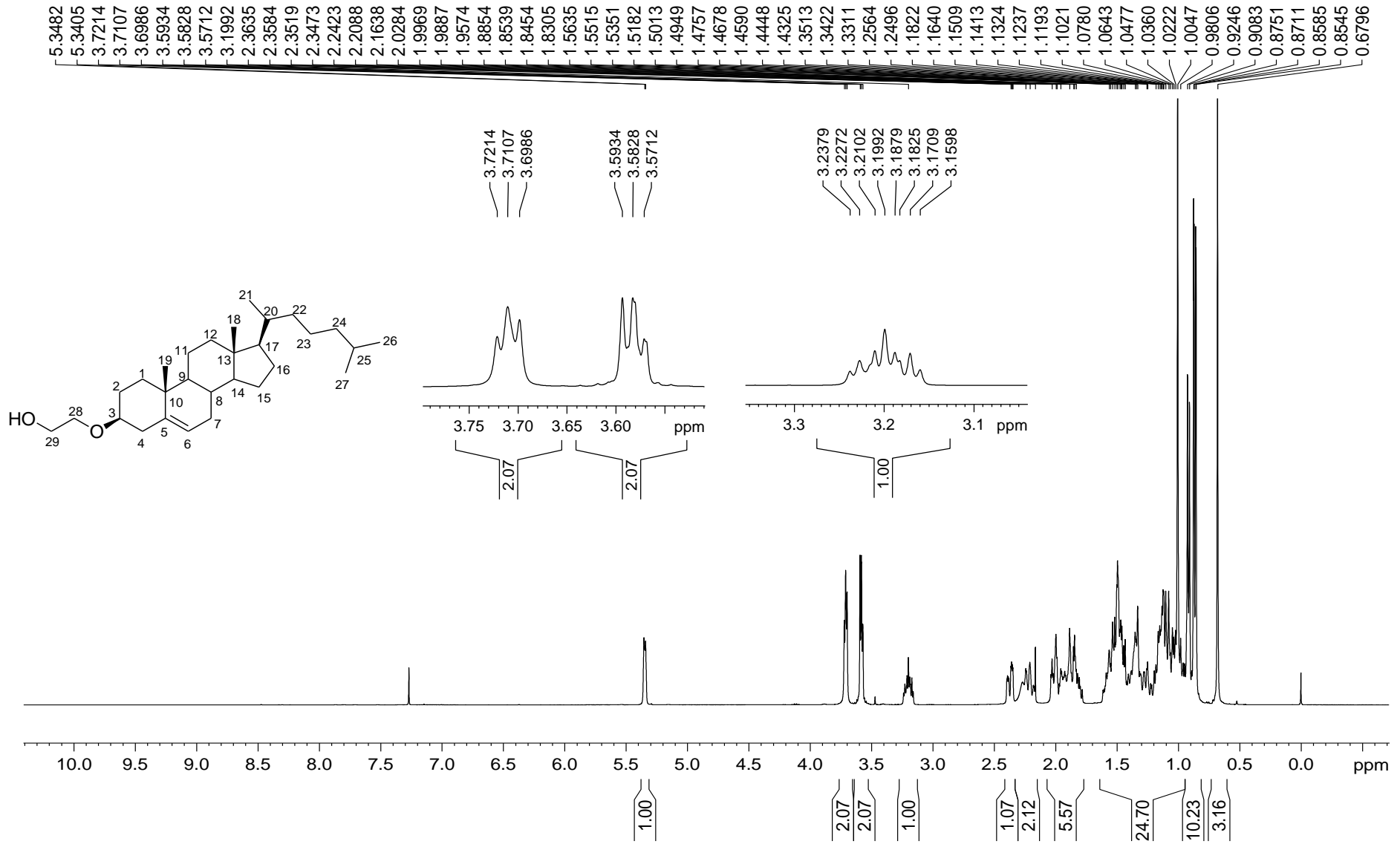


Figura A.12 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de 3- β -[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (**7**) (100 MHz, CDCl_3).

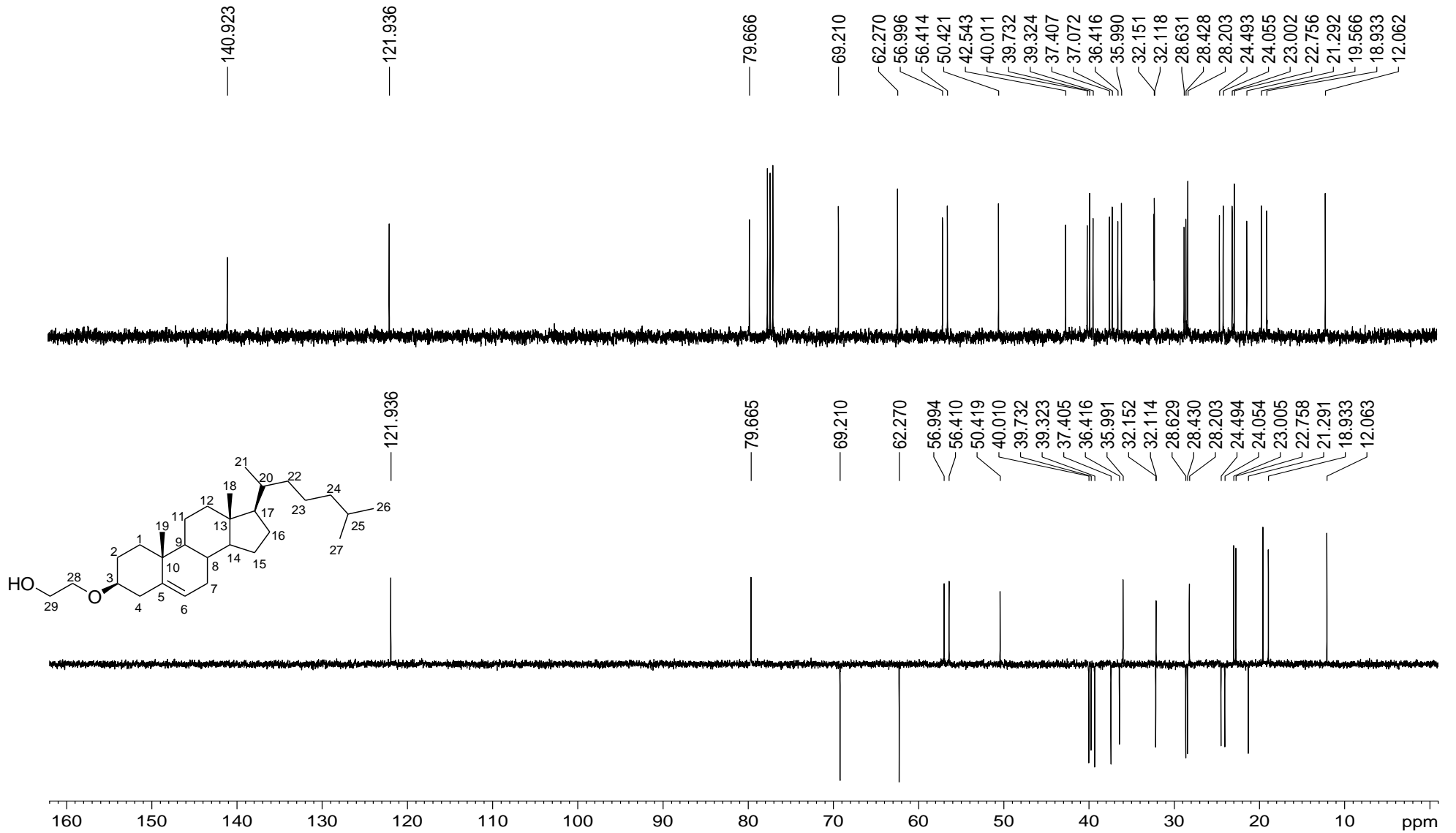


Figura A.13 – Espectro de absorção na região do IV de 3- β -[2(*p*-toluenossulfonil)oxi]eto]colest-5-eno (**8**).

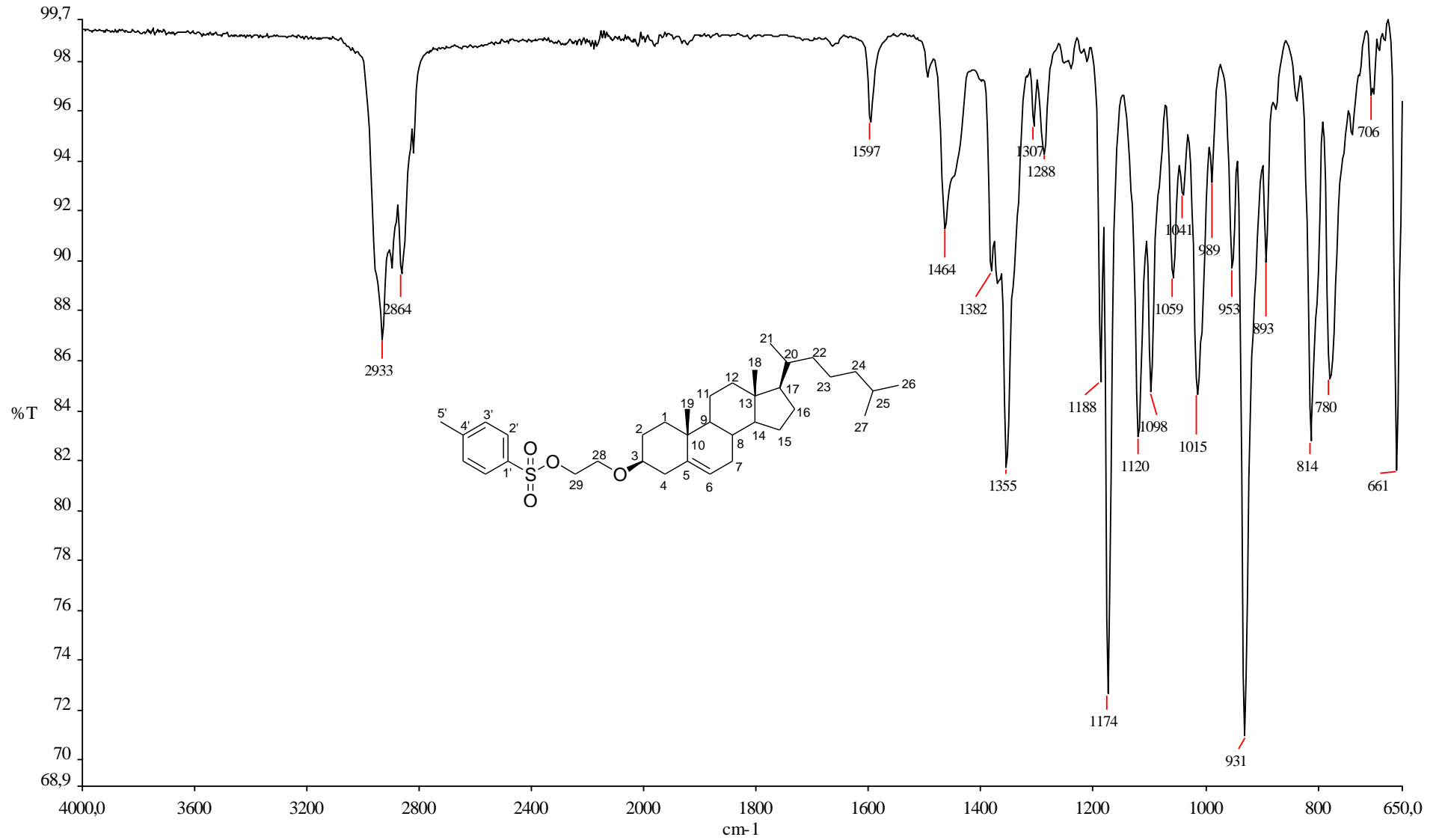


Figura A.14 – Espectro de RMN de ^1H de 3- β -[2[(*p*-toluenossulfonyl)oxi]etoxi]colest-5-eno (**8**) (400 MHz, CDCl_3).

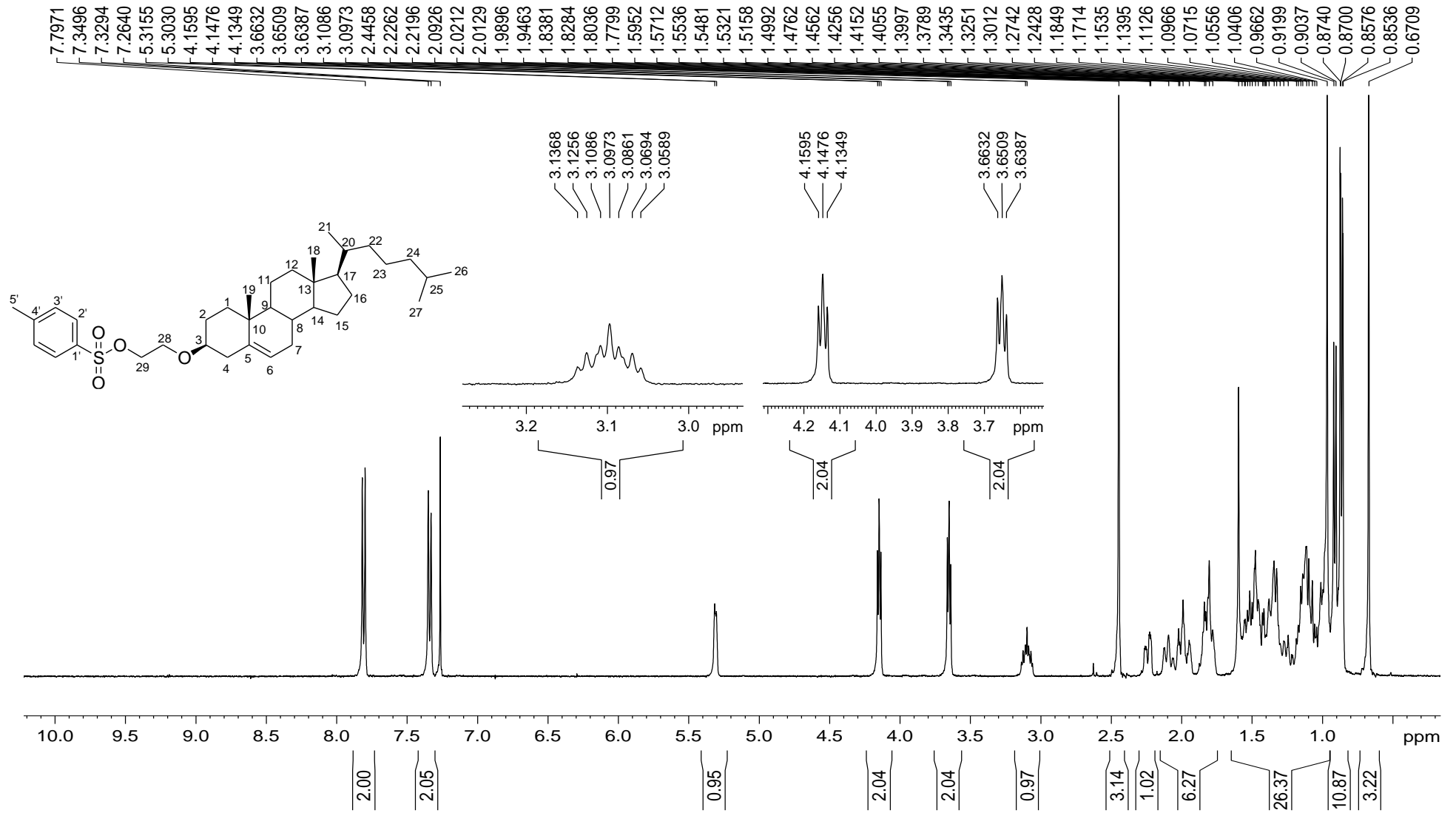


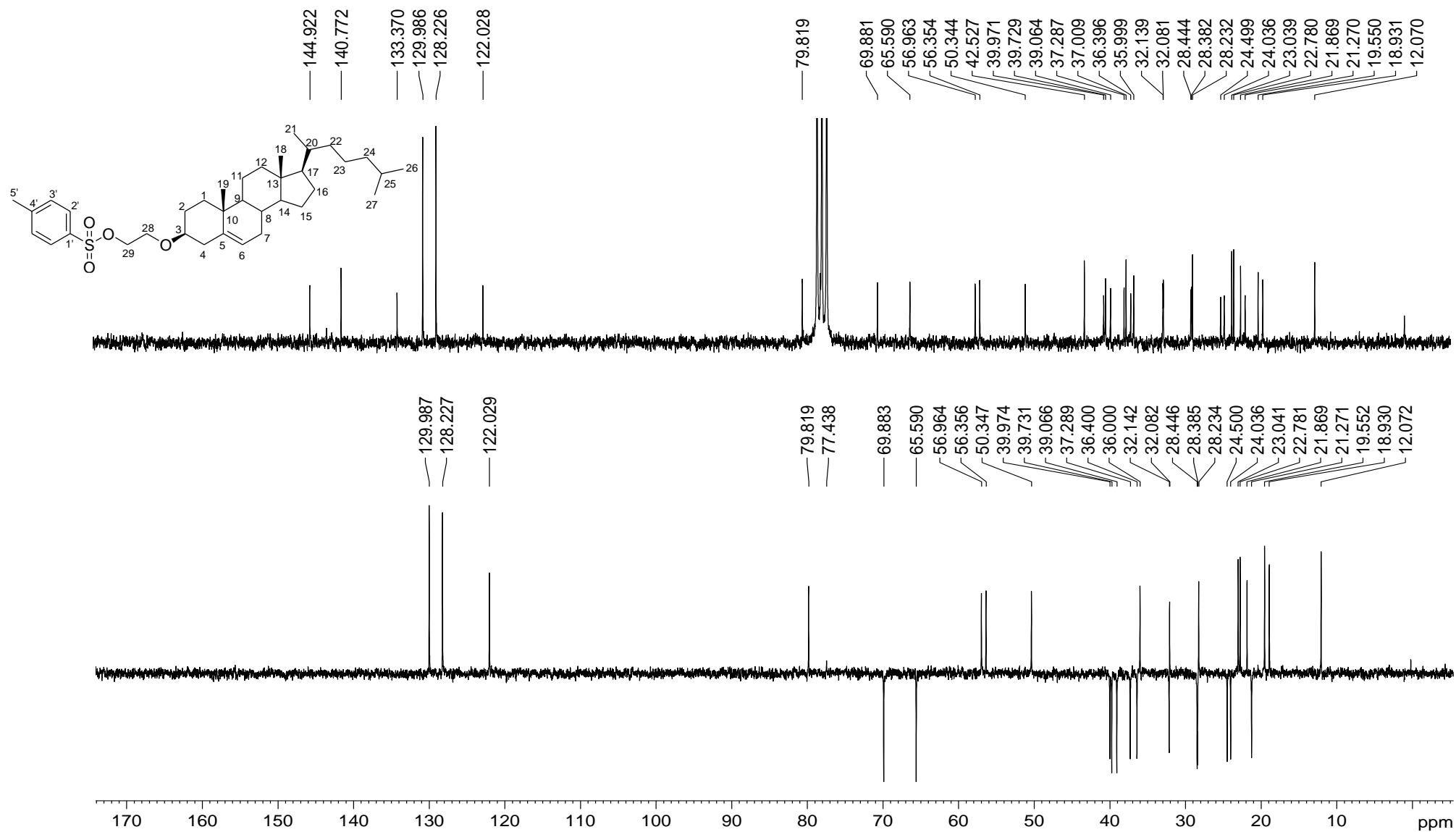
Figura A.15 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de 3- β -[2[(*p*-toluenossulfonil)oxi]eto]colest-5-eno (**8**) (100 MHz, CDCl_3).

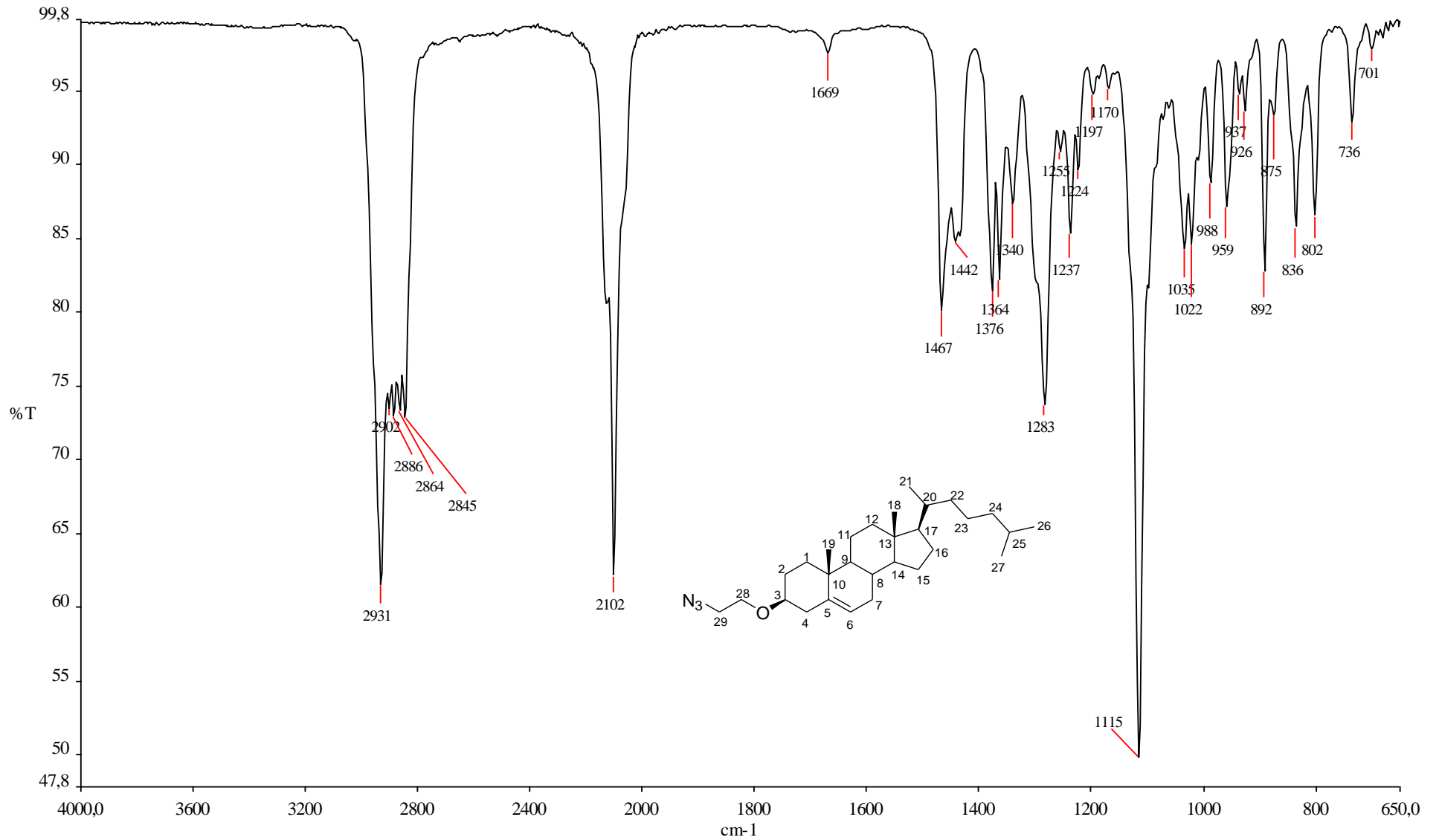
Figura A.16 – Espectro de absorção na região do IV de 3- β -(2-azidoetoxi)colest-5-eno (**9**).

Figura A.17 – Espectro de RMN de ^1H de 3- β -(2-azidoetoxi)colest-5-eno (**9**) (400 MHz, CDCl_3).

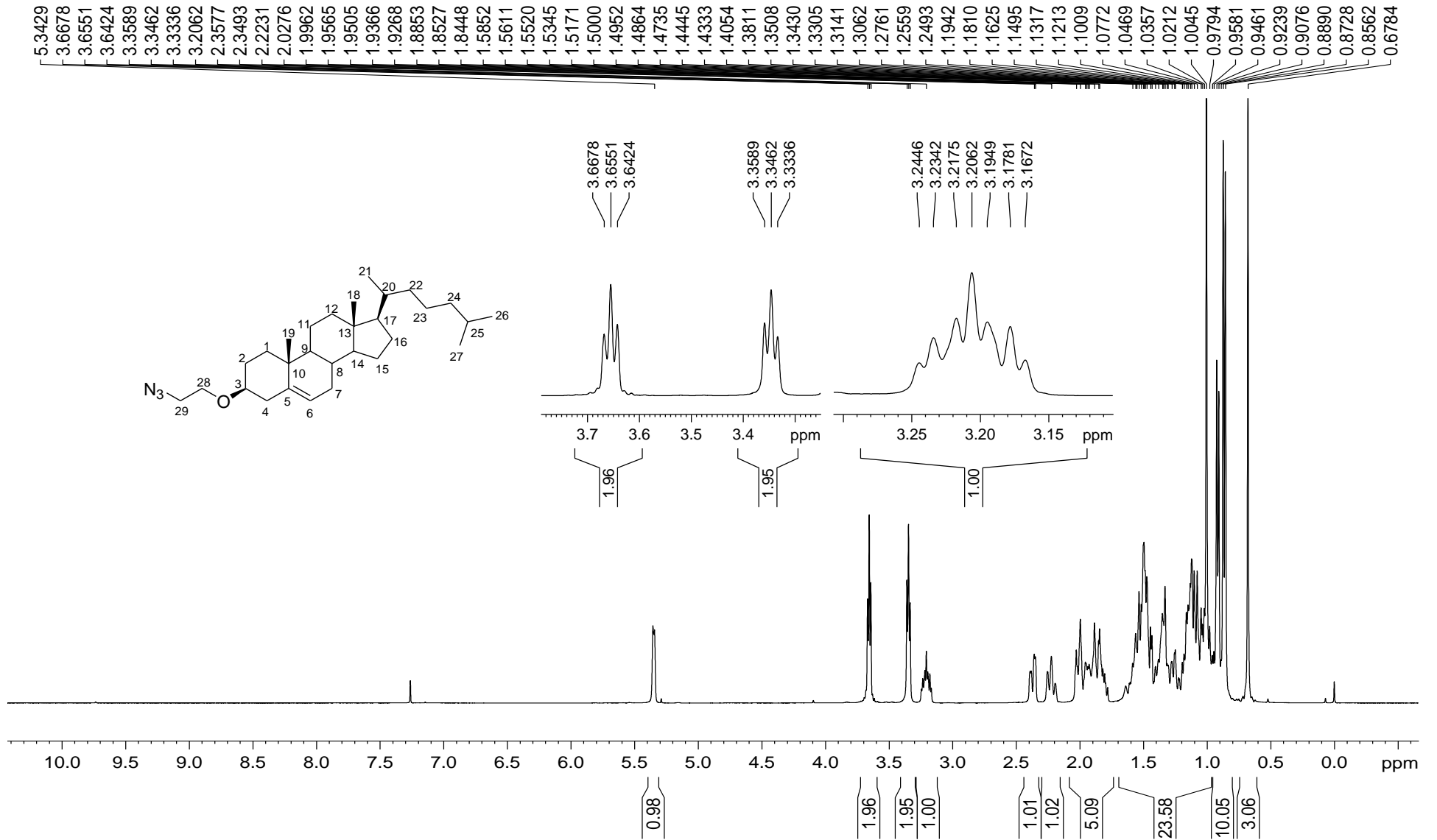


Figura A.18 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de 3- β -(2-azidoetoxi)colest-5-eno (**9**). (100 MHz, CDCl_3).

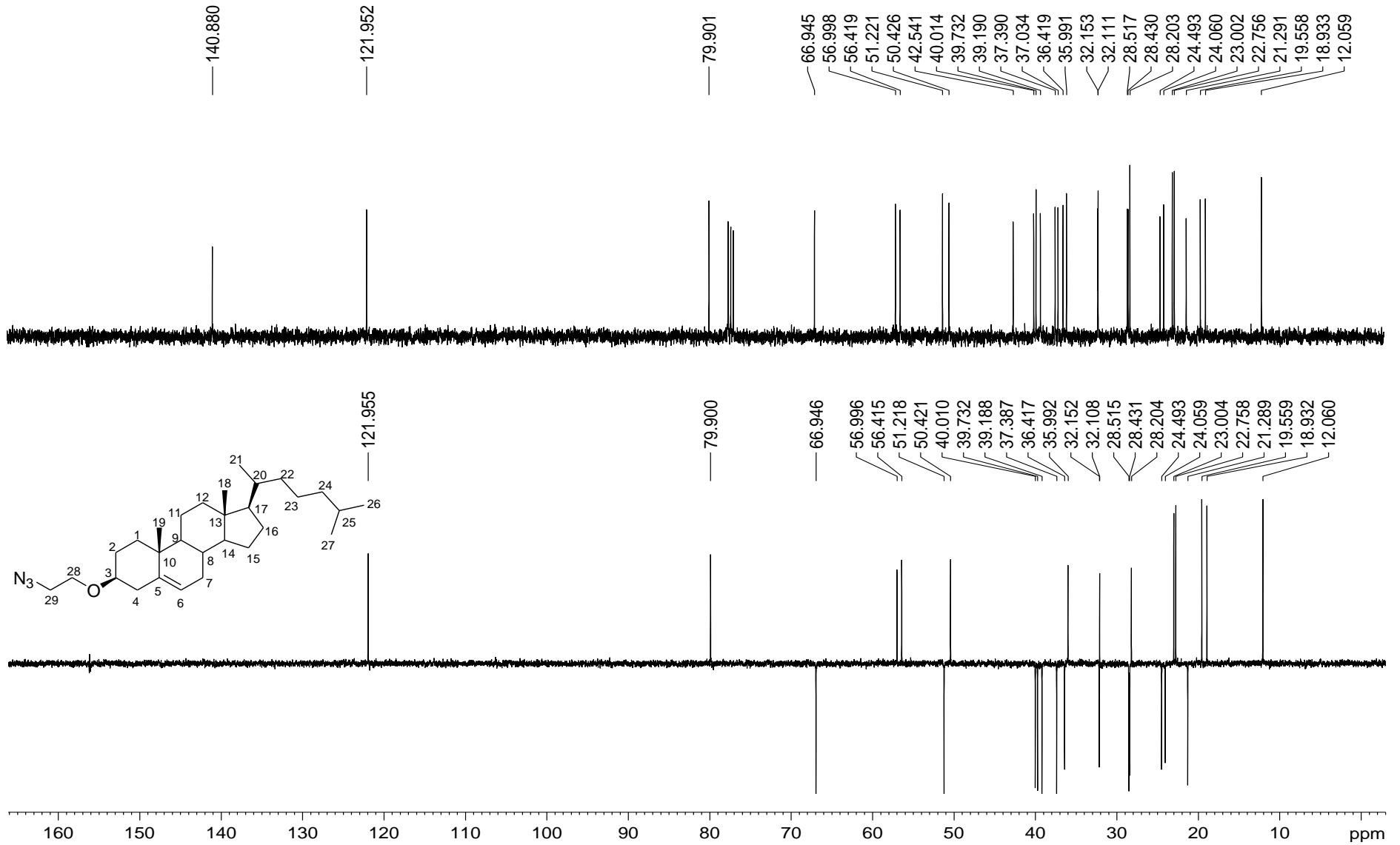


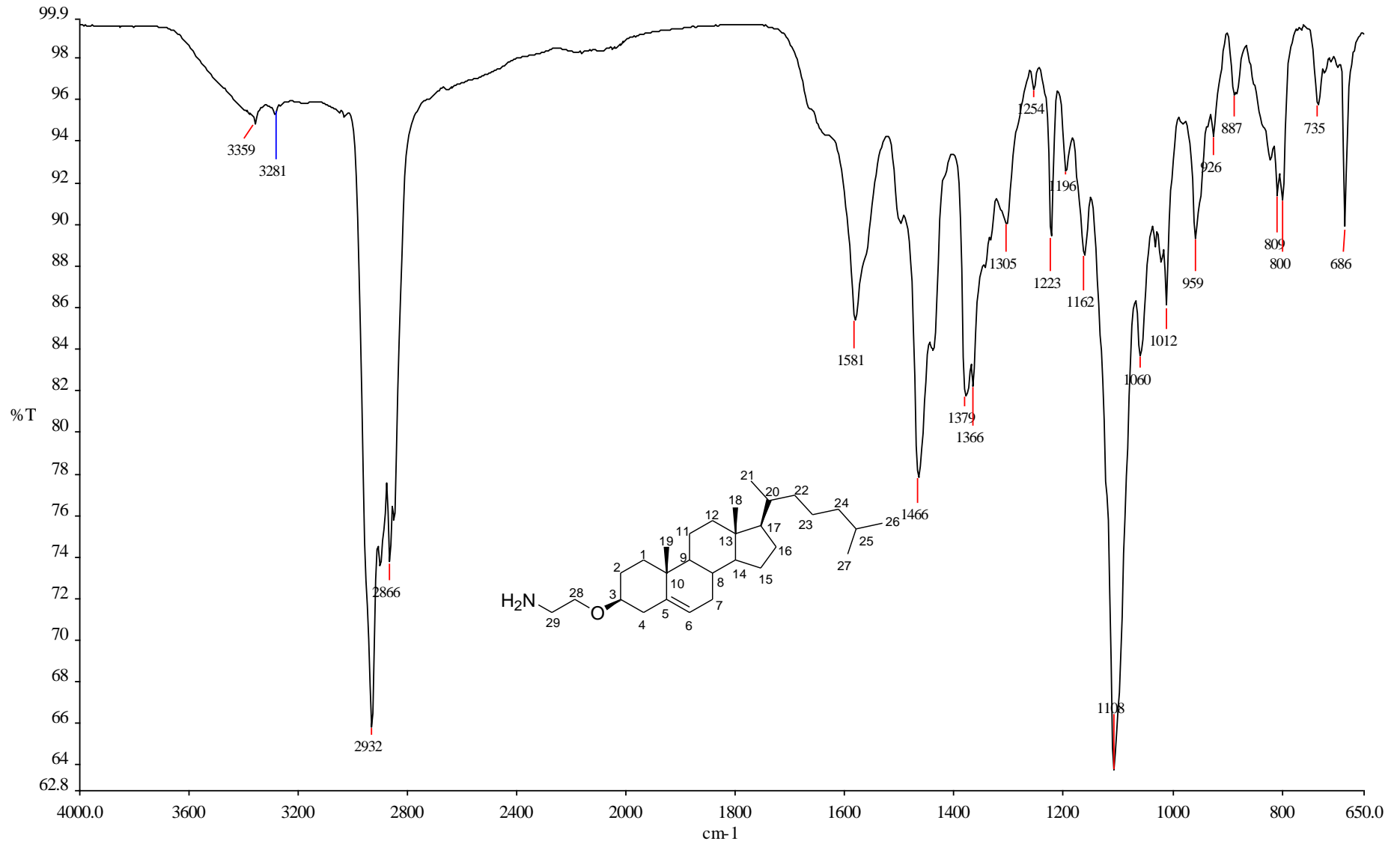
Figura A.19 – Espectro de absorção na região do IV de 3- β -(2-aminoetoxi)colest-5-eno (**10**).

Figura A.20 – Espectro de RMN de ^1H de 3- β -(2-aminoetoxi)colest-5-eno (**10**) (400 MHz, CDCl_3).

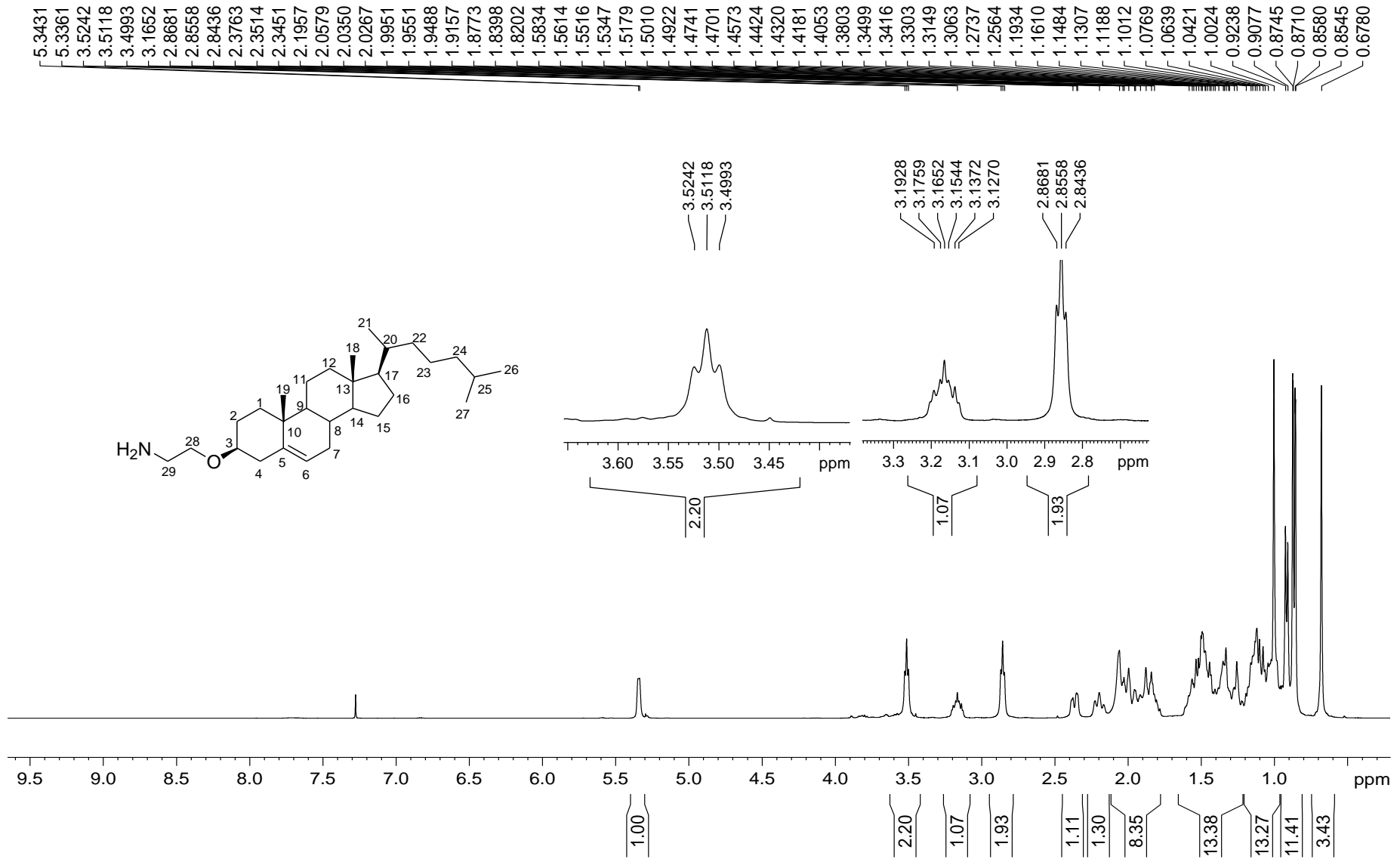


Figura A.21 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de 3- β -(2-aminoetoxi)colest-5-eno (**10**) (100 MHz, CDCl_3).

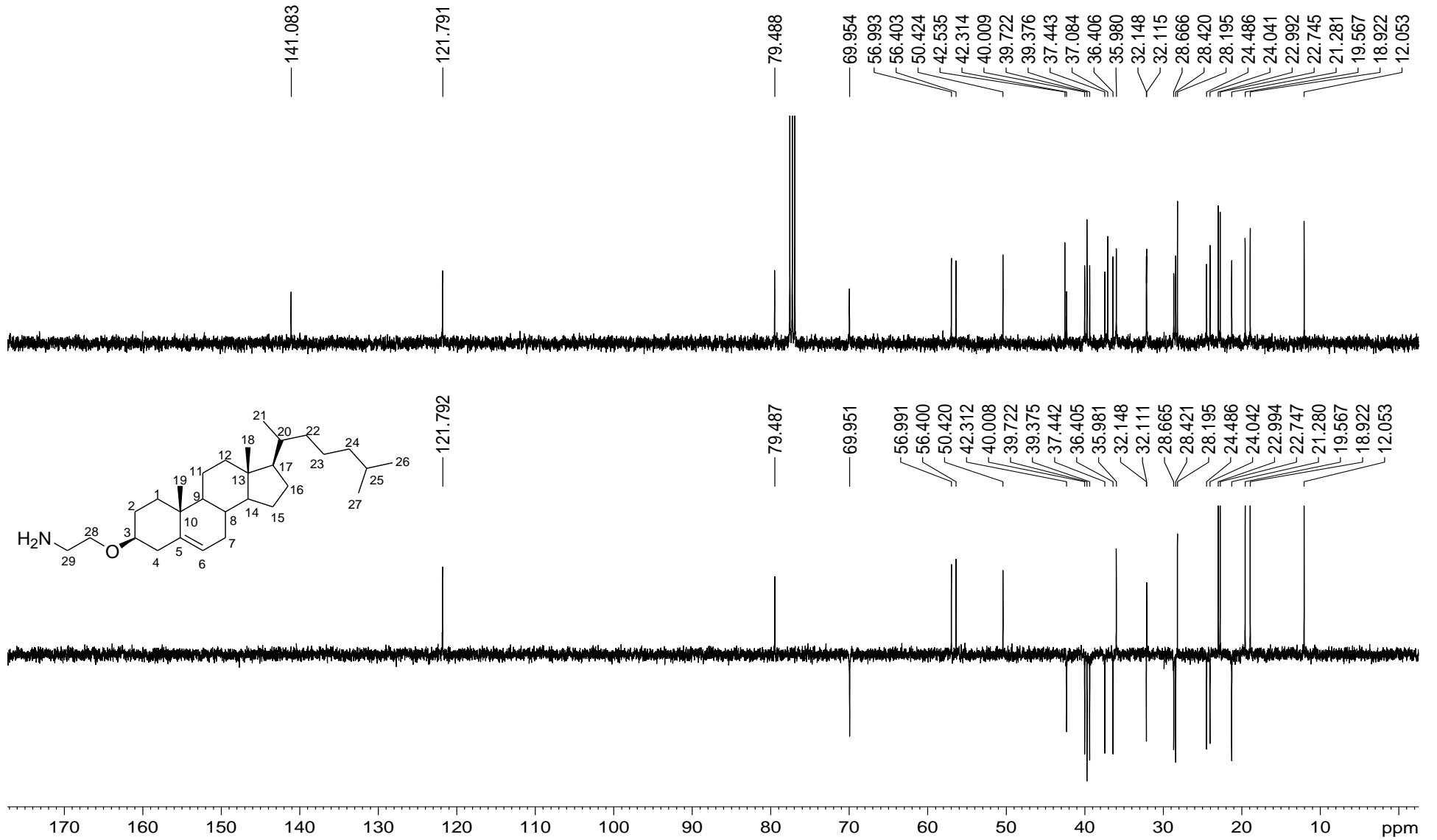


Figura A.22 – Espectro de absorção na região do IV de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopirranose (**12**).

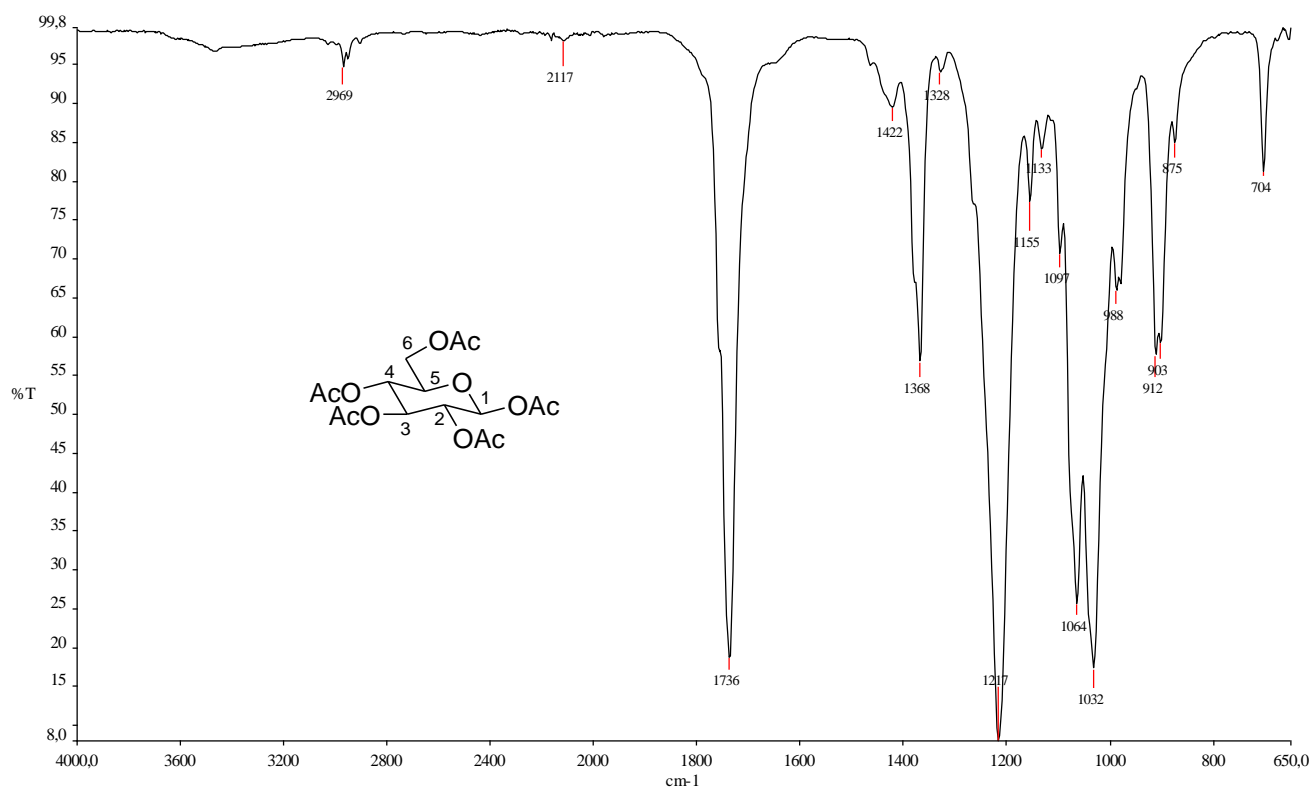


Figura A.23 – Espectro de absorção na região do IV de 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- β -D-galactopirranose (**16**).

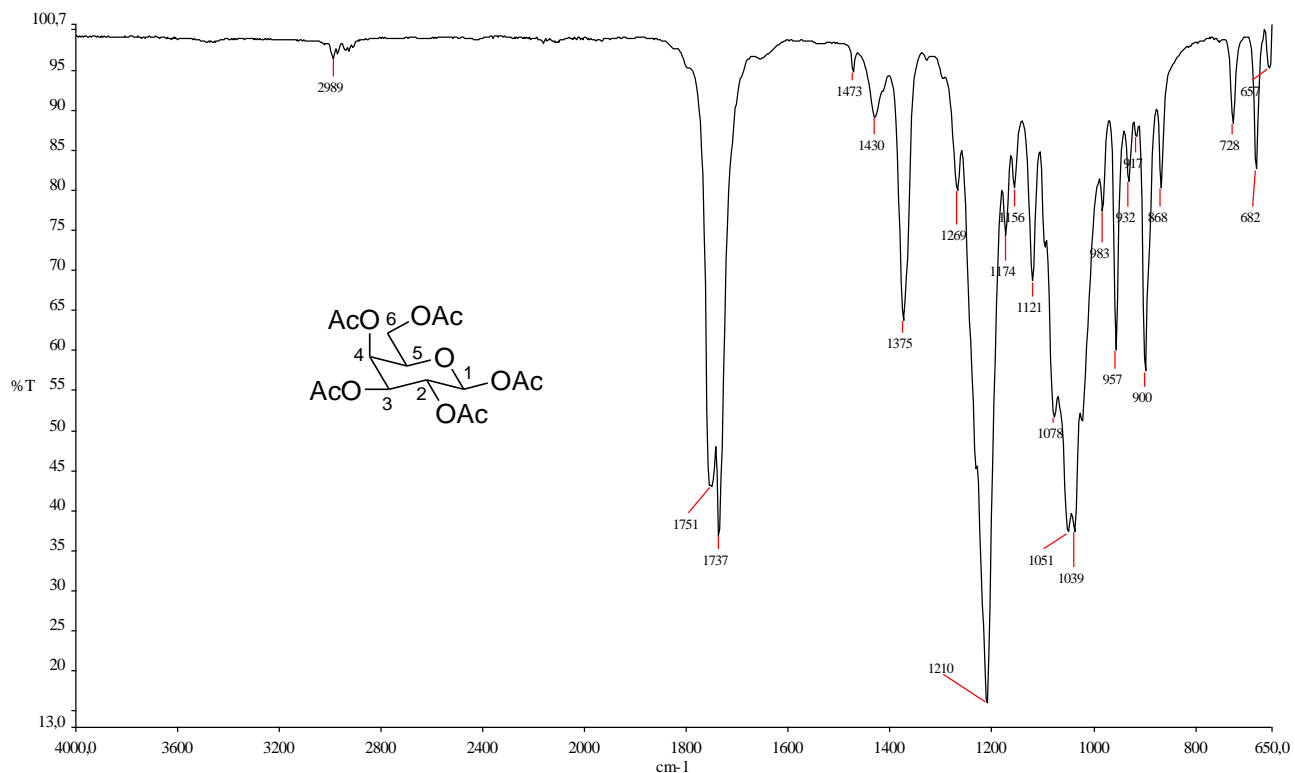


Figura A.24 – Espectro de absorção na região do IV de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose (**20**).

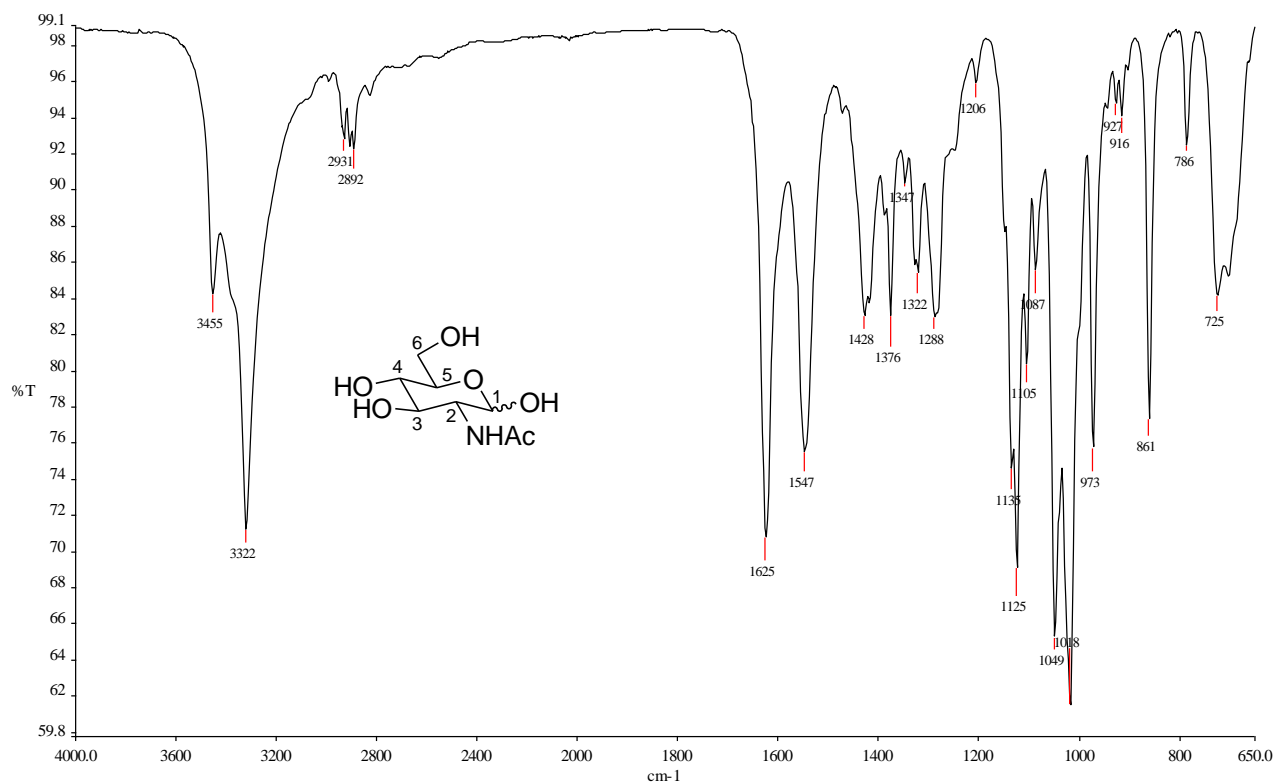


Figura A.25 – Espectro de absorção na região do IV de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (**13**).

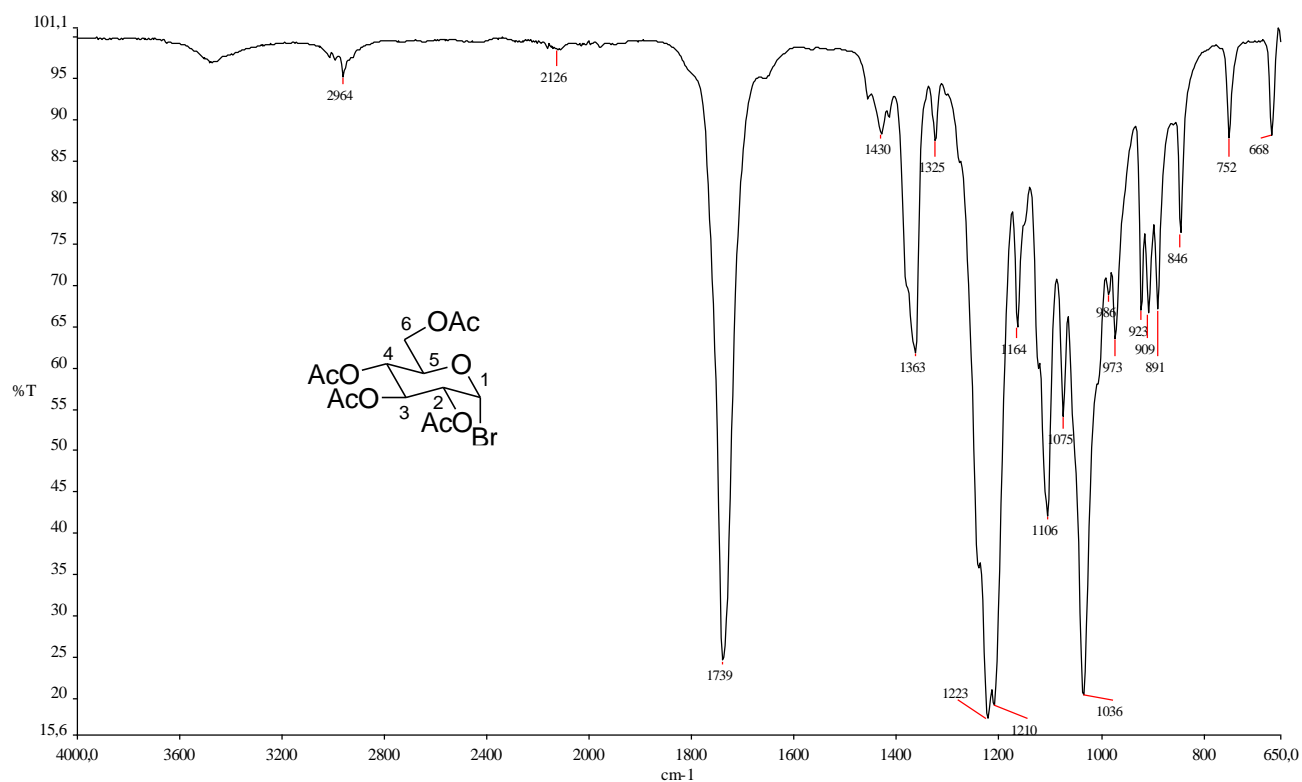


Figura A.26 – Espectro de absorção na região do IV de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-galactopiranosila (17).

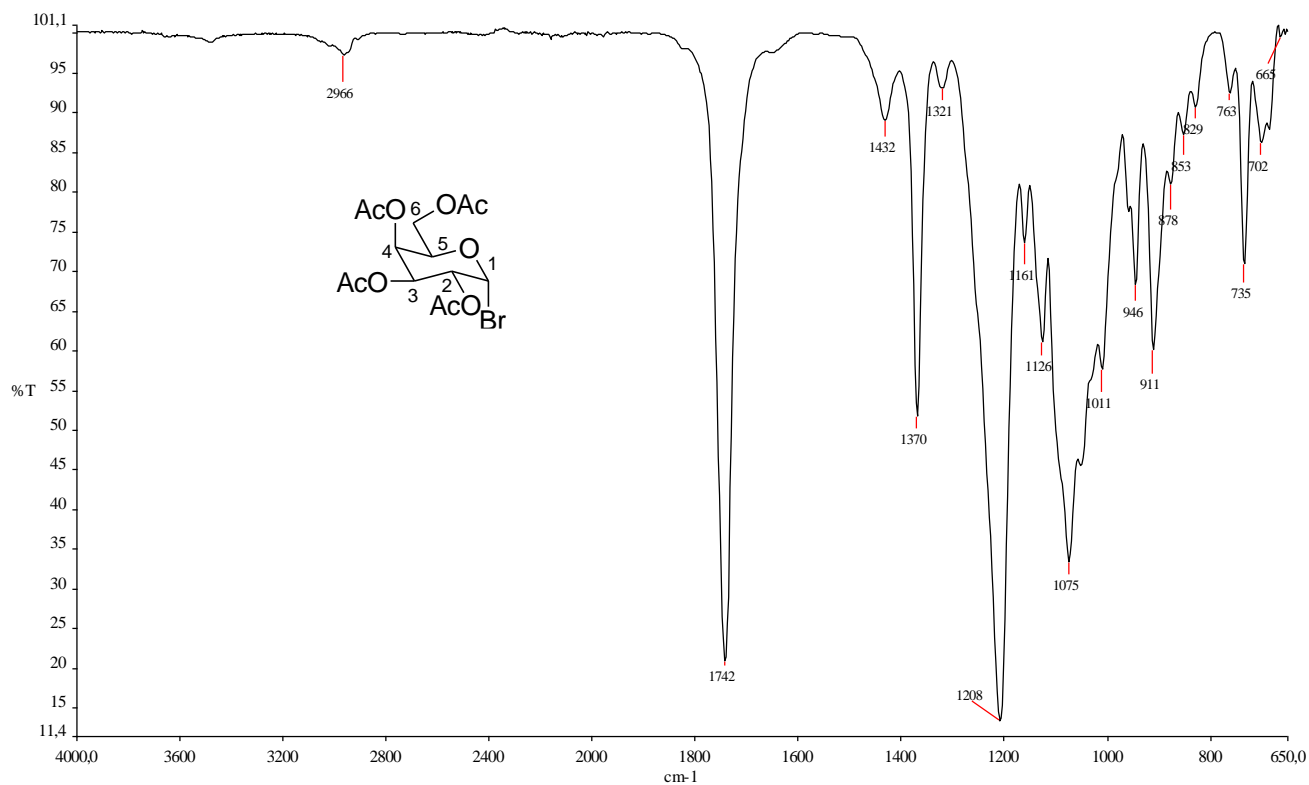


Figura A.27 – Espectro de absorção na região do IV do cloreto de 2-acetamido-1,2-didesoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-glicopiranosila (21).

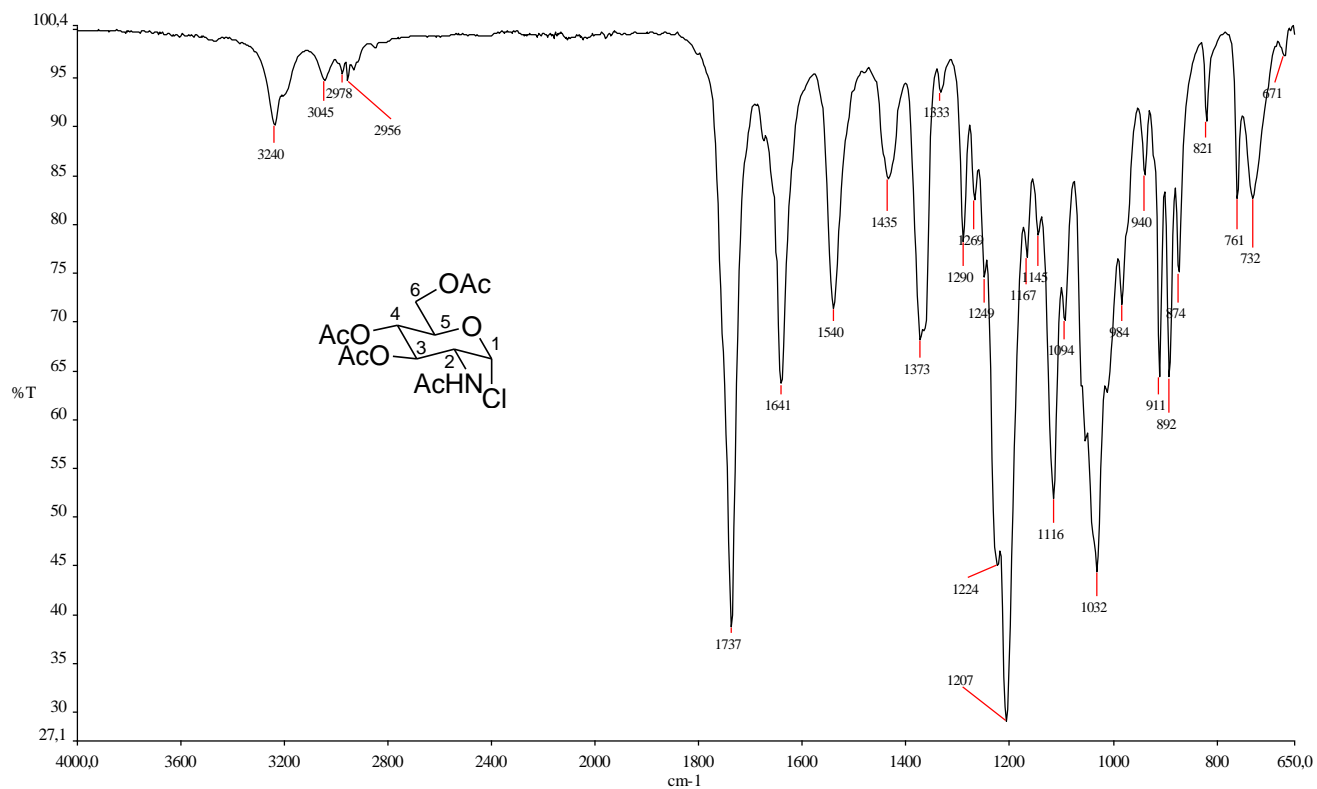


Figura A.28 – Espectro de absorção na região do IV de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopiranoose (**14**).

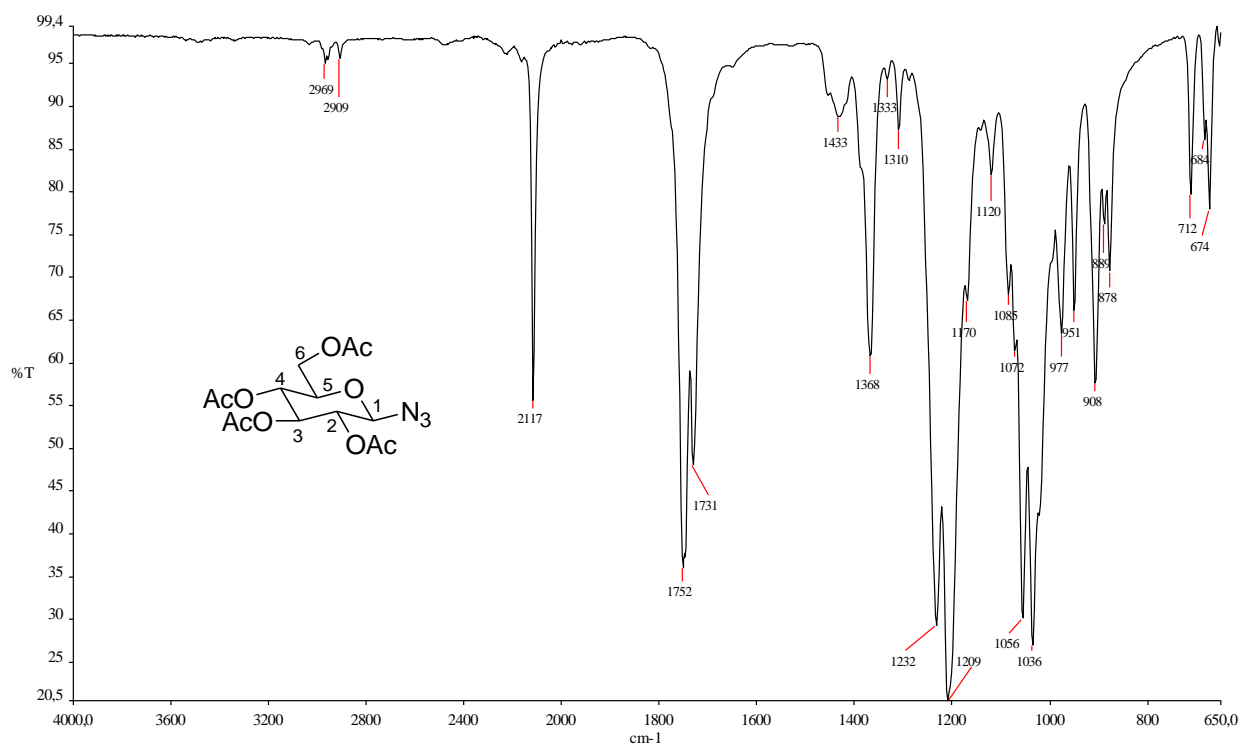


Figura A.29 – Espectro de RMN de ¹H de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopiranoose (**14**) (200 MHz, CDCl₃).

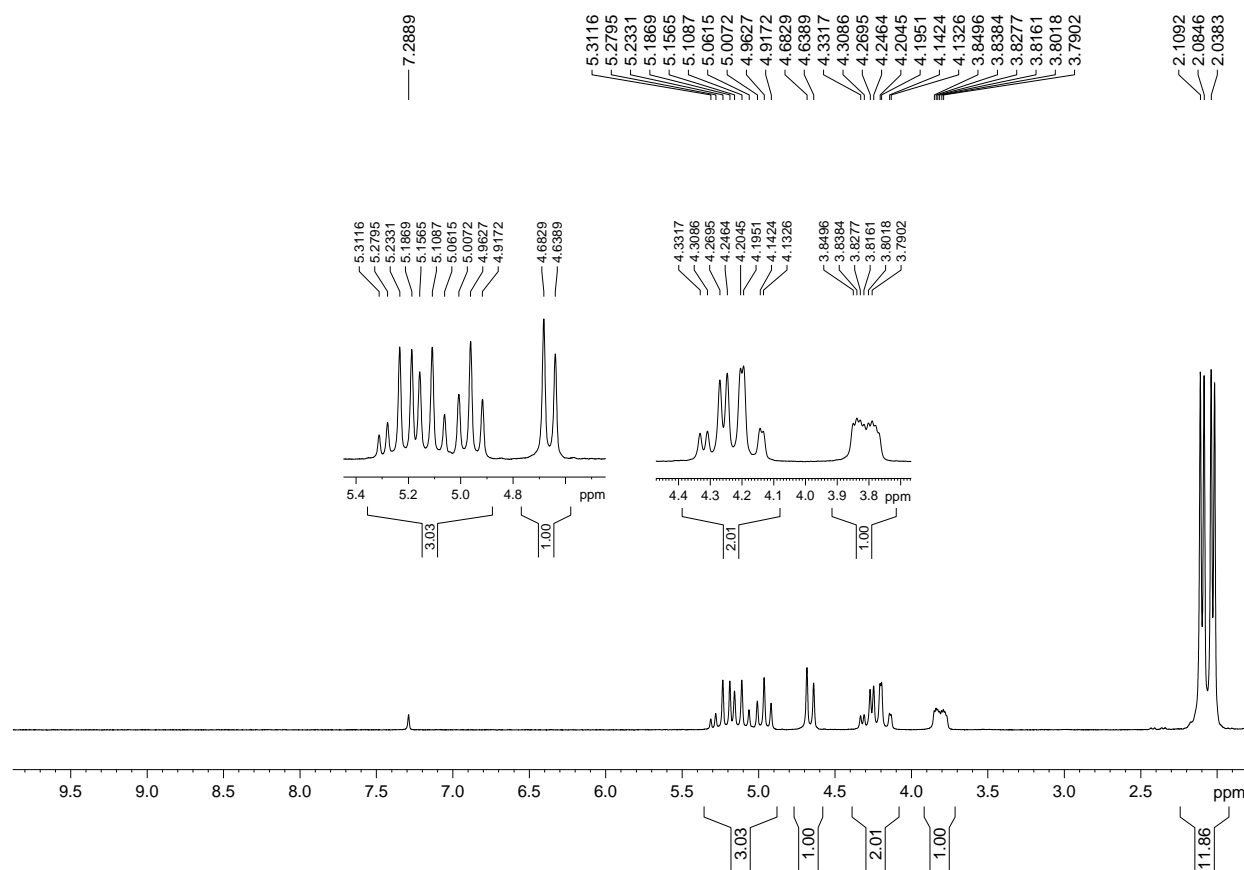


Figura A.30 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopirranose (**14**) (50 MHz, CDCl_3).

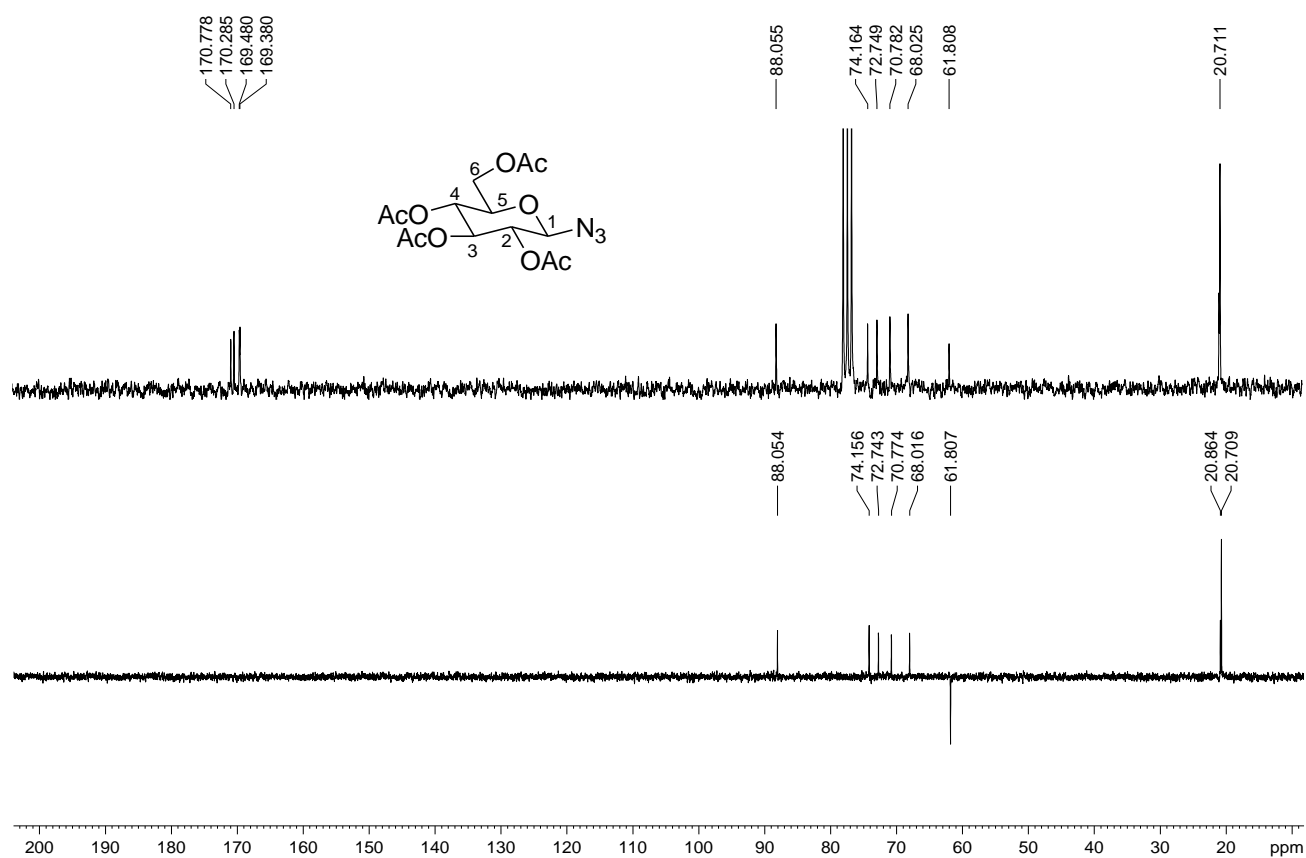


Figura A.31 – Espectro de absorção na região do IV de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopirranose (**18**).

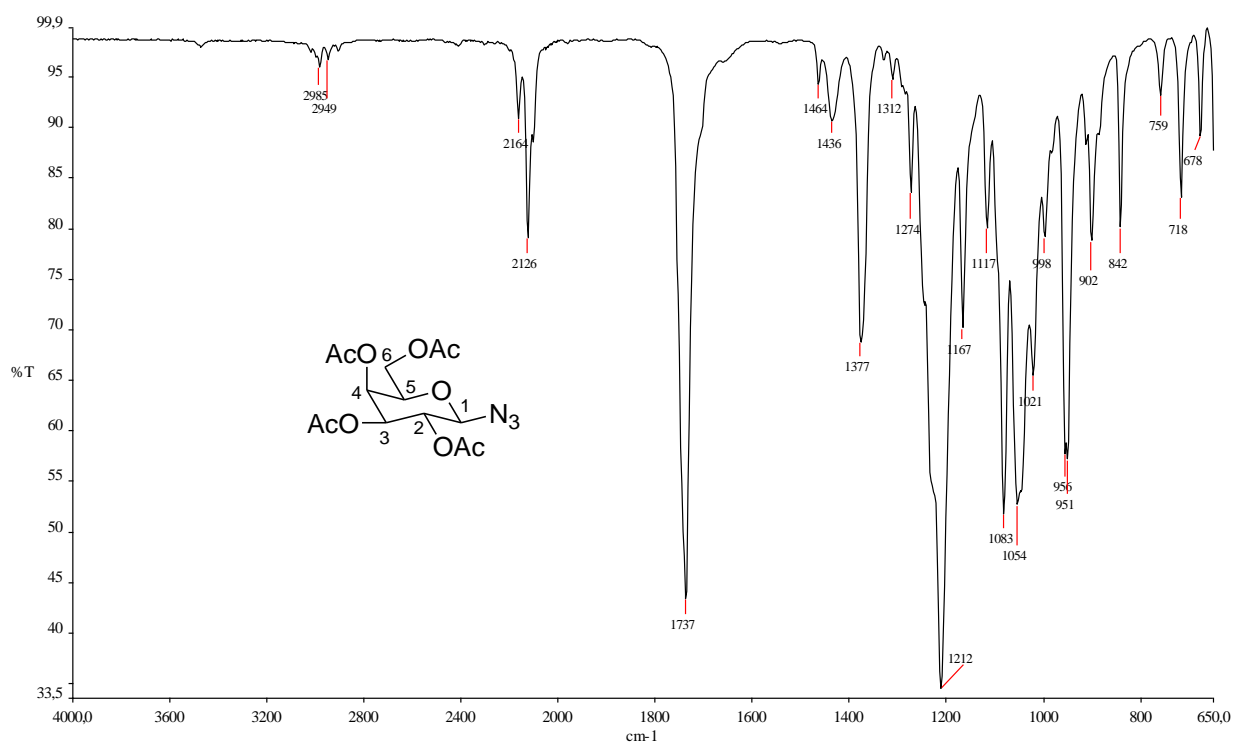


Figura A.32 – Espectro de RMN de ^1H de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranoose (**18**) (200 MHz, CDCl_3).

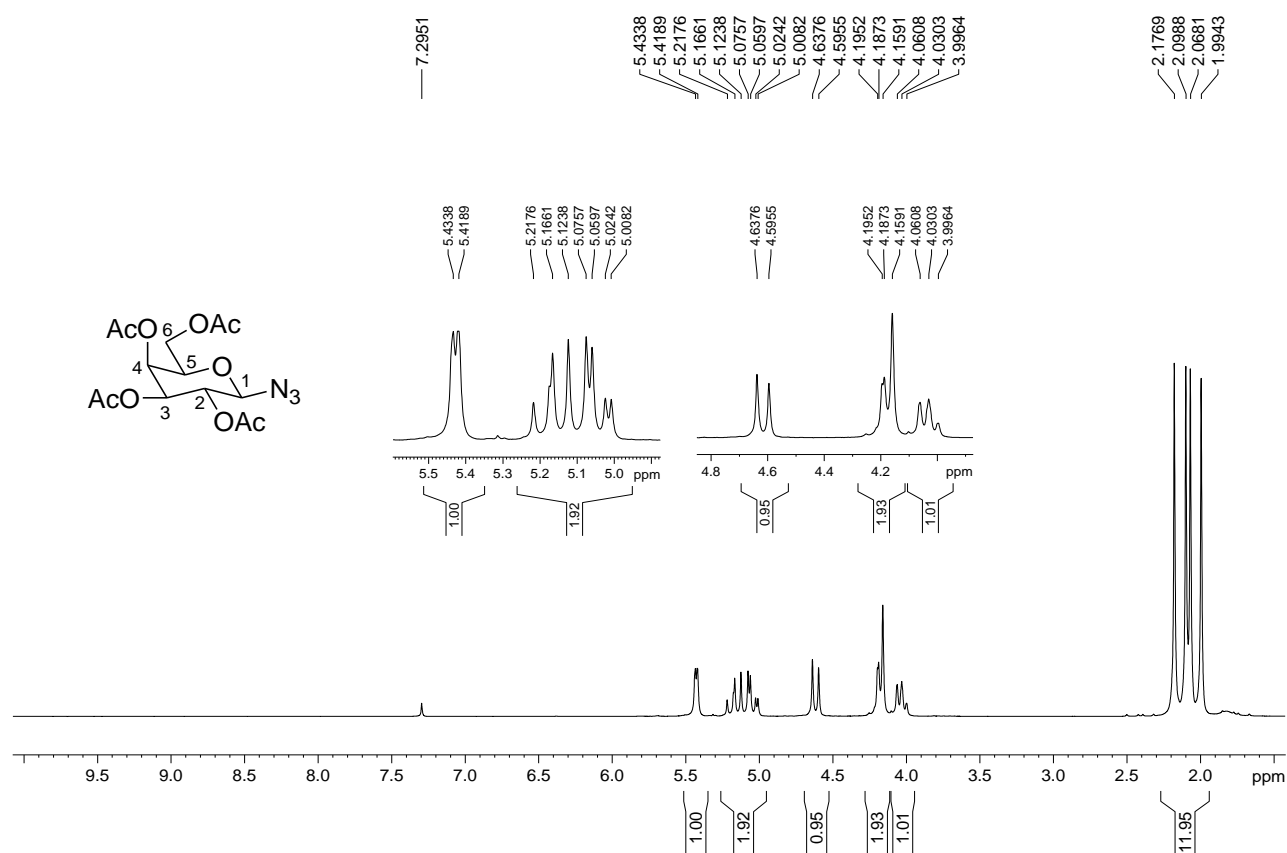


Figura A.33 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranoose (**18**) (50 MHz, CDCl_3).

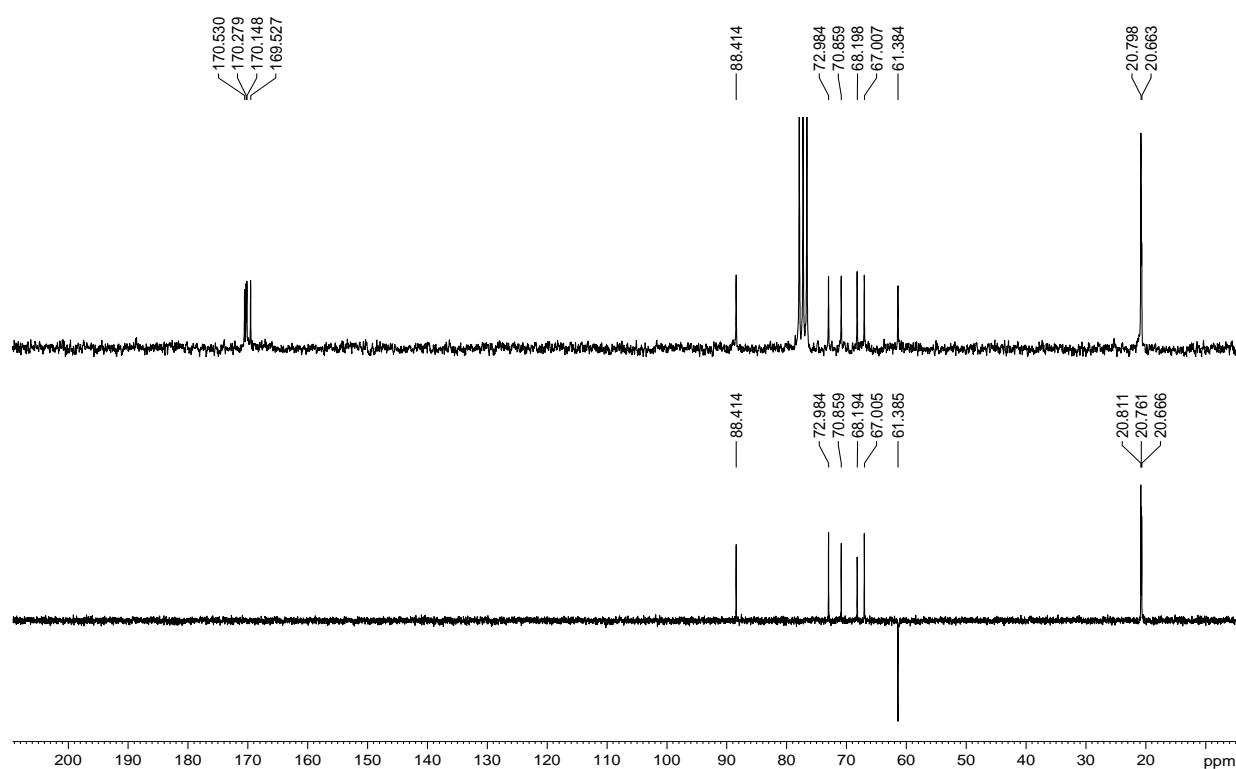


Figura A.34 – Espectro de absorção na região do IV de 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopiranoose (**22**).

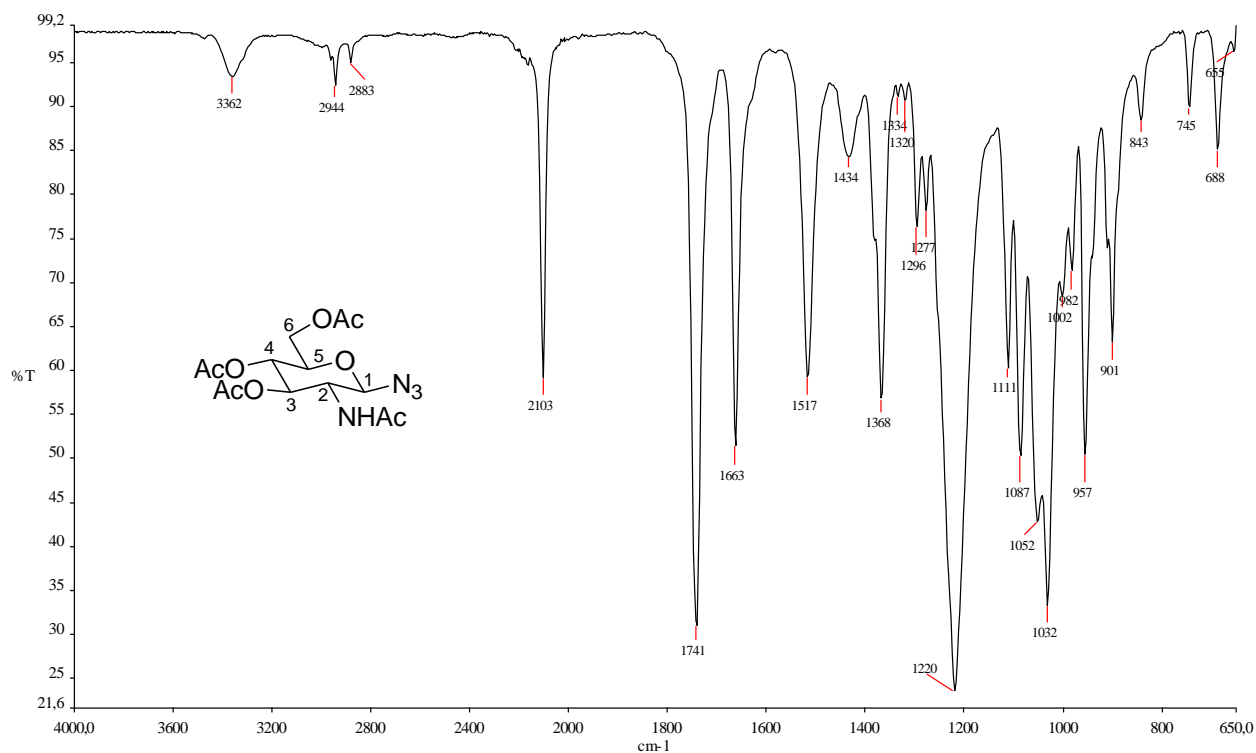


Figura A.35 – Espectro de RMN de ^1H de 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopiranoose (**22**) (200 MHz, CDCl_3).

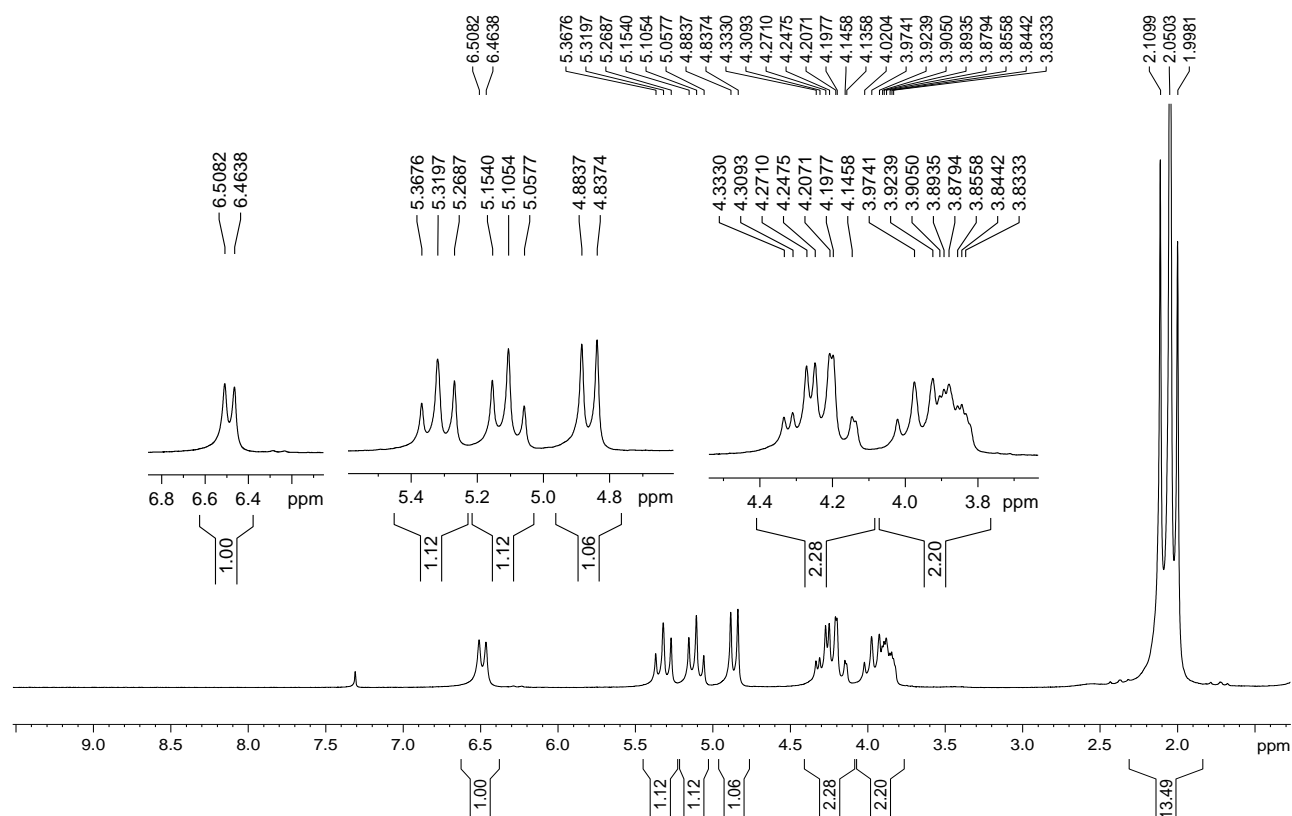


Figura A.36 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopiranoose (**22**) (50 MHz, CDCl_3).

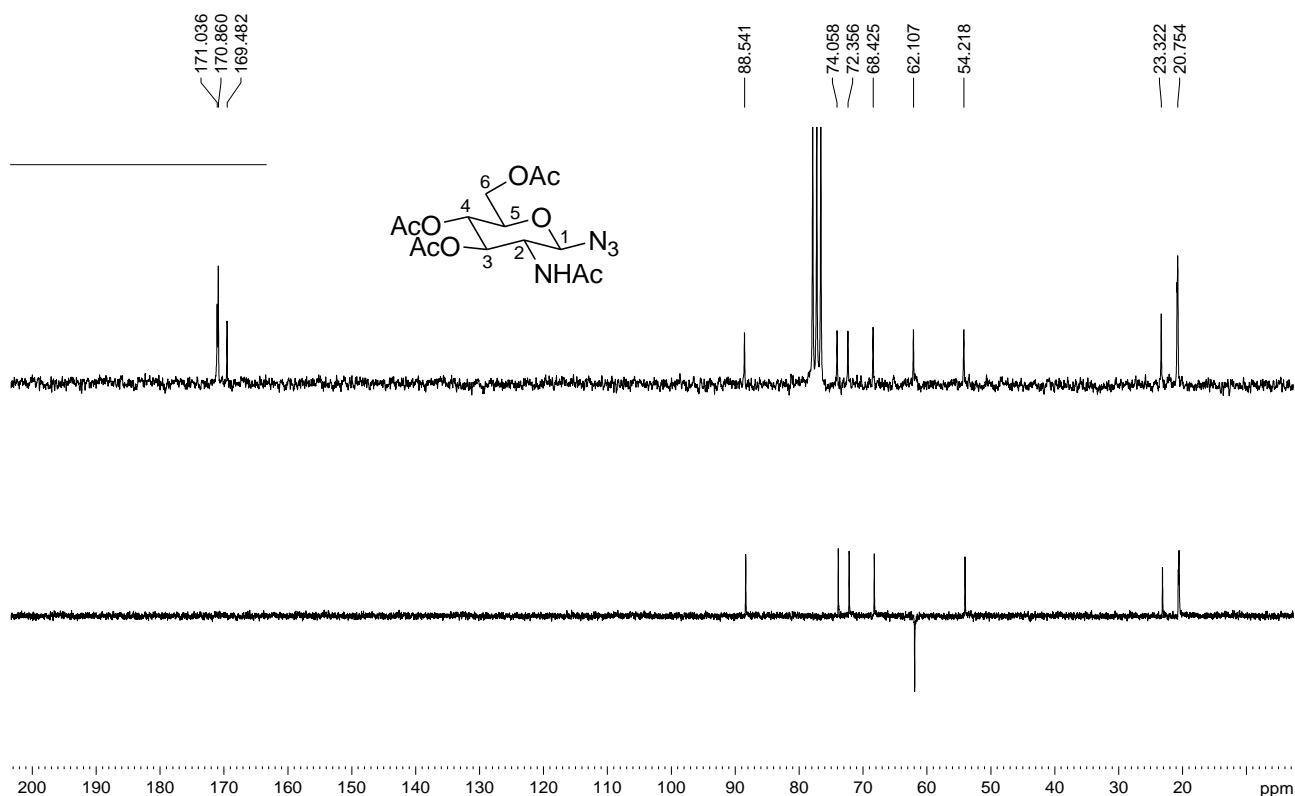


Figura A.37 – Espectro de absorção na região do IV do glicosiltriaazol **23**.

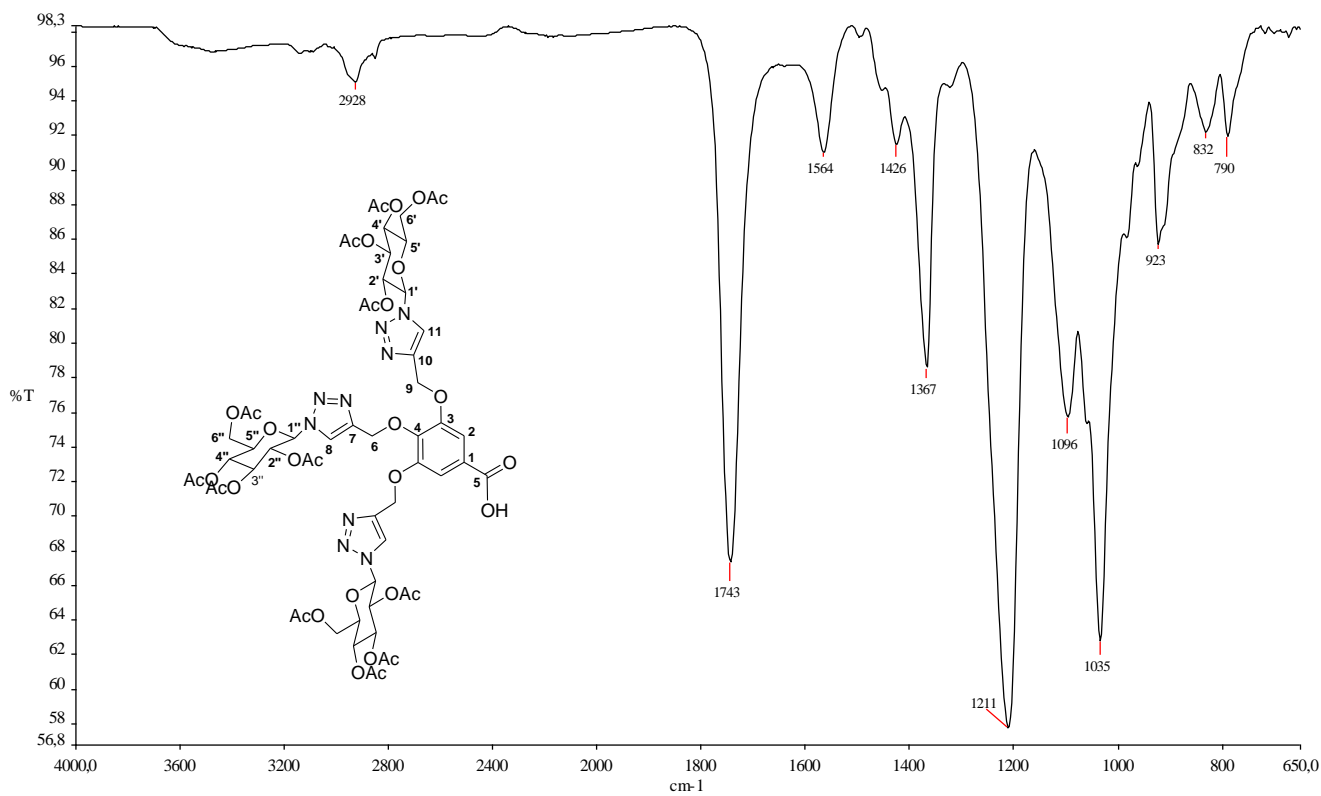


Figura A.38 – Espectro de RMN de ^1H do glicosiltriazol **23** (400 MHz, CDCl_3).

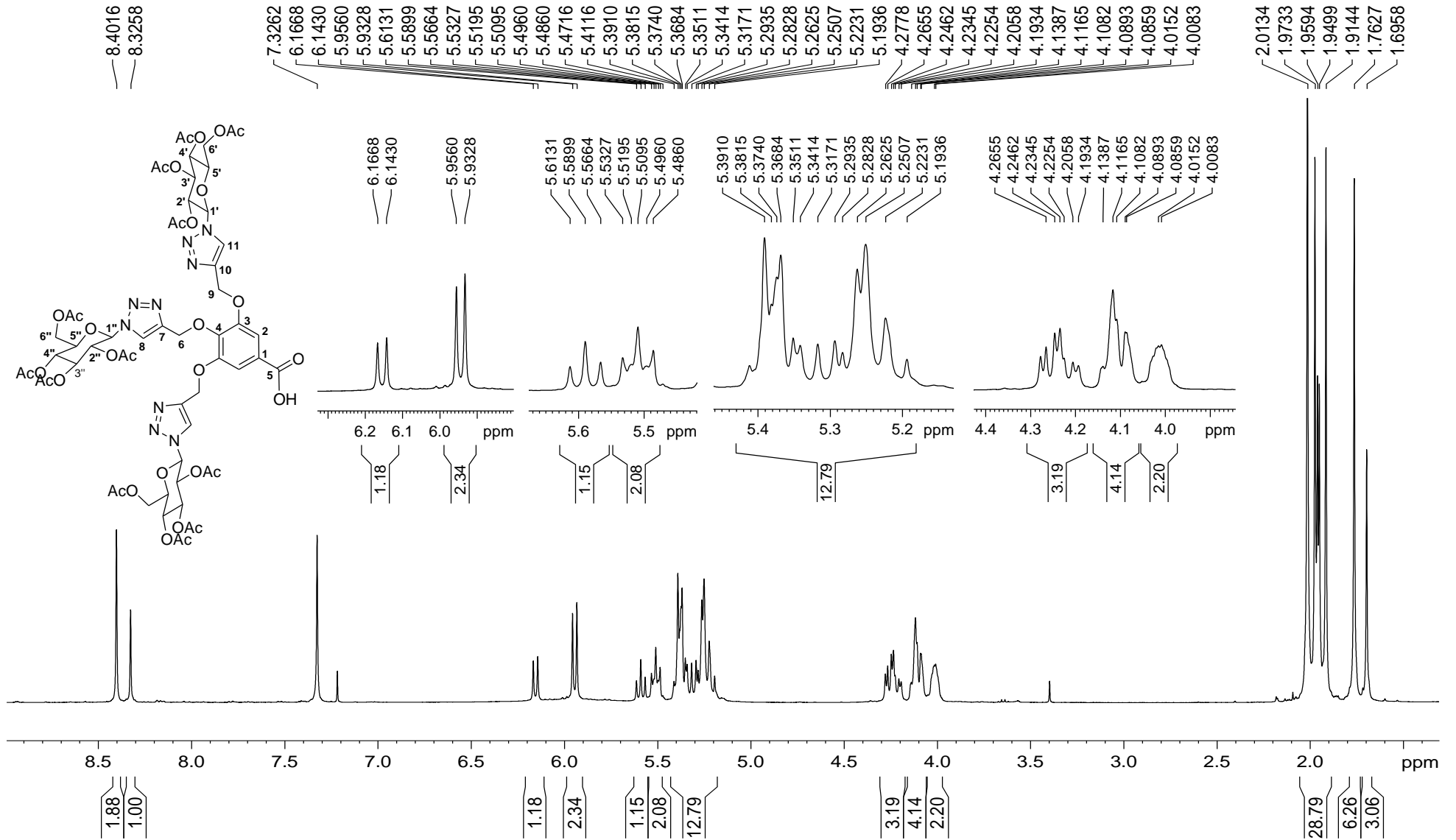


Figura A.39 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do glicosiltriaazol **23** (100 MHz, CDCl_3).

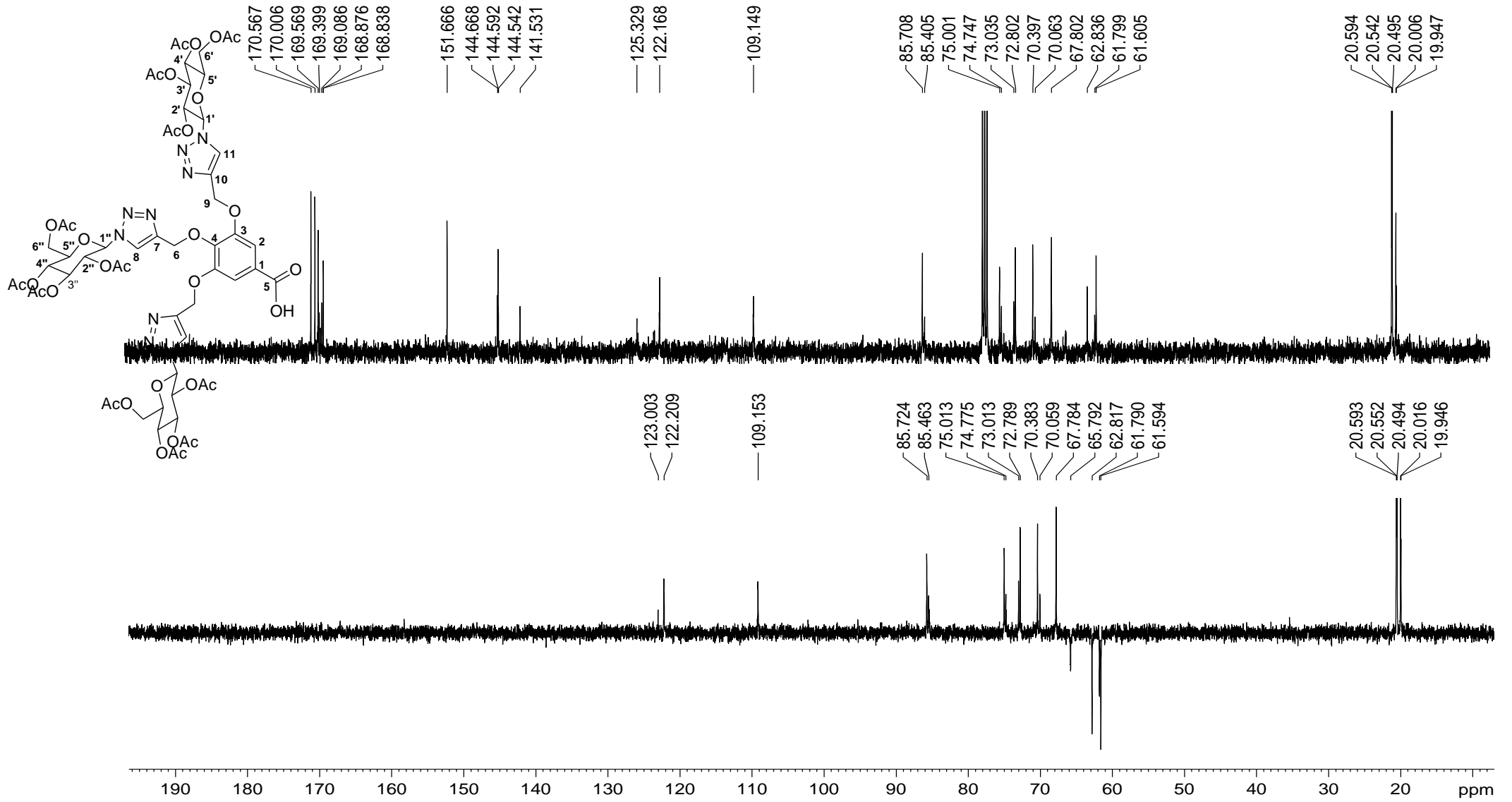


Figura A.40 – Mapa de contornos HMQC do glicosiltriaazol **23** (400 MHz, CDCl₃)

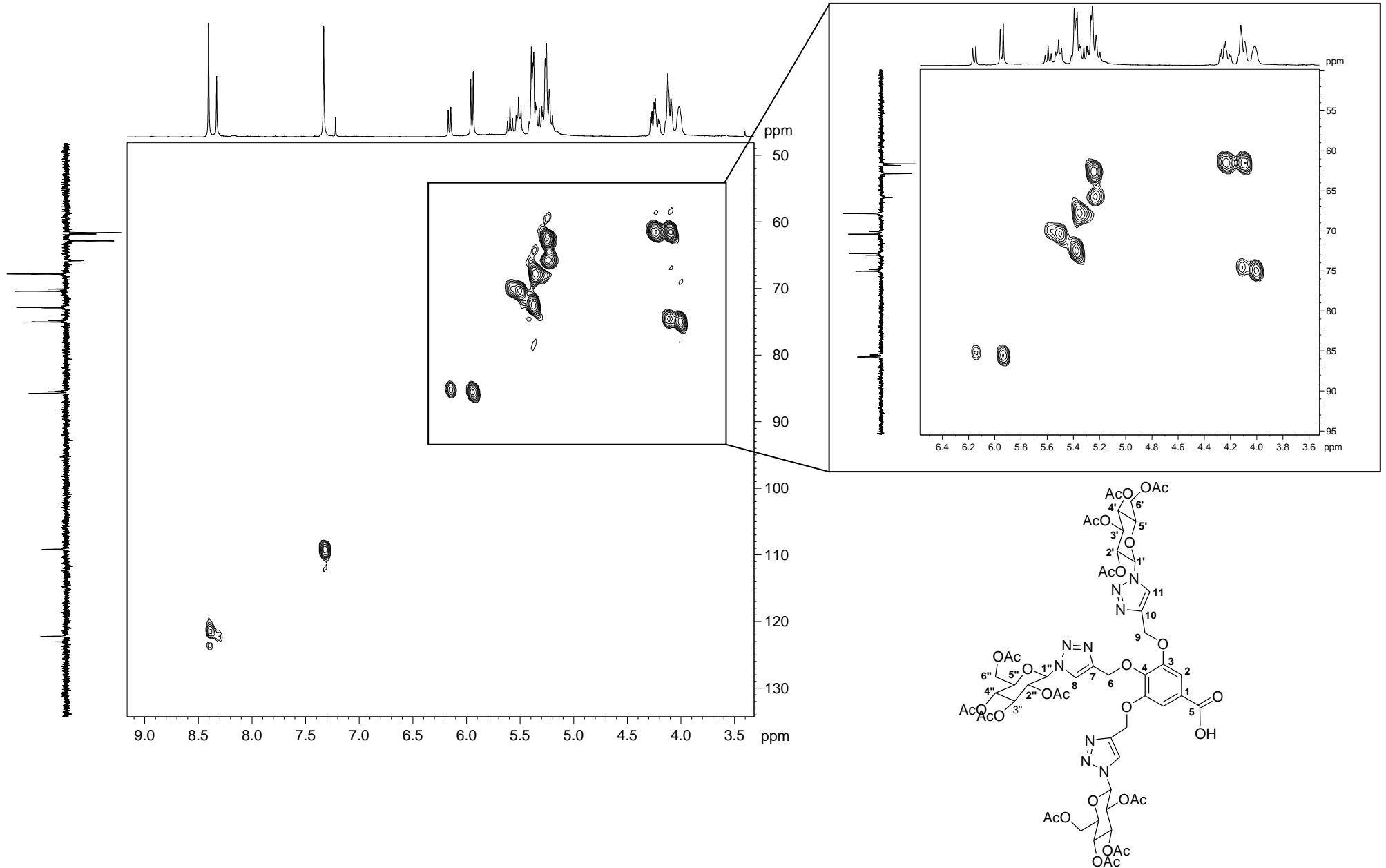


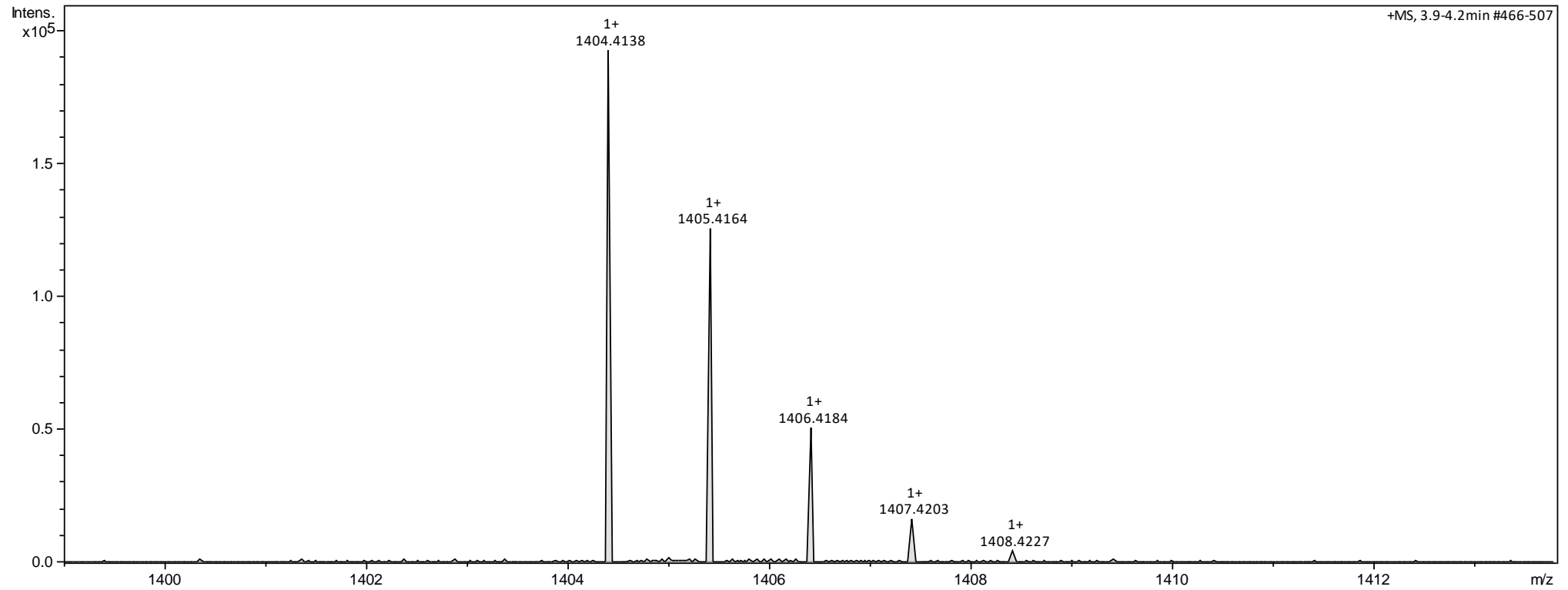
Figura A.41 – Espectro de massas (ESI) do glicosiltriazol **23**.

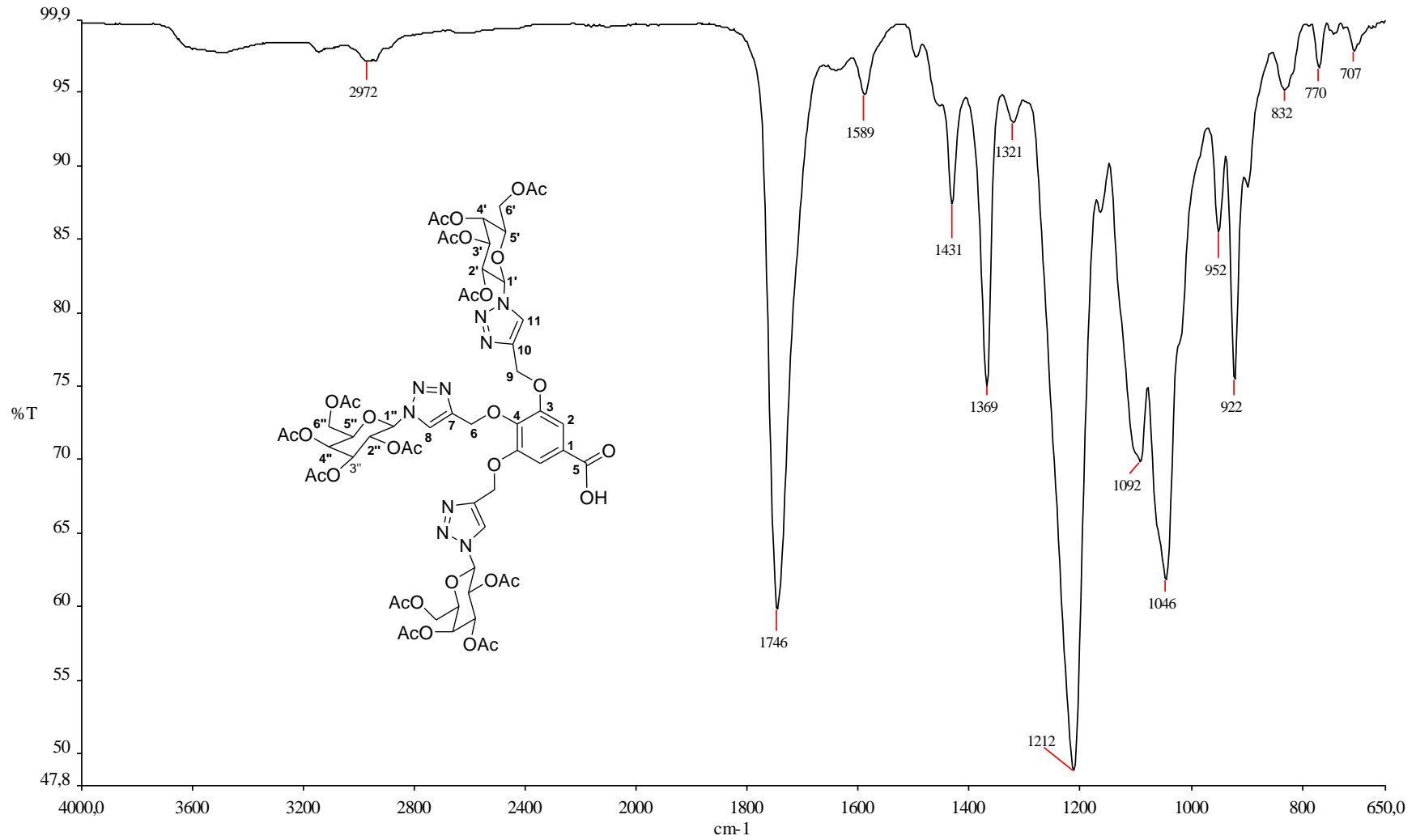
Figura A.42 – Espectro de absorção na região do IV do galactosiltriazol **24**.

Figura A.43 – Espectro de RMN de ^1H do galactosiltriazol **24** (400 MHz, CDCl_3).

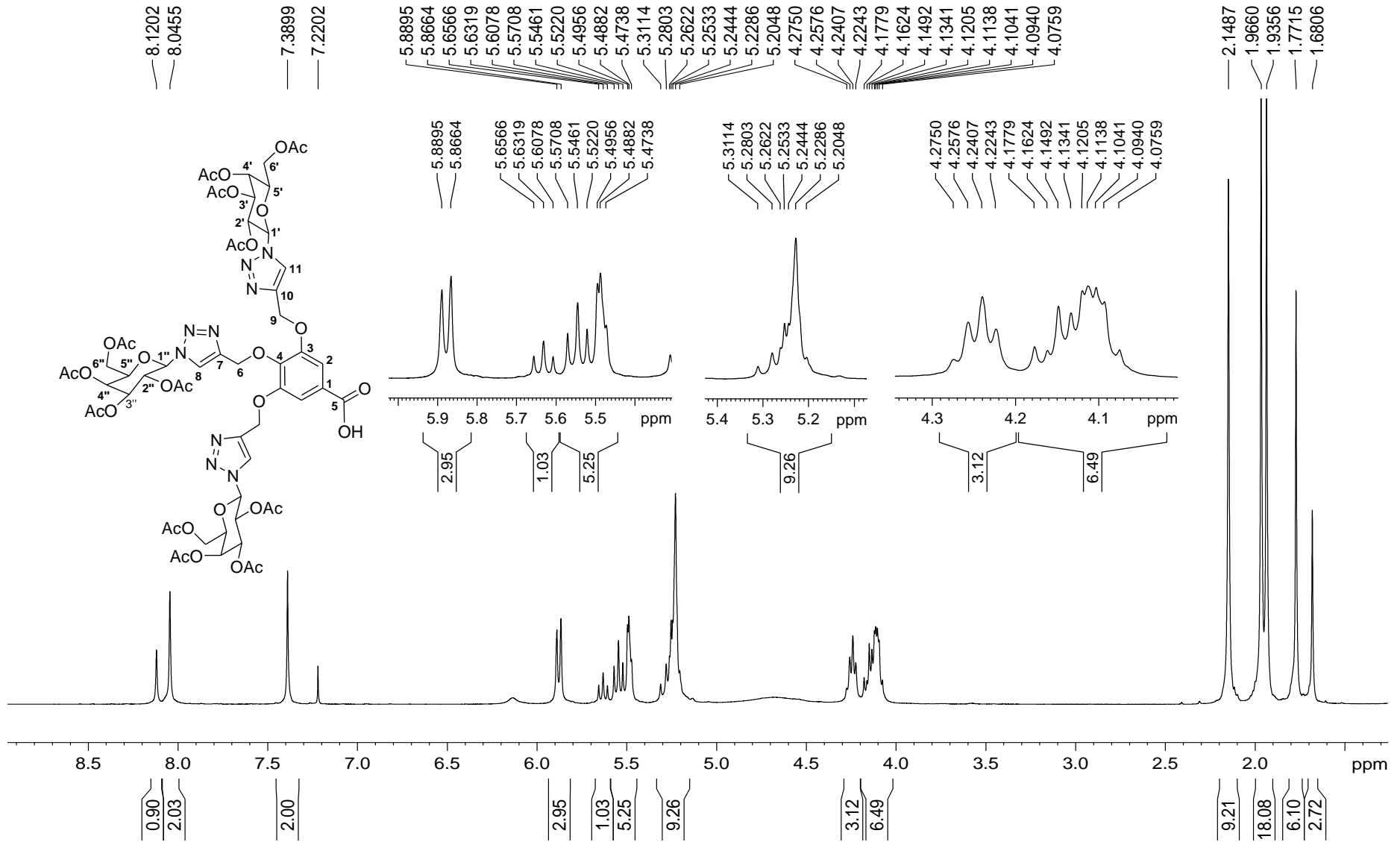


Figura A.44 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do galactosiltriazol **24** (100 MHz, CDCl_3).

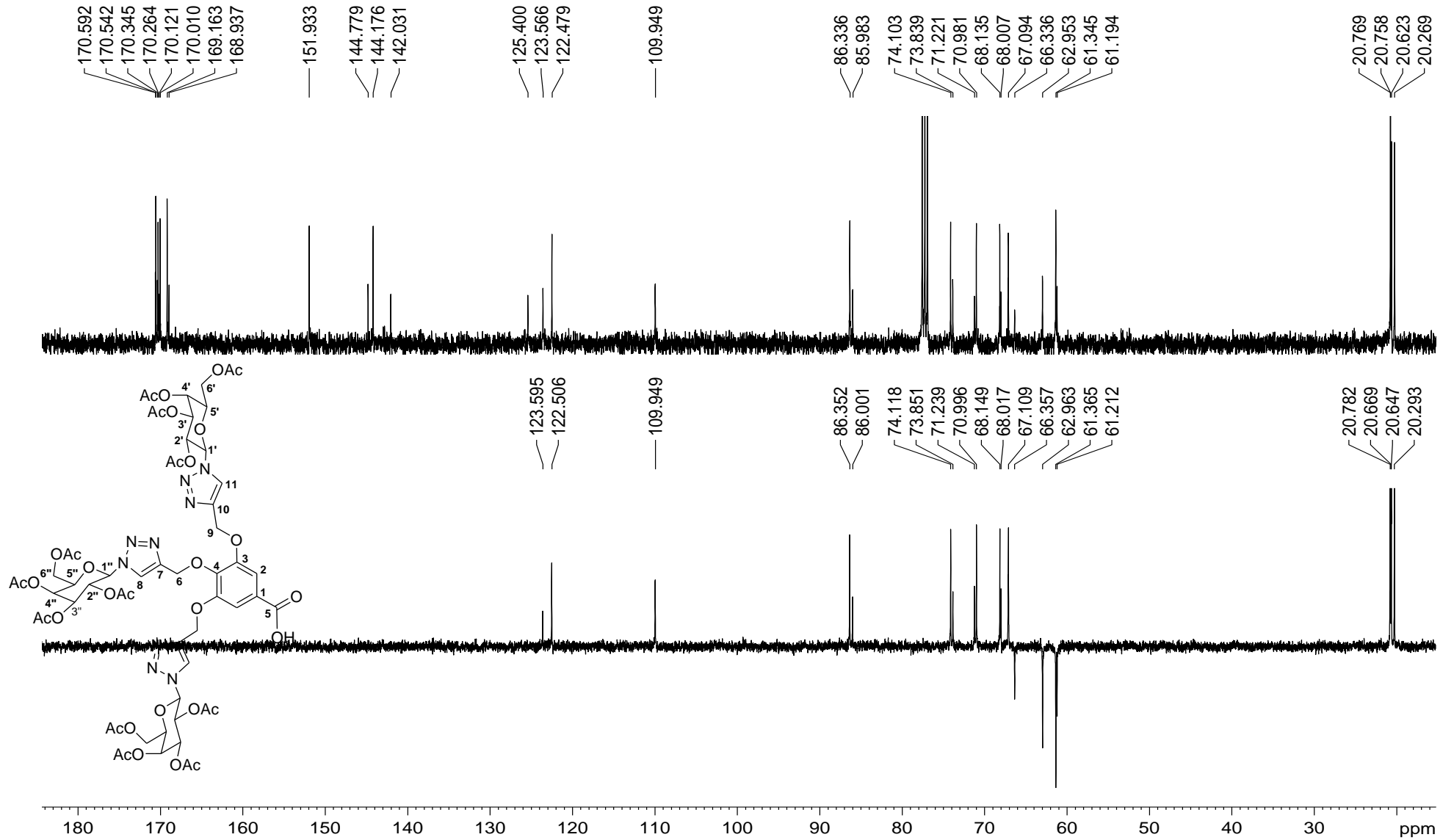


Figura A.45 – Mapa de contornos HMQC do galactosiltriazol **24** (400 MHz, CDCl₃).

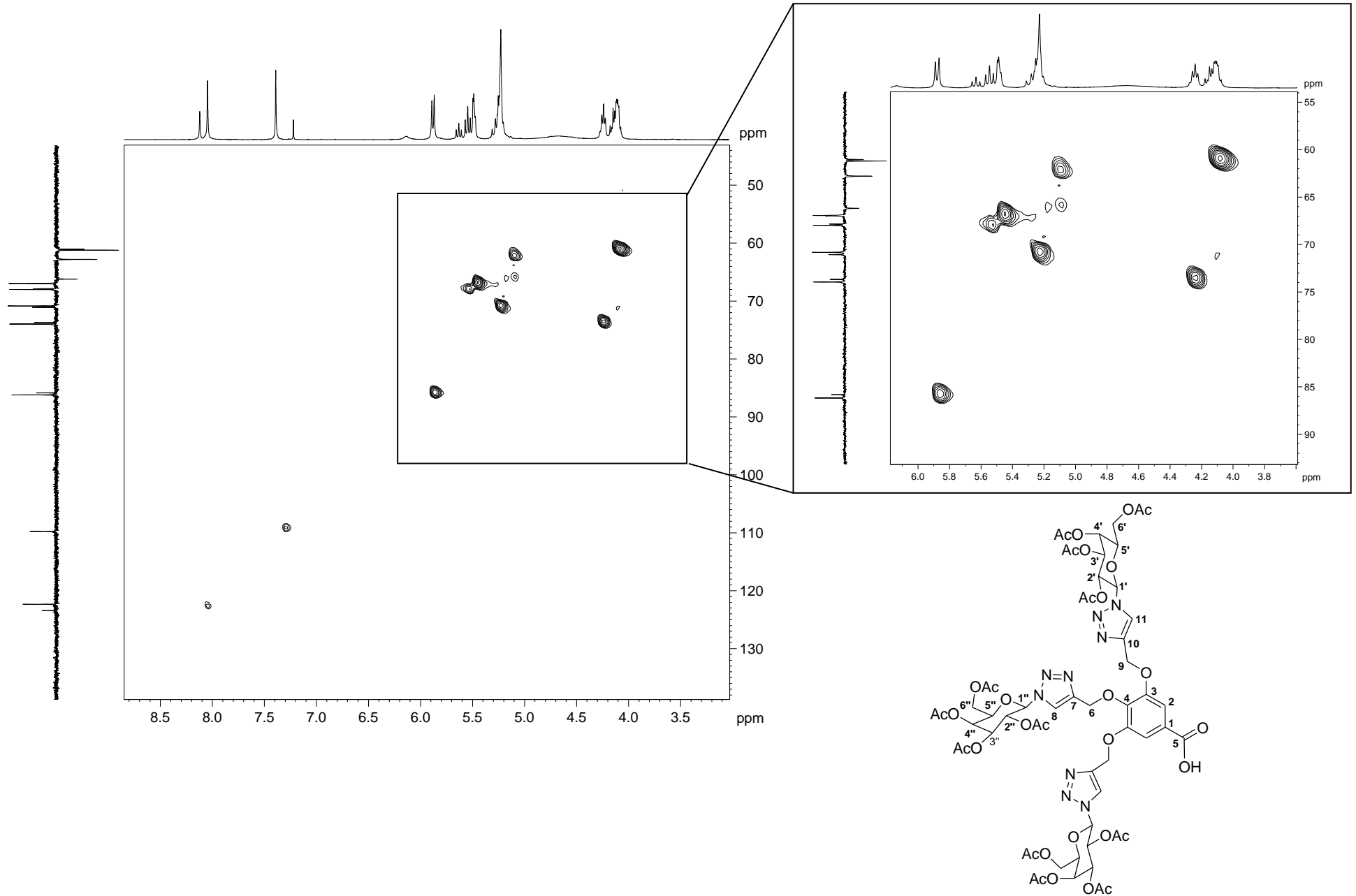


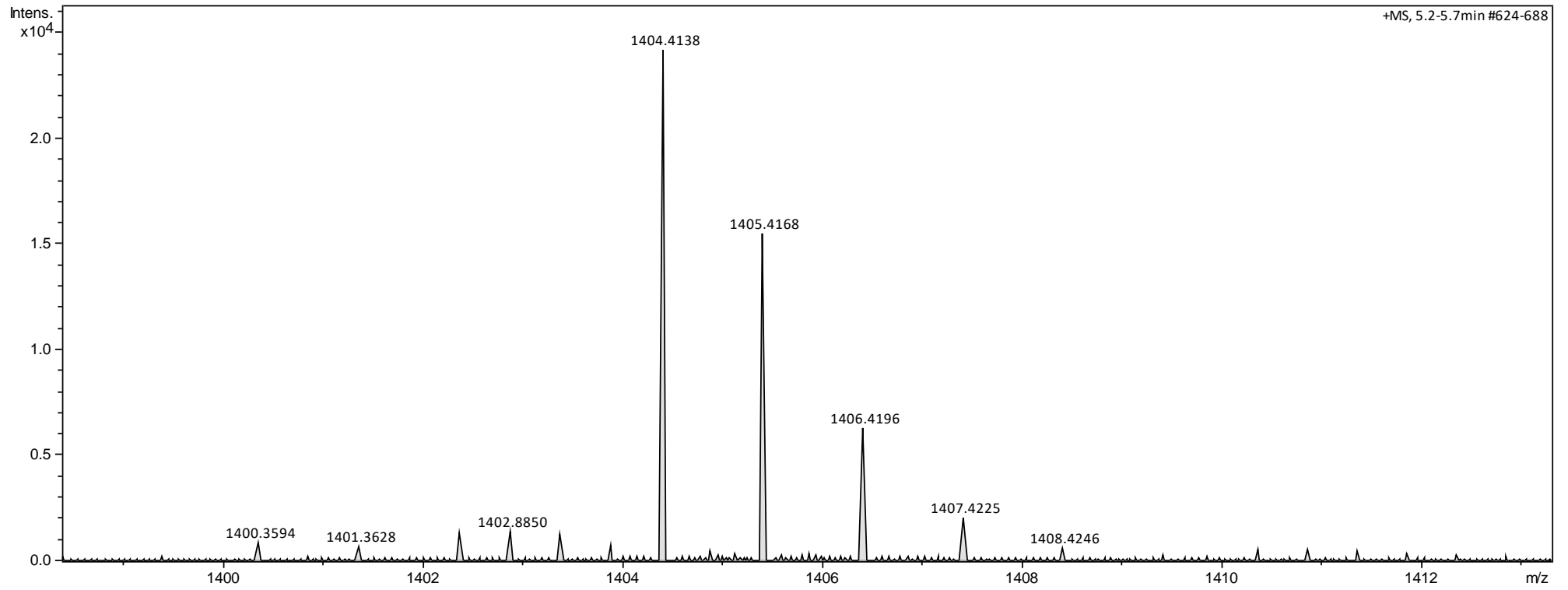
Figura A.46 – Espectro de massas (ESI) do galactosiltriazol **24**.

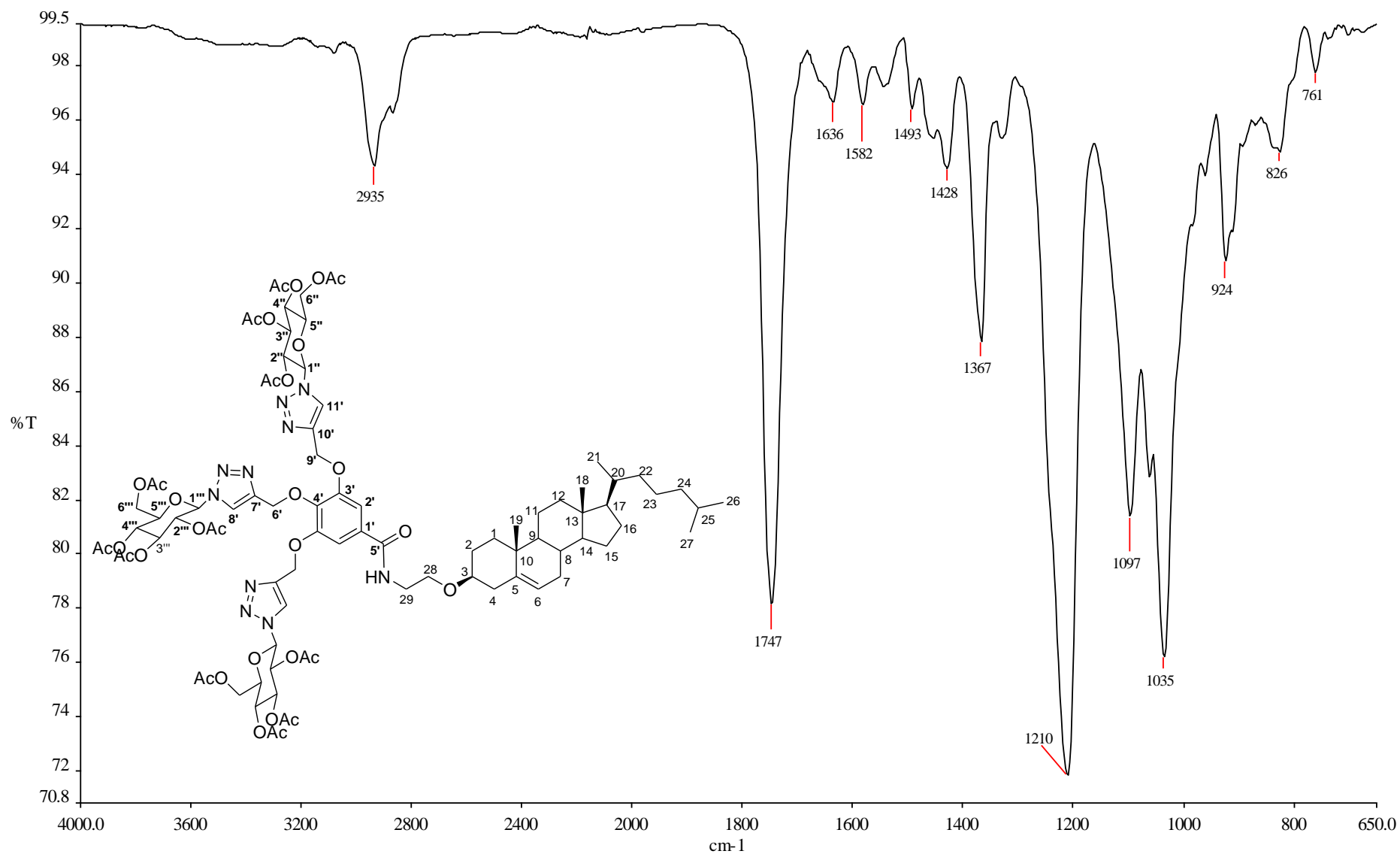
Figura A.47 – Espectro de absorção na região do IV do glicosiltriazol **26**.

Figura A.48 – Espectro de RMN de ^1H do glicosiltriazol **26** (400 MHz, CDCl_3).

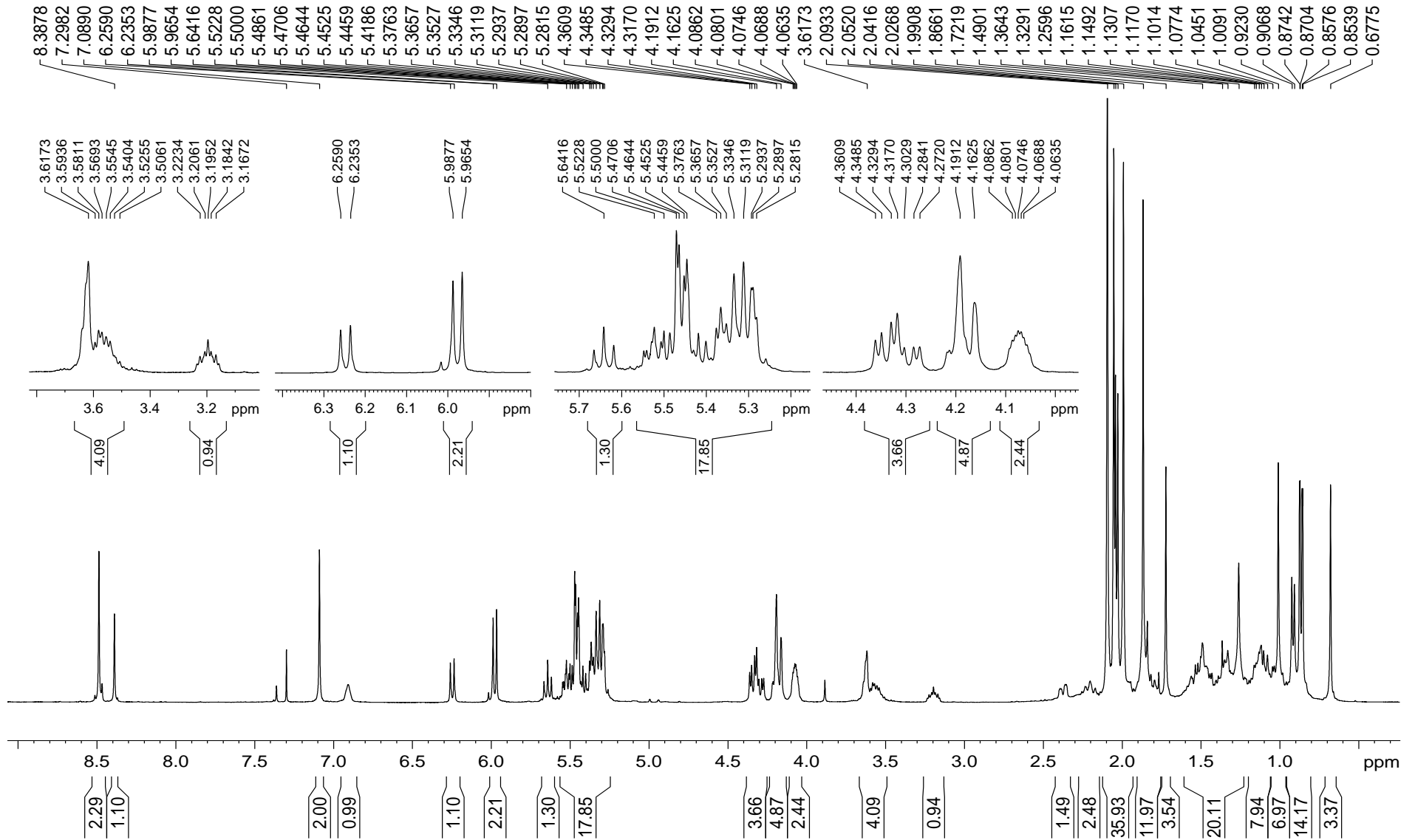


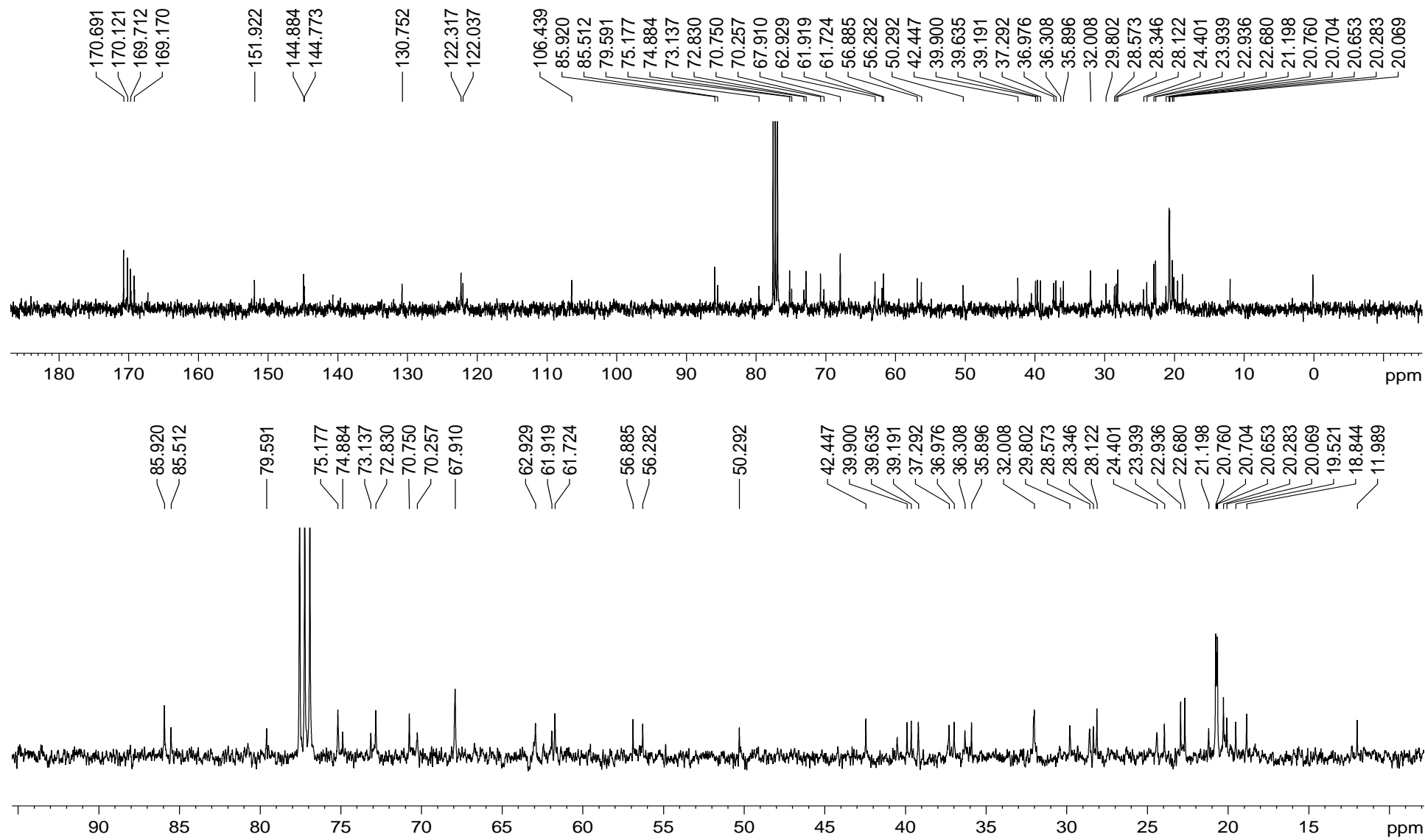
Figura A.49 – Espectro de RMN de ^{13}C do glicosiltriazol **26** (100 MHz, CDCl_3).

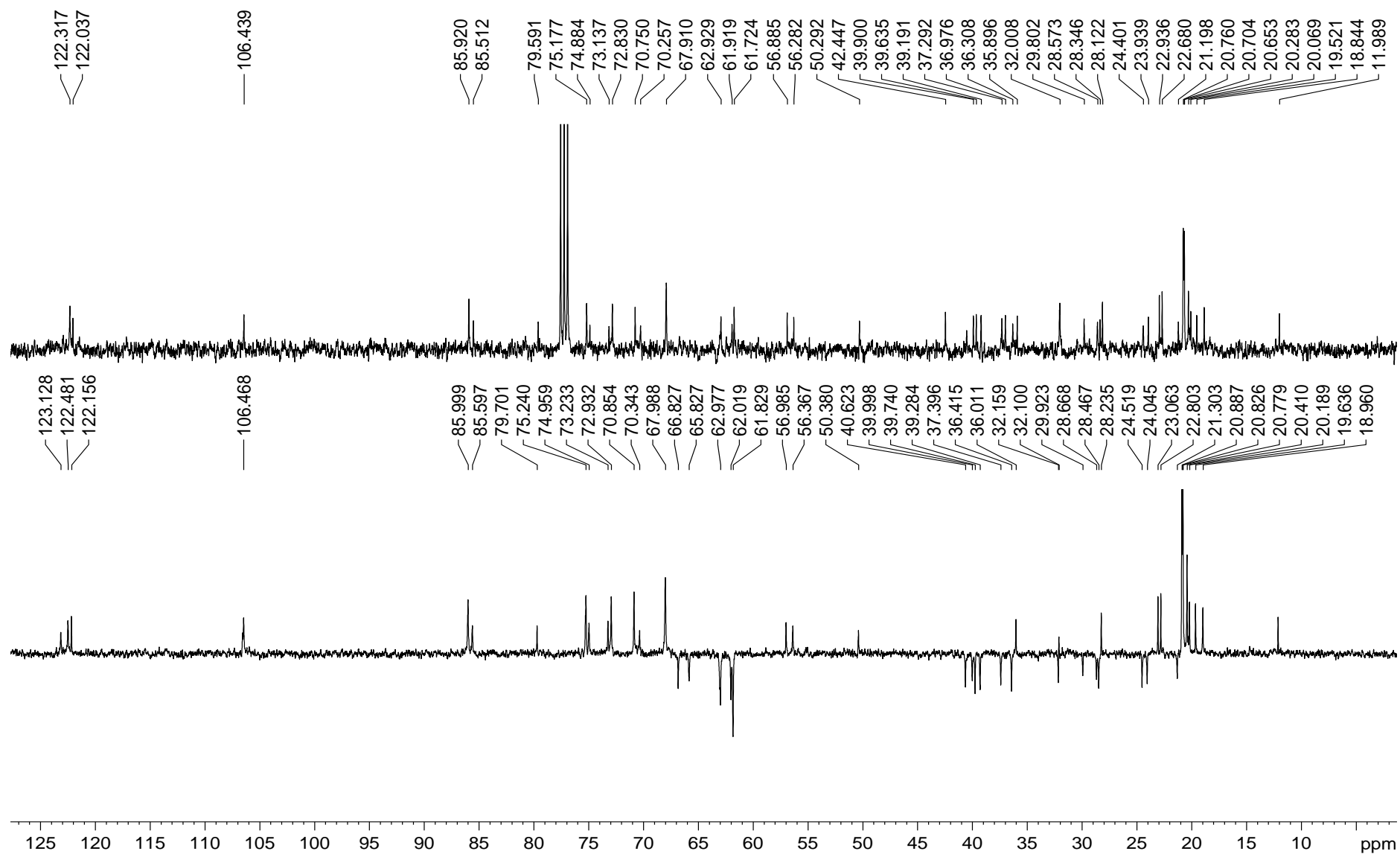
Figura A.50 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do glicosiltriazol **26** (100 MHz, CDCl_3).

Figura A.51 – Espectro de massas (MALDI-TOF) do glicosiltriazol **26**.

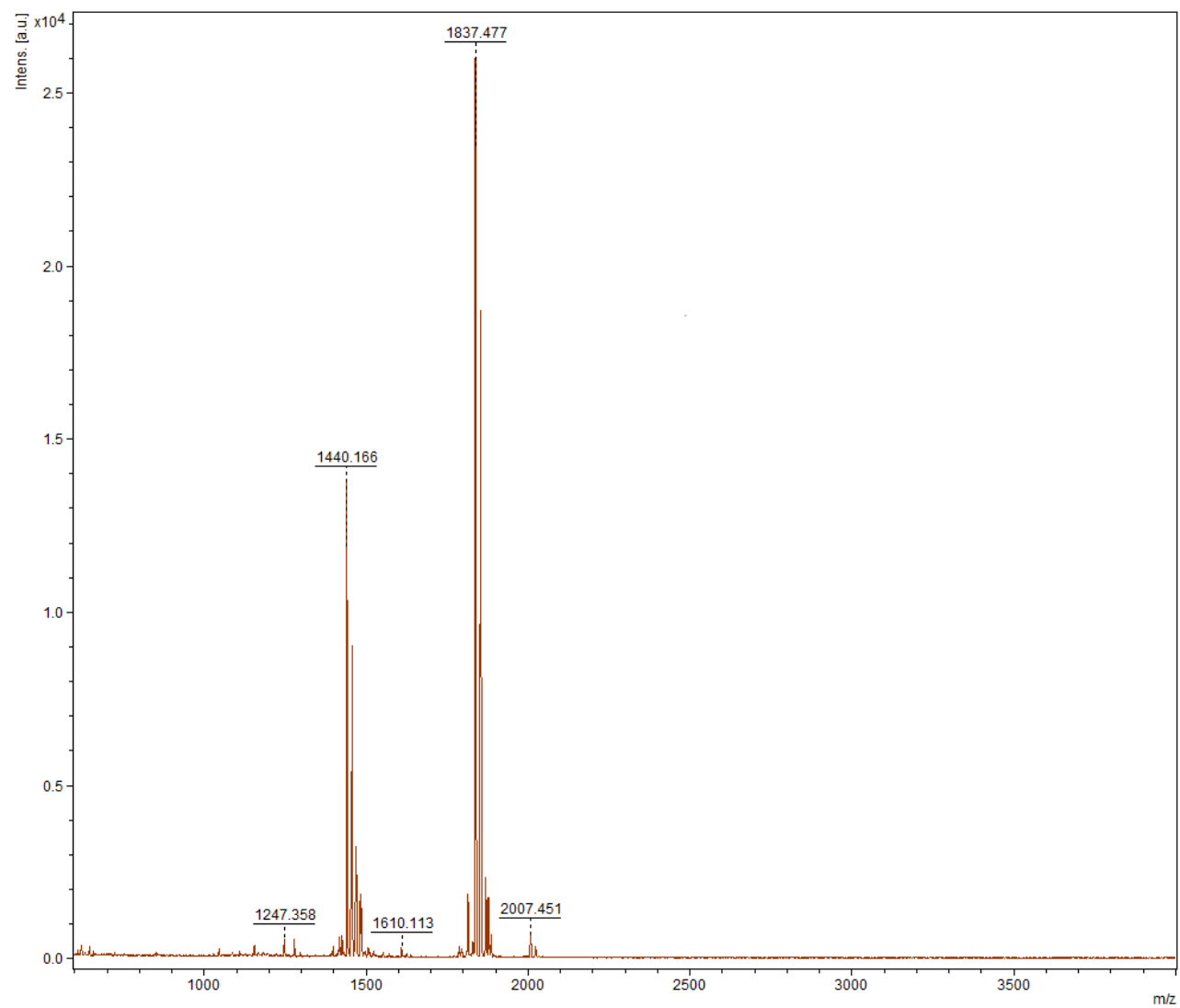


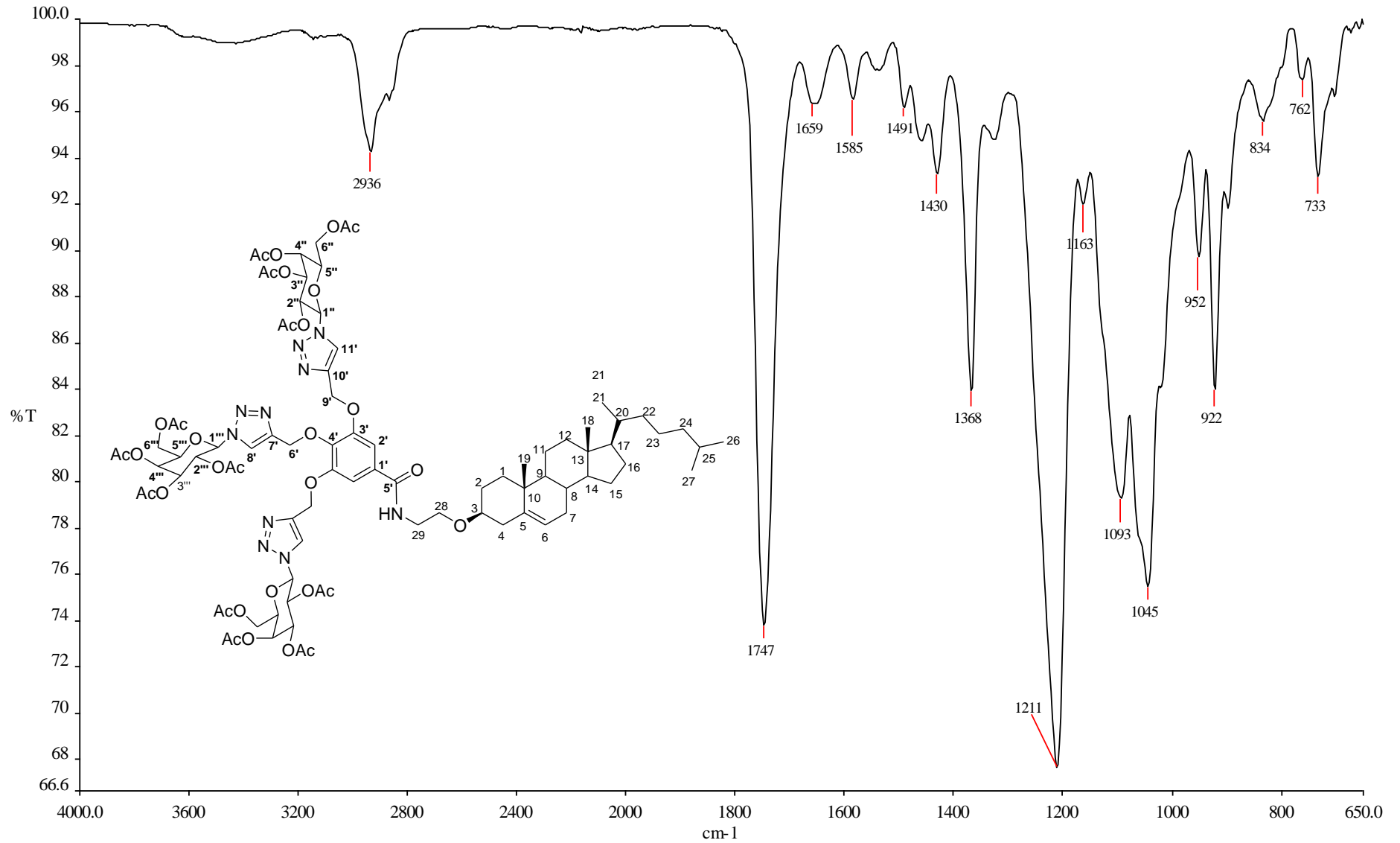
Figura A.52 – Espectro de absorção na região do IV do galactosiltriazol **27**.

Figura A.53 – Espectro de RMN de ^1H do galactosiltriazol **27** (400 MHz, CDCl_3).

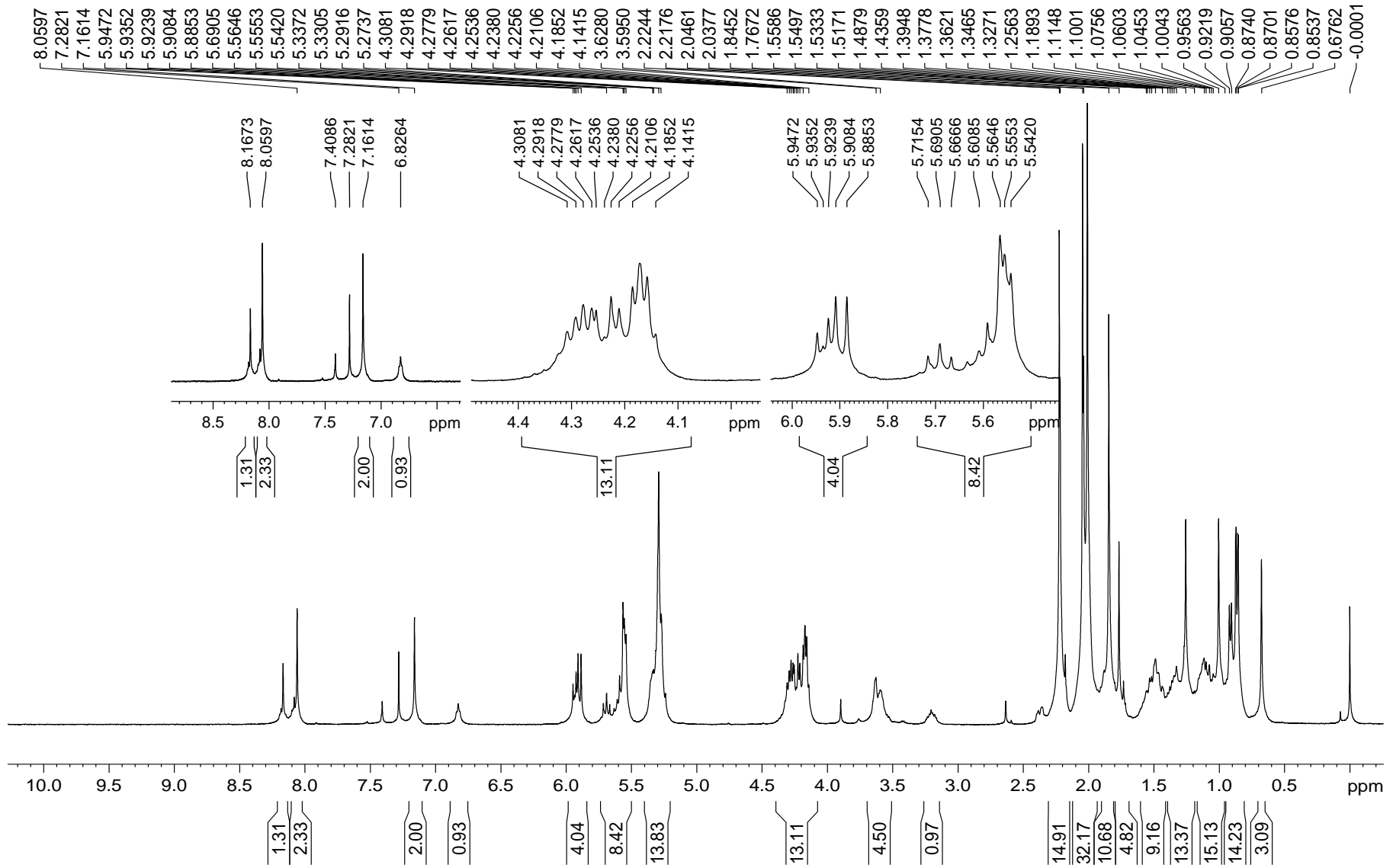


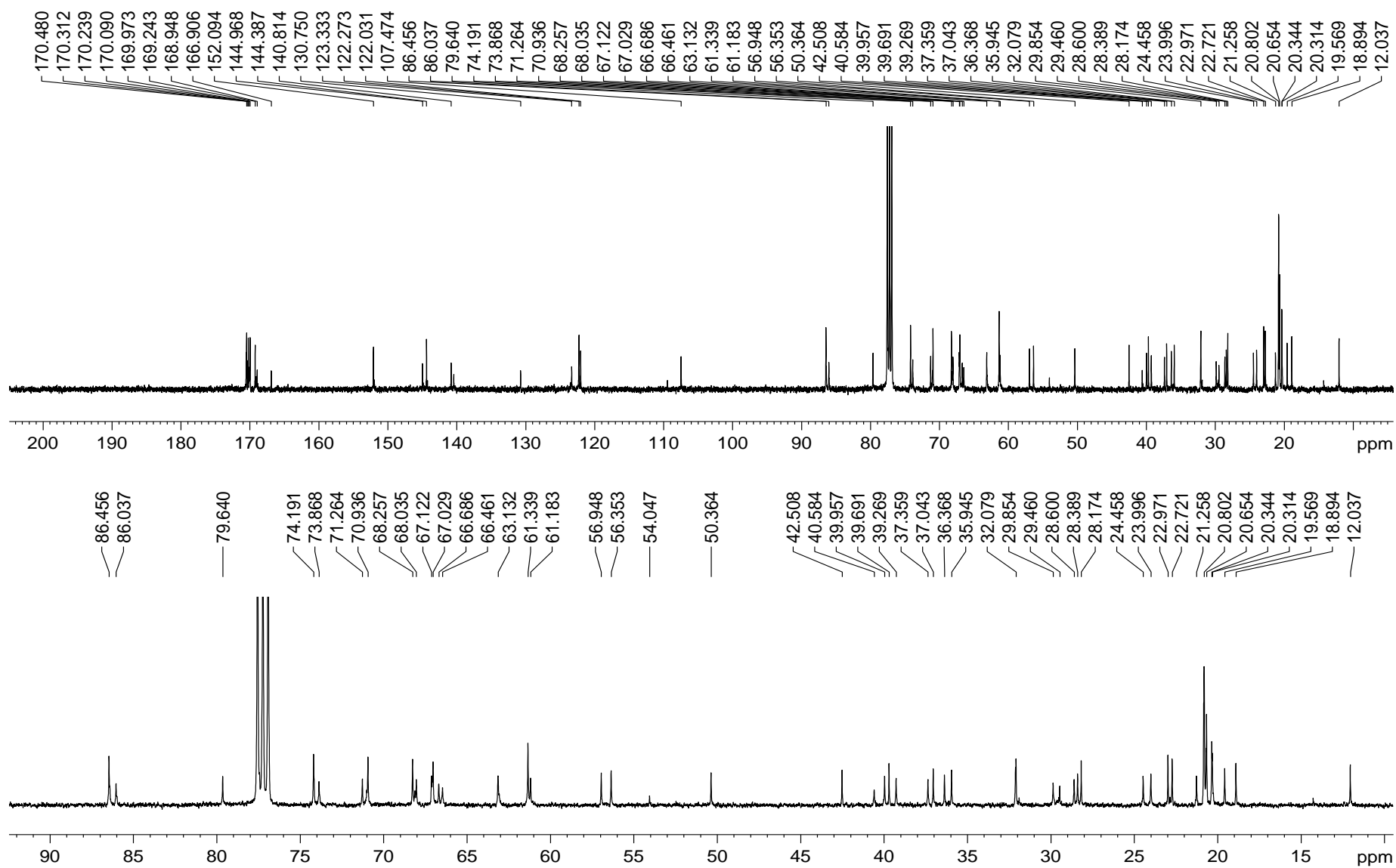
Figura A.54 – Espectro de RMN de ^{13}C do galactosiltriazol **27** (100 MHz, CDCl_3).

Figura A.55 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do galactosiltriazol **27** (100 MHz, CDCl_3).

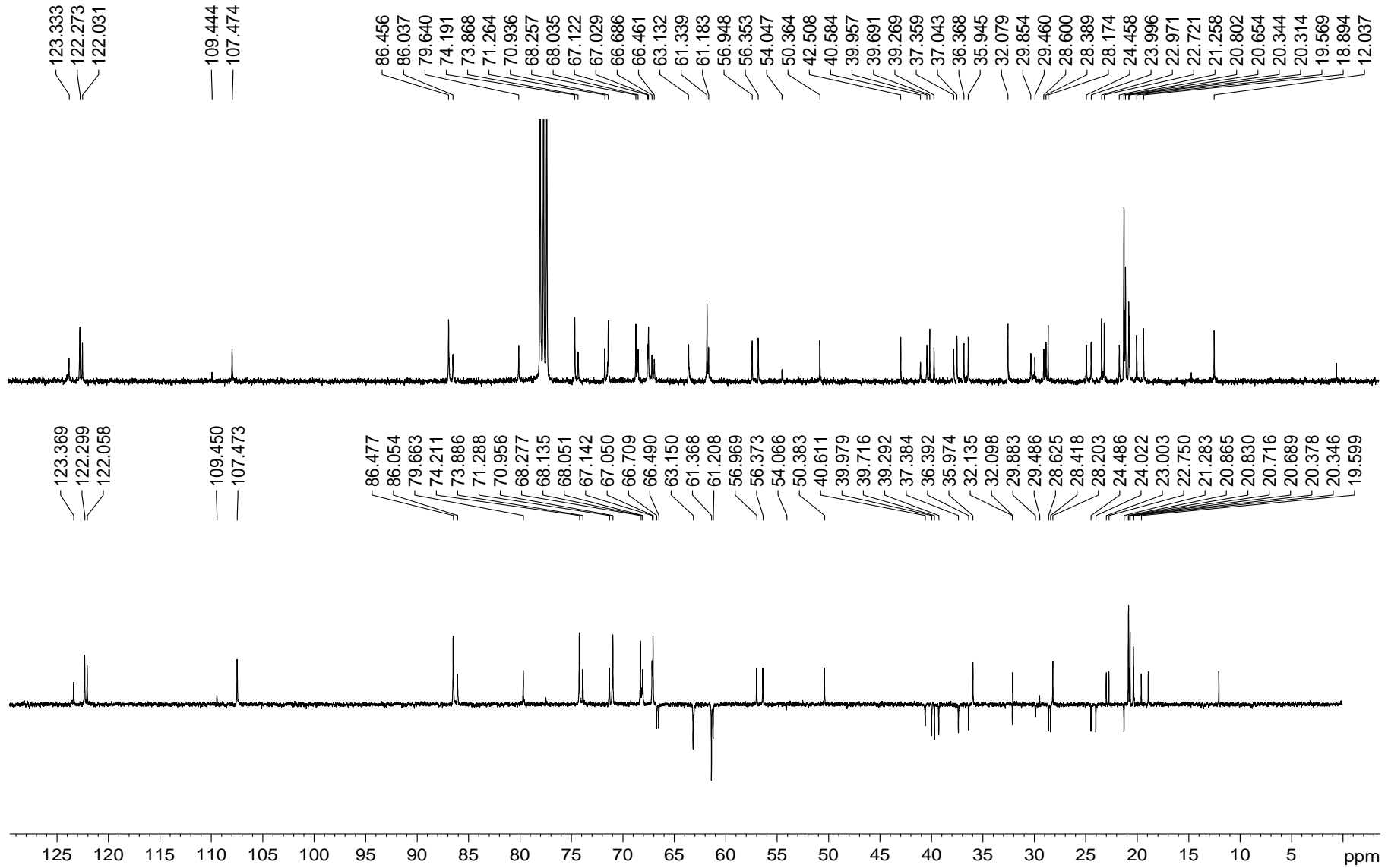


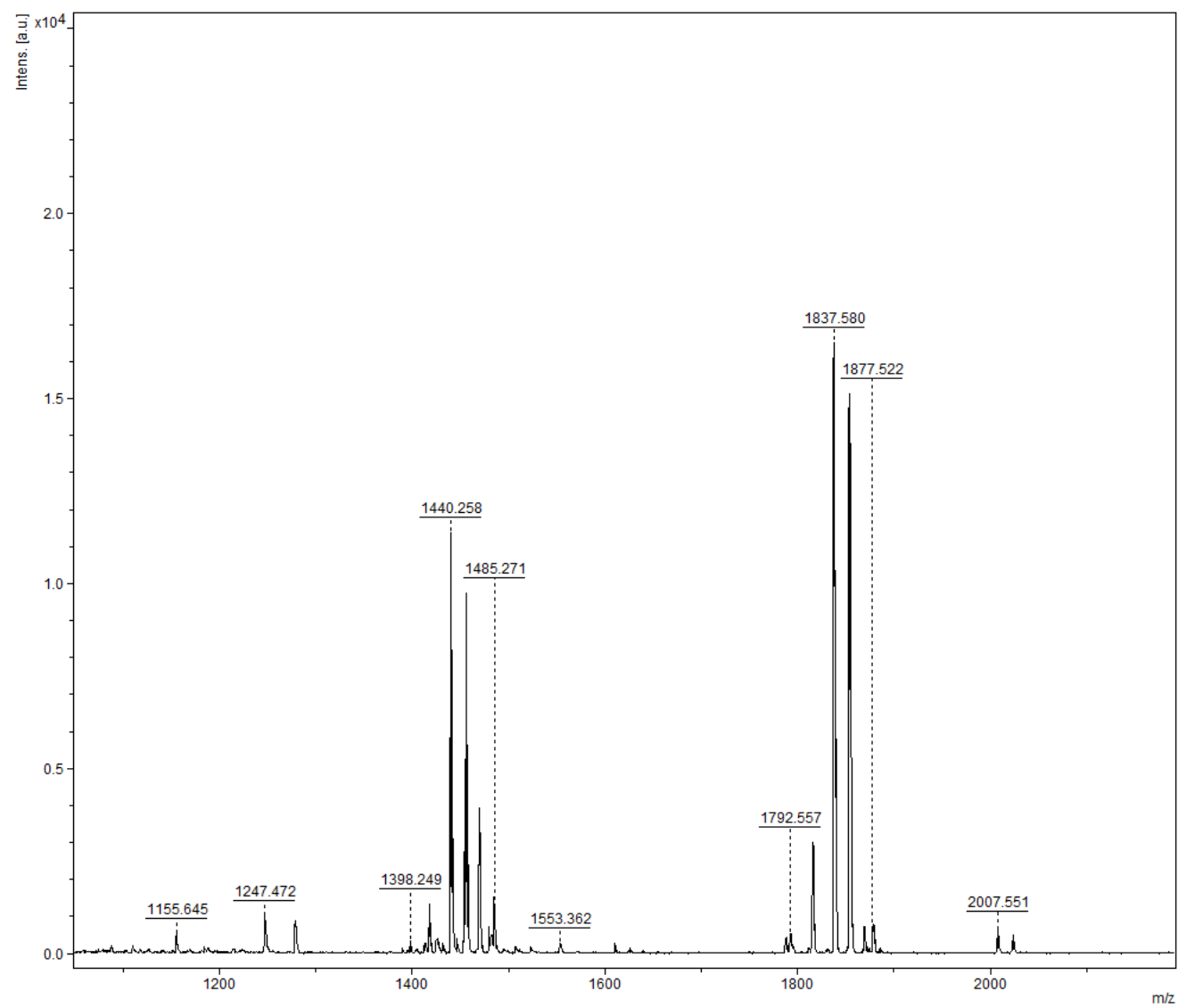
Figura A.56 – Espectro de massas (MALDI-TOF) do galactosiltriazol **27**.

Figura A.57 – Espectro de absorção na região do IV de 28.

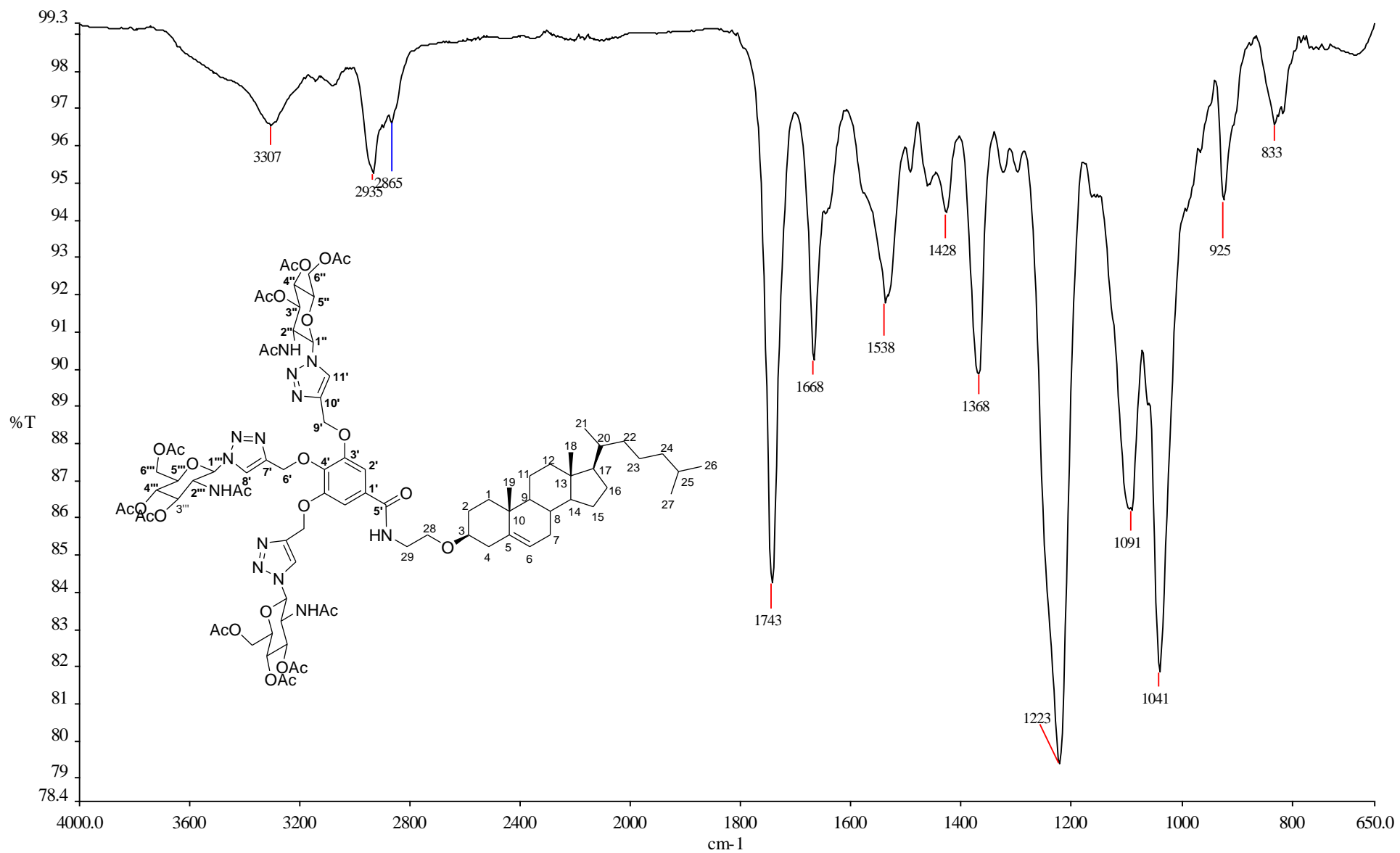


Figura A.58 – Espectro de RMN de ^1H de **28** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

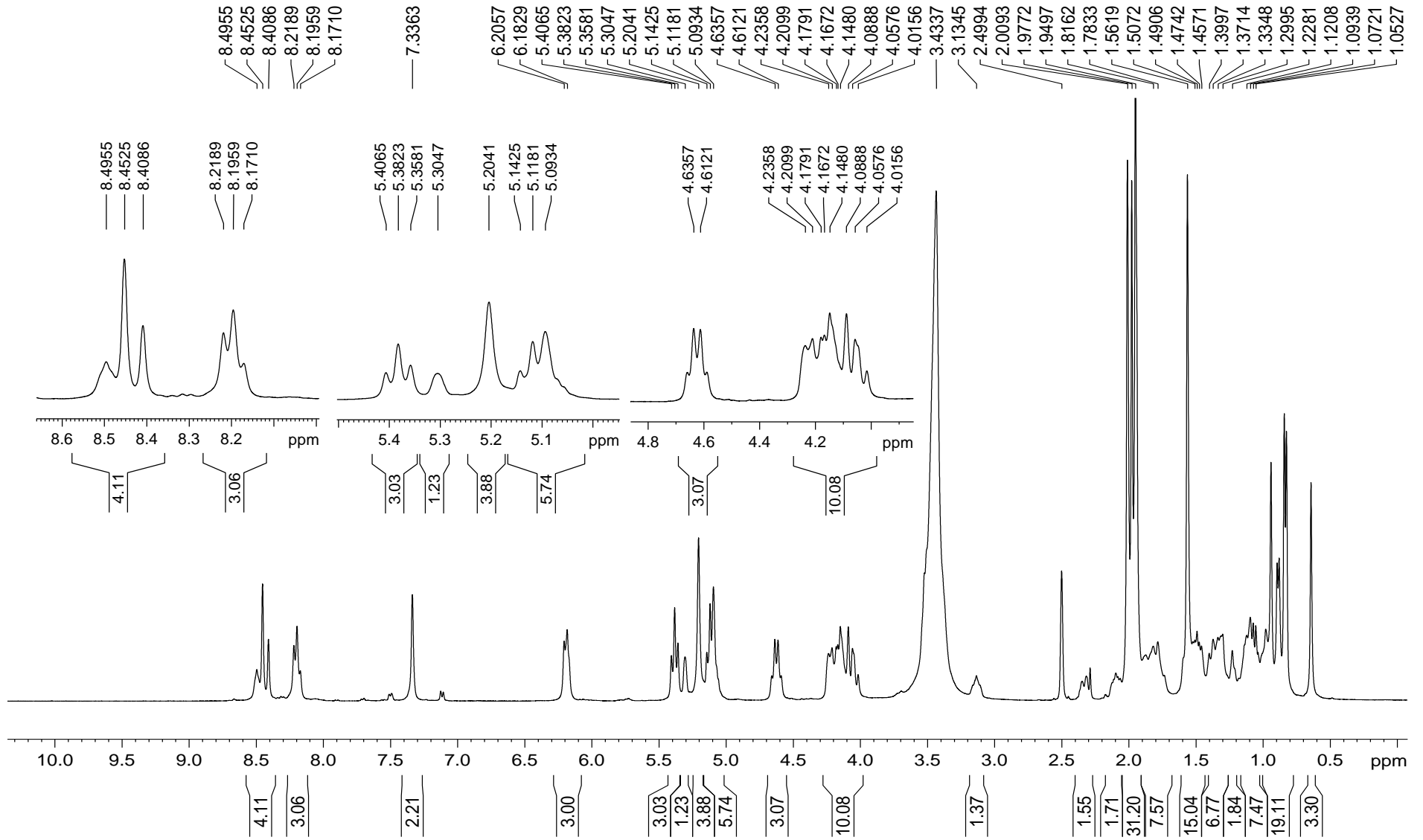


Figura A.59 – Espectro de RMN de ^{13}C de **28** (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

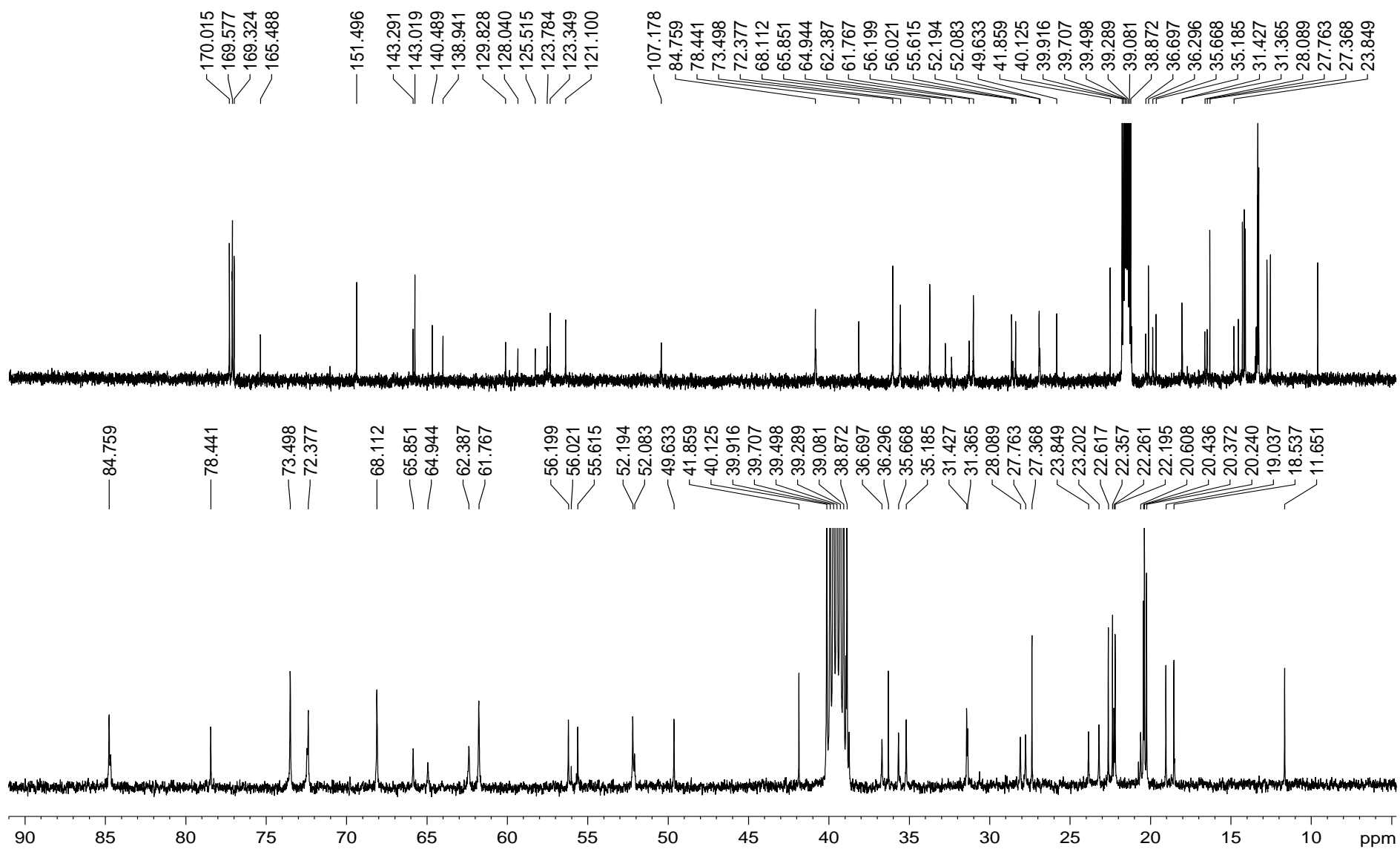


Figura A.60 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **28**. (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

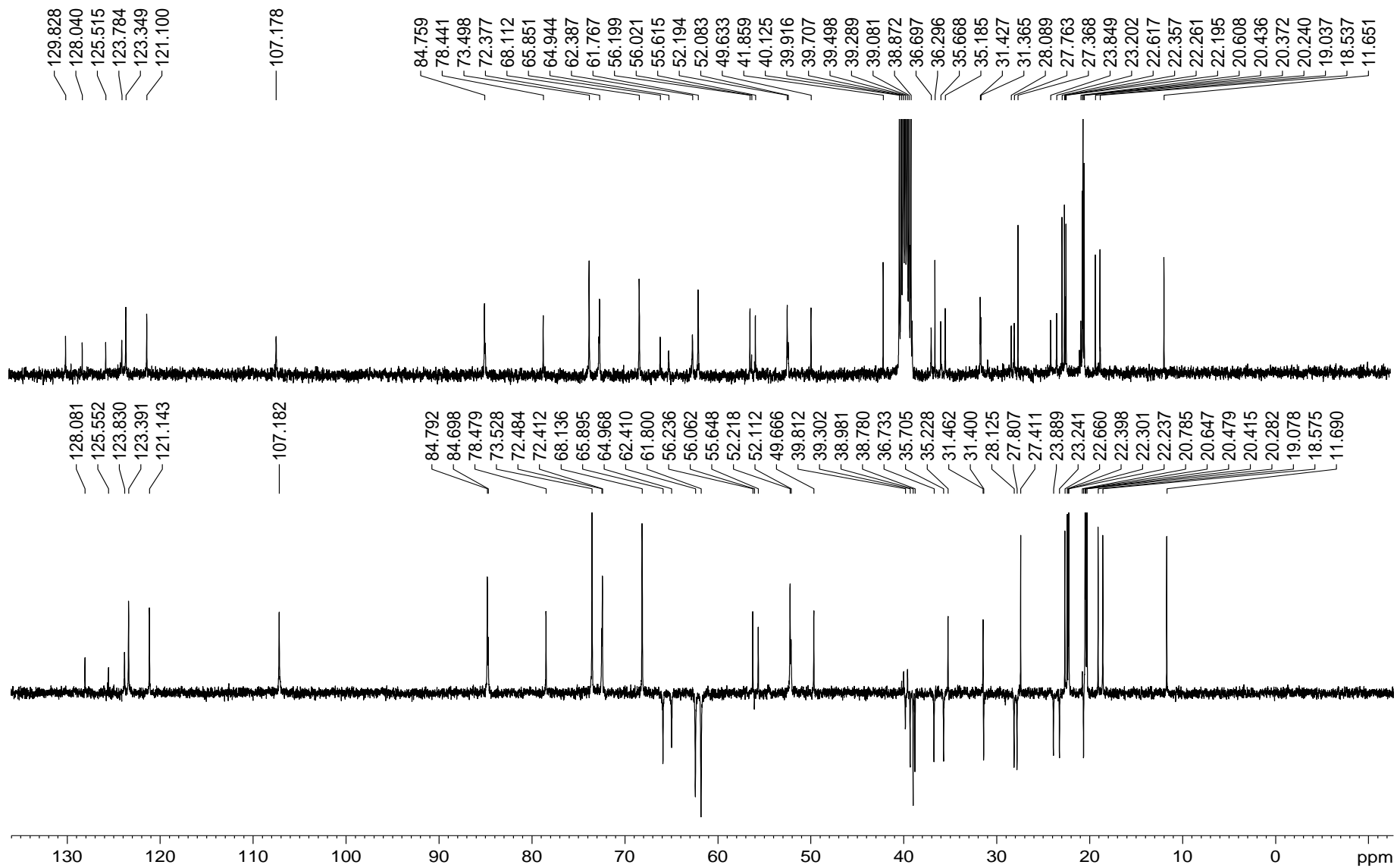


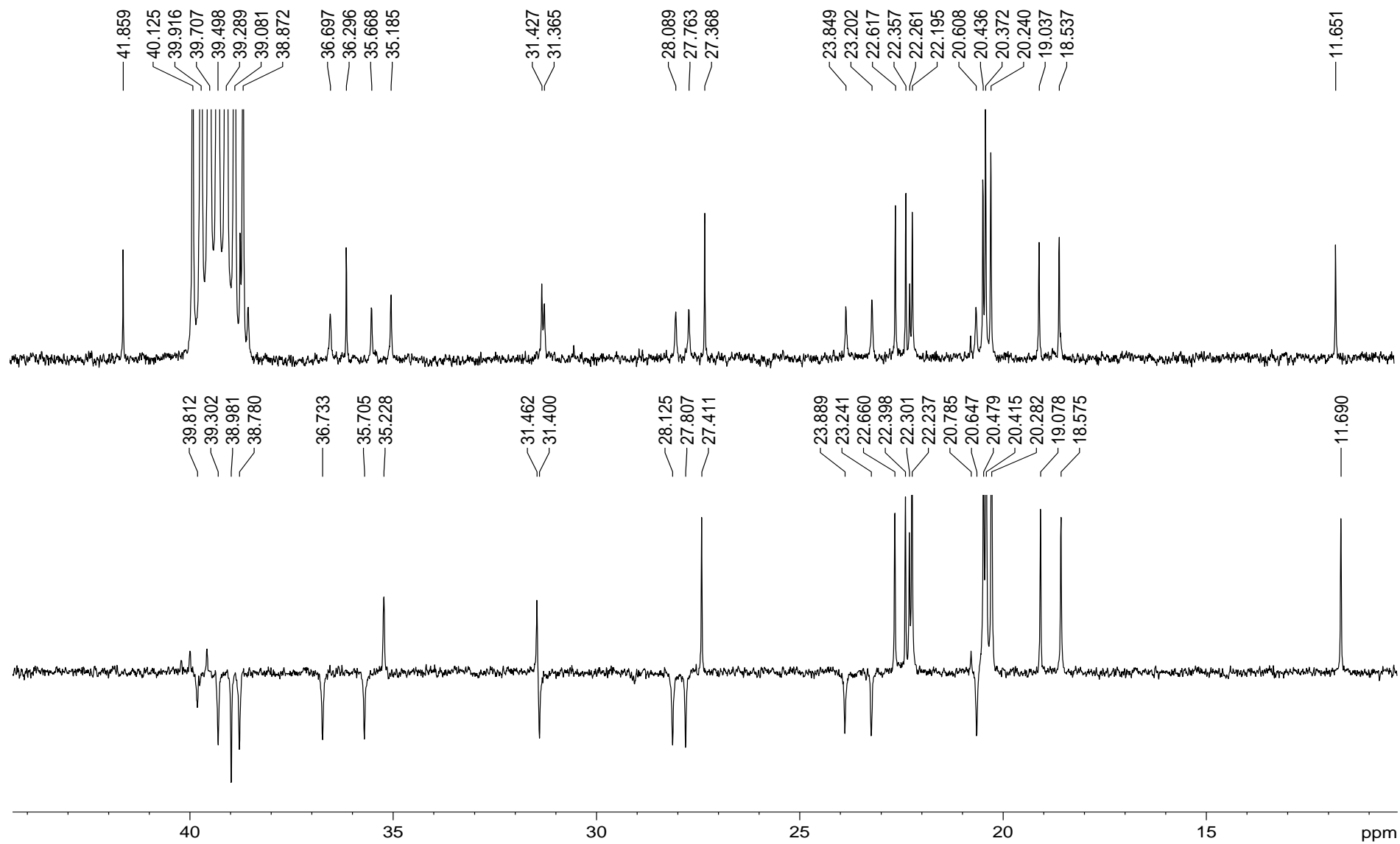
Figura A.61 – Subespectro DEPT-135 do **28**. (100 MHz, DMSO-*d*₆).

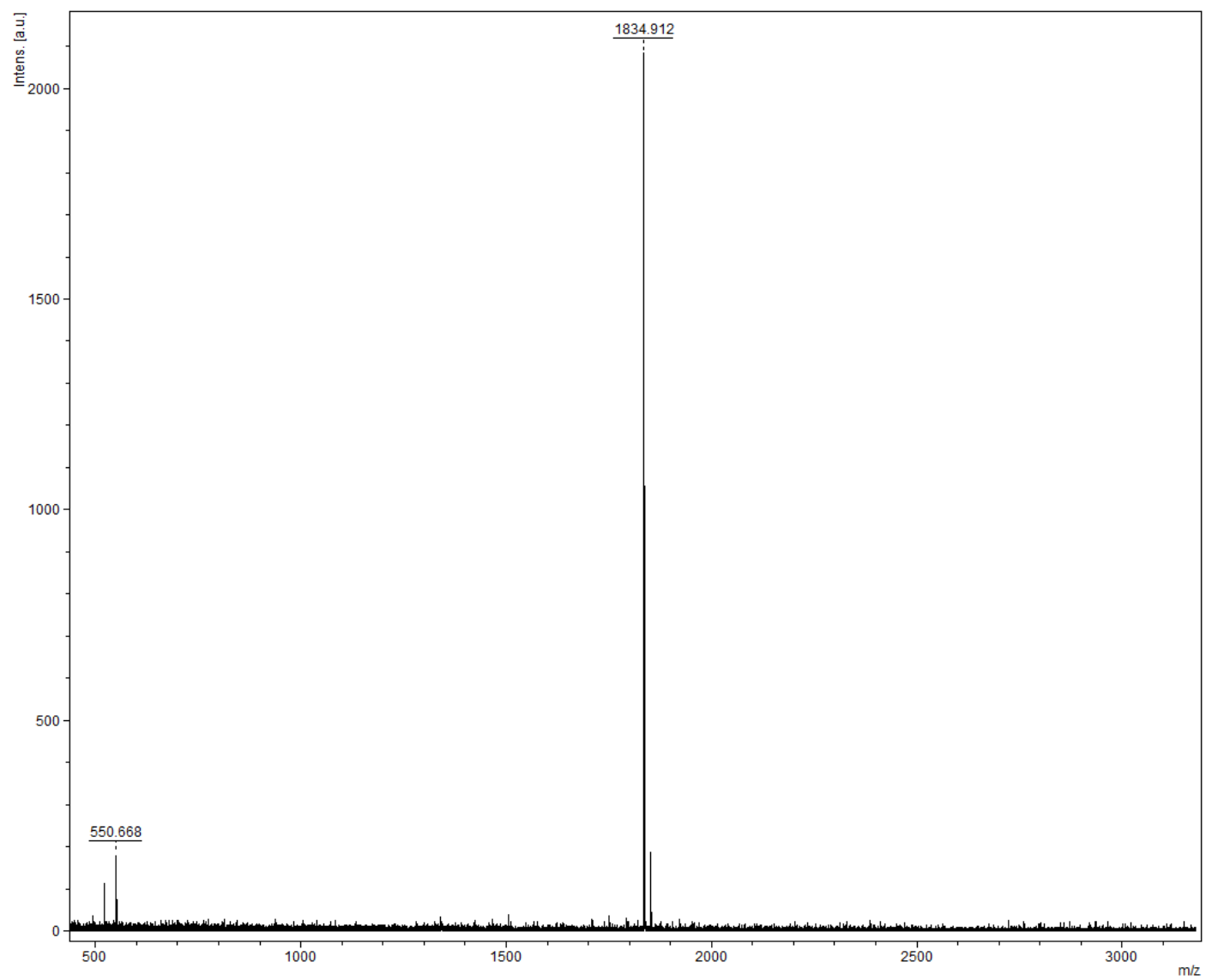
Figura A.62 – Espectro de massas (MALDI-TOF) de **28**.

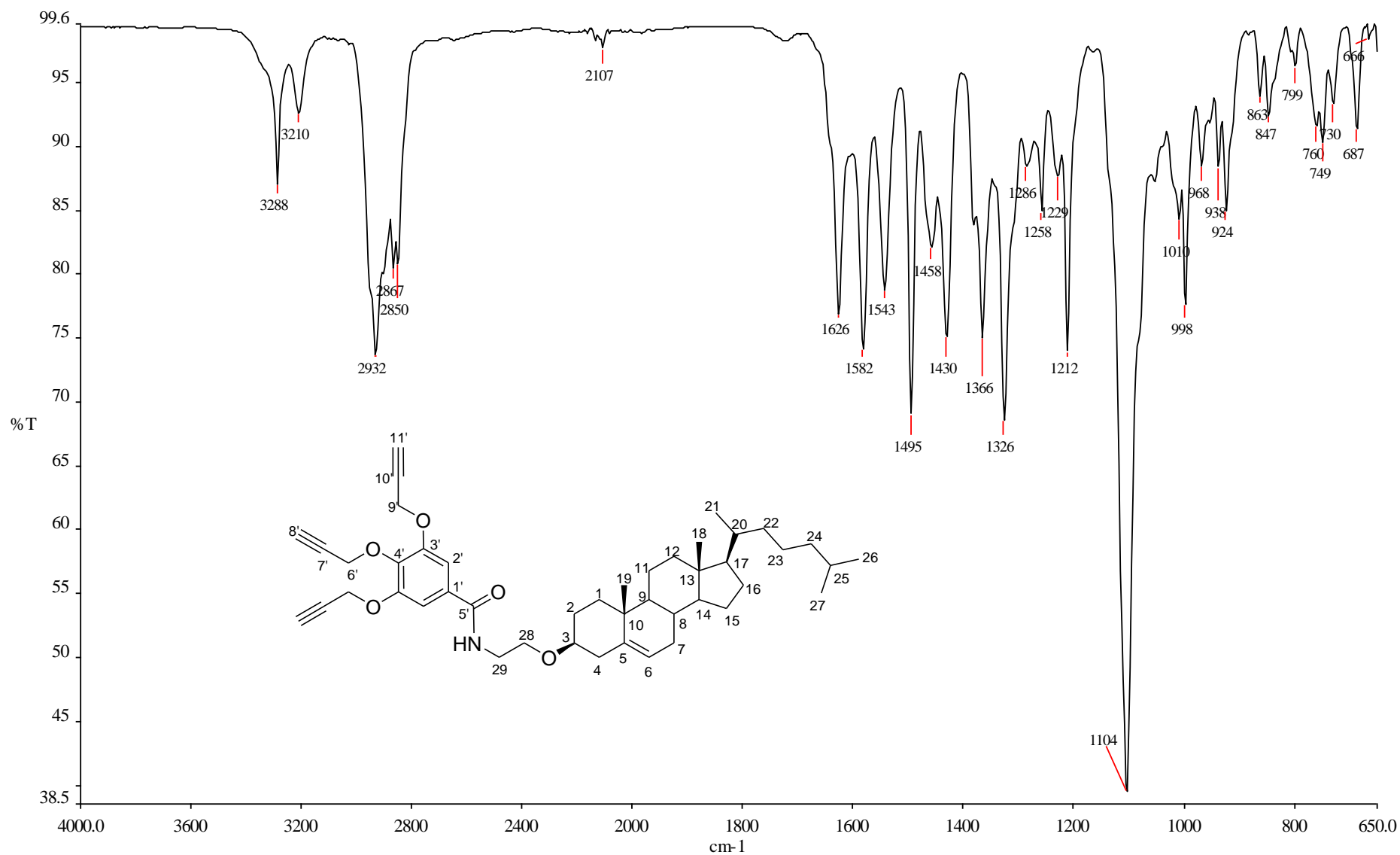
Figura A.63 – Espectro de absorção na região do IV de **29**.

Figura A.64 – Espectro de RMN de ^1H de **29** (400 MHz, CDCl_3).

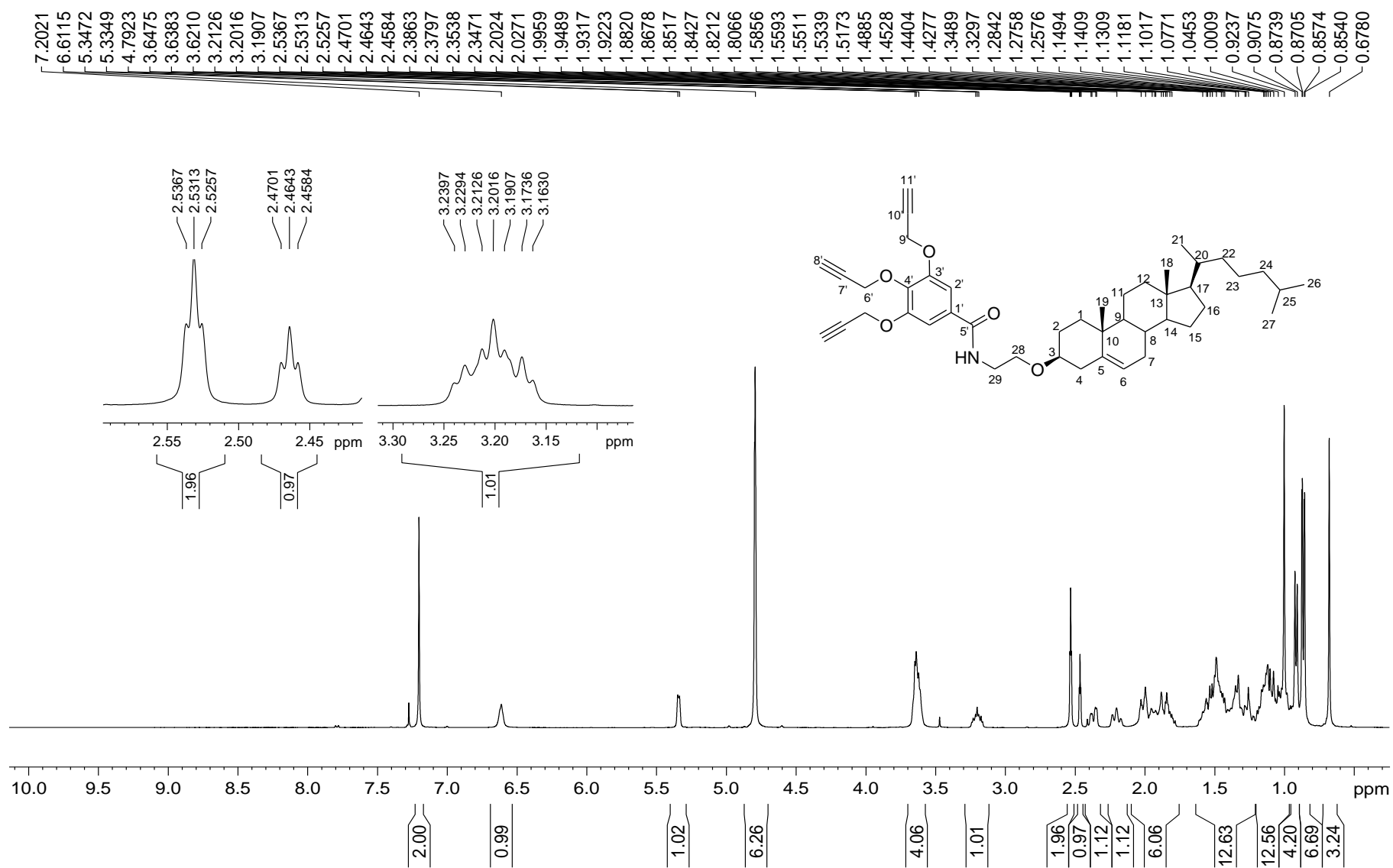


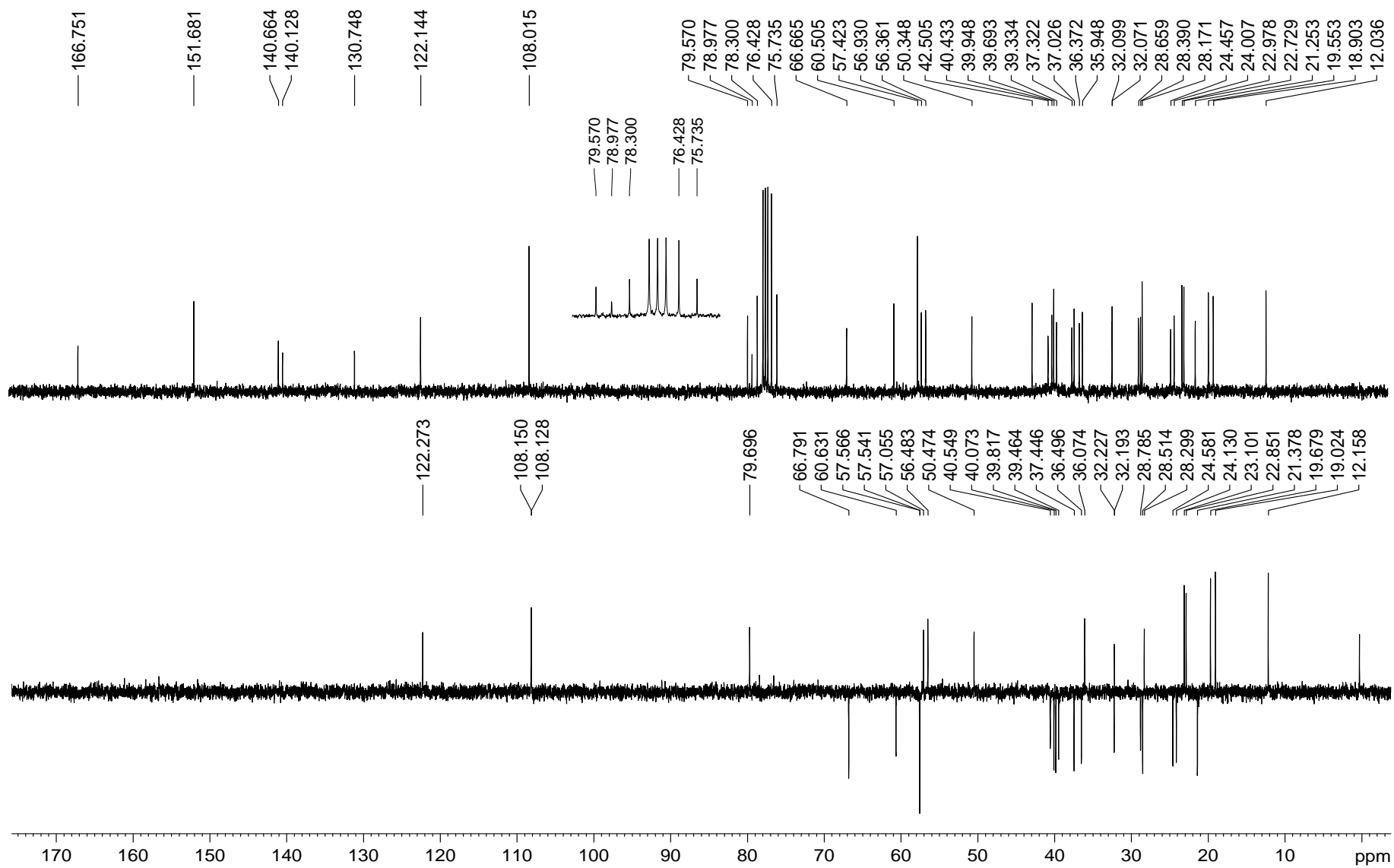
Figura A.65 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **29** (100 MHz, CDCl_3).

Figura A.66 – Espectro de massas (LC-MS-ESI) de **29**.

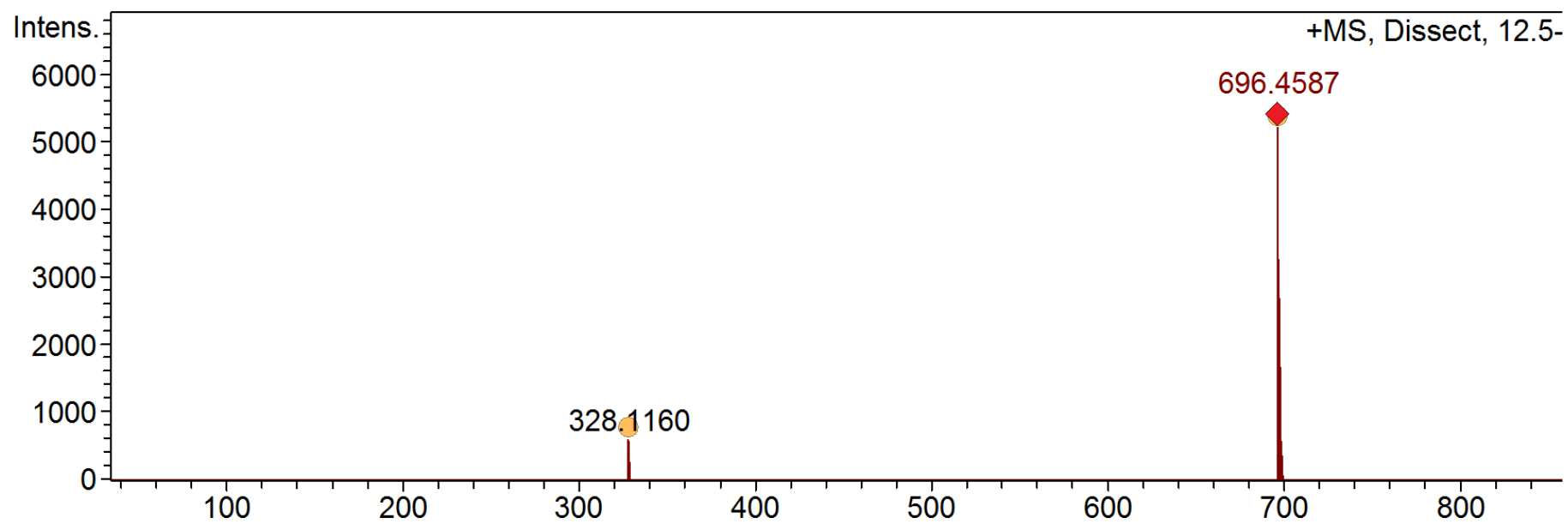


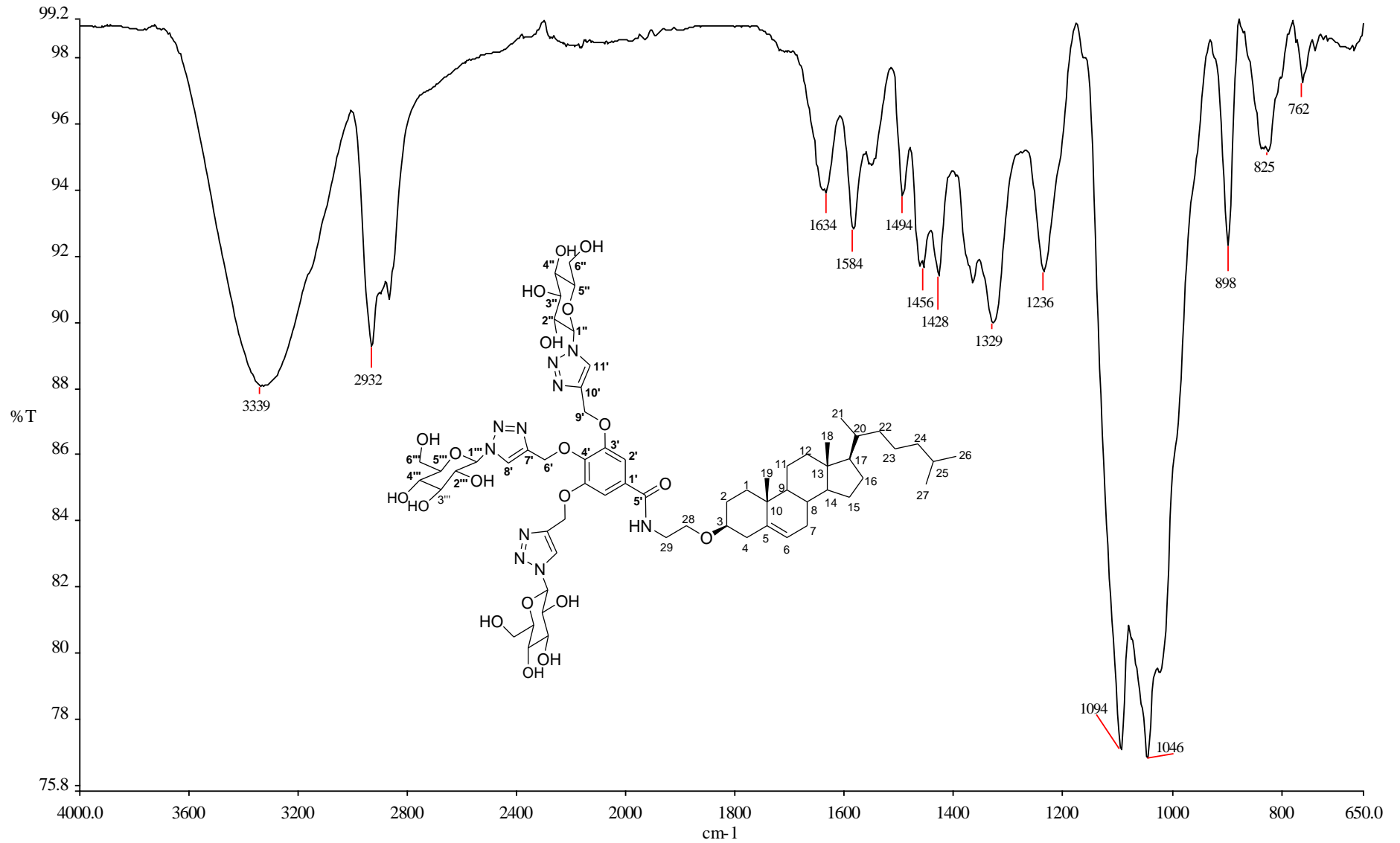
Figura A.67 – Espectro de absorção na região do IV do glicosiltriazol **30**.

Figura A.68 – Espectro de RMN de ^1H do glicosiltriazol **30** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

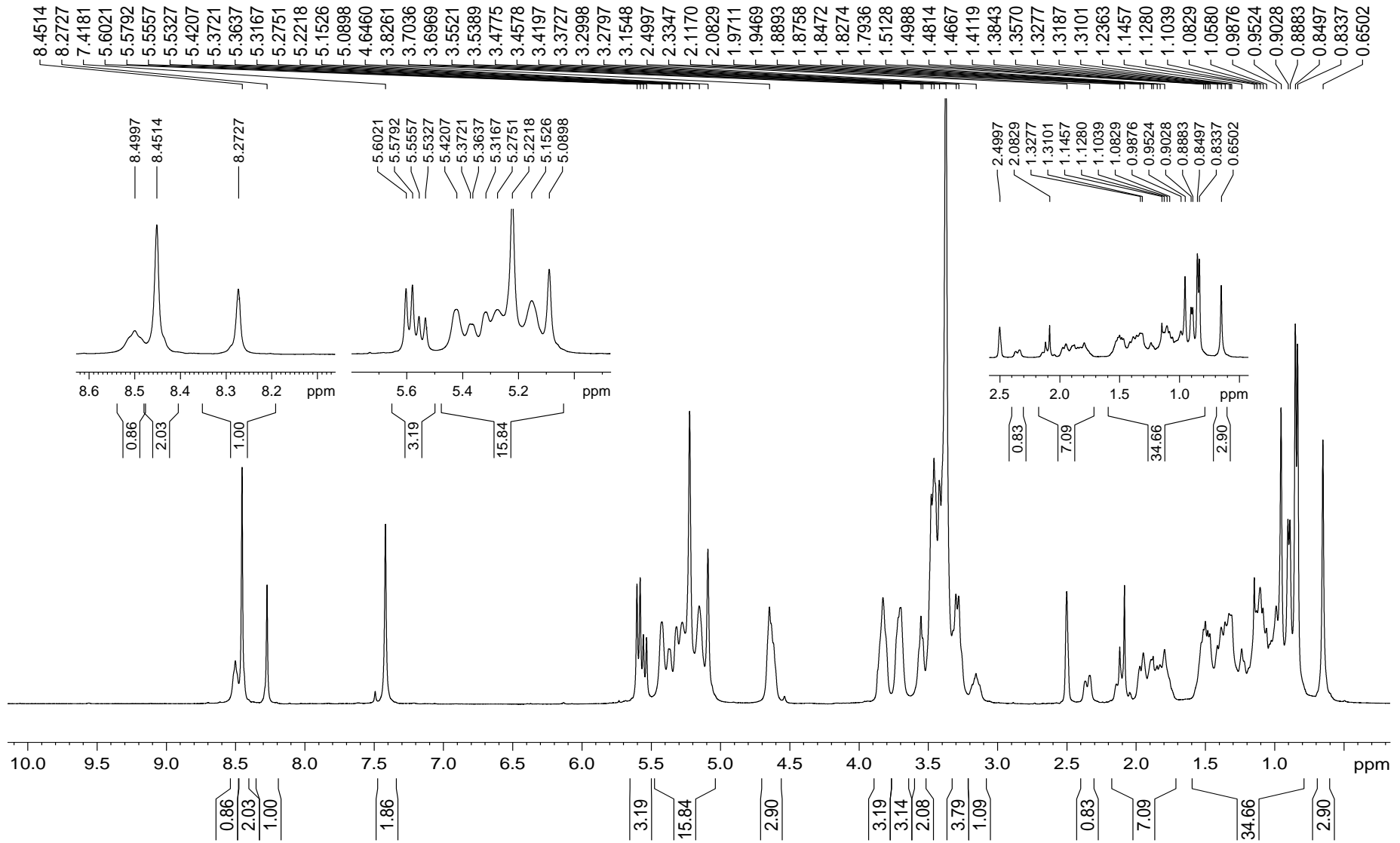


Figura A.69 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 do glicosiltriazol **30** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

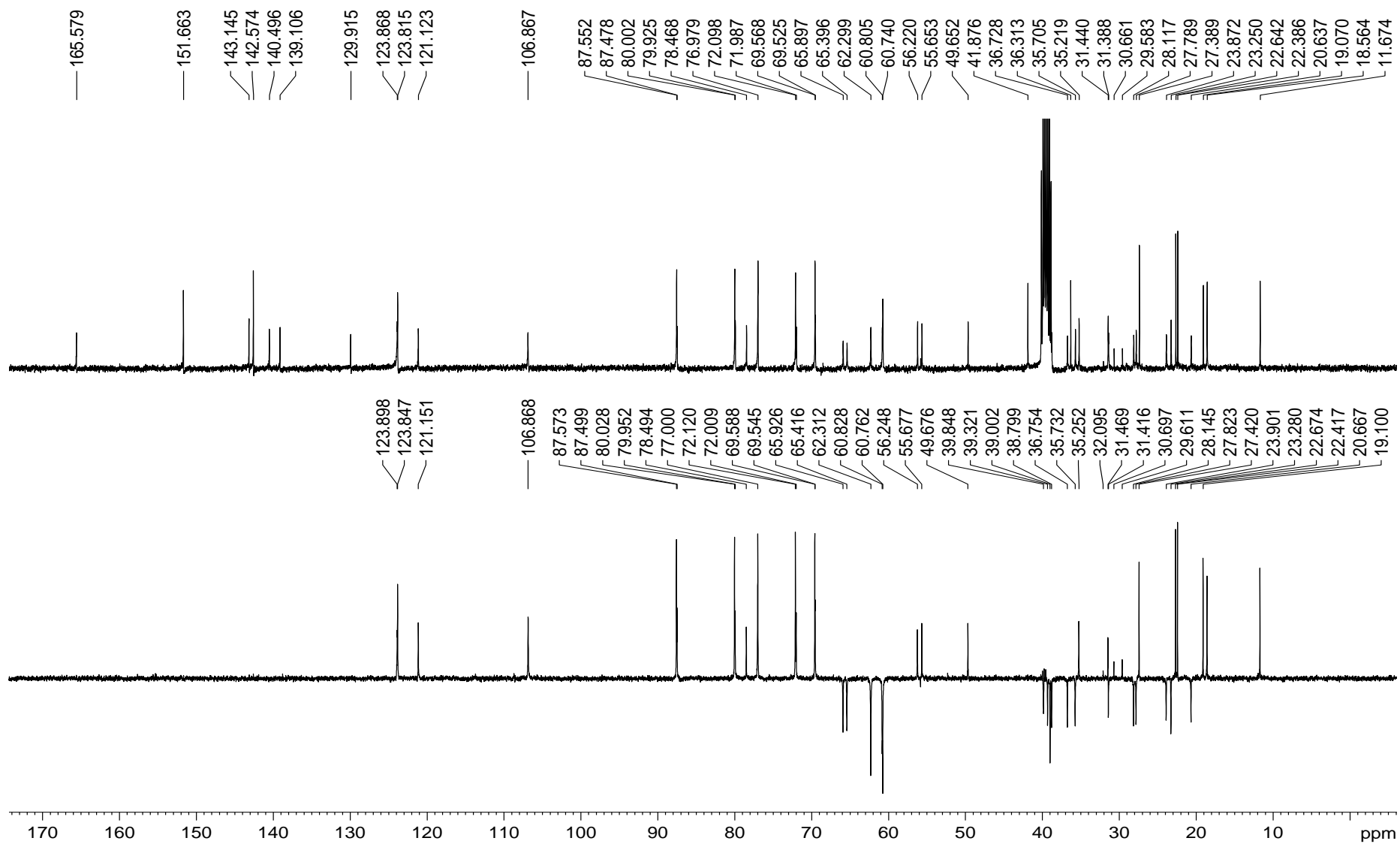


Figura A.70 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do glicosiltriazol **30** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

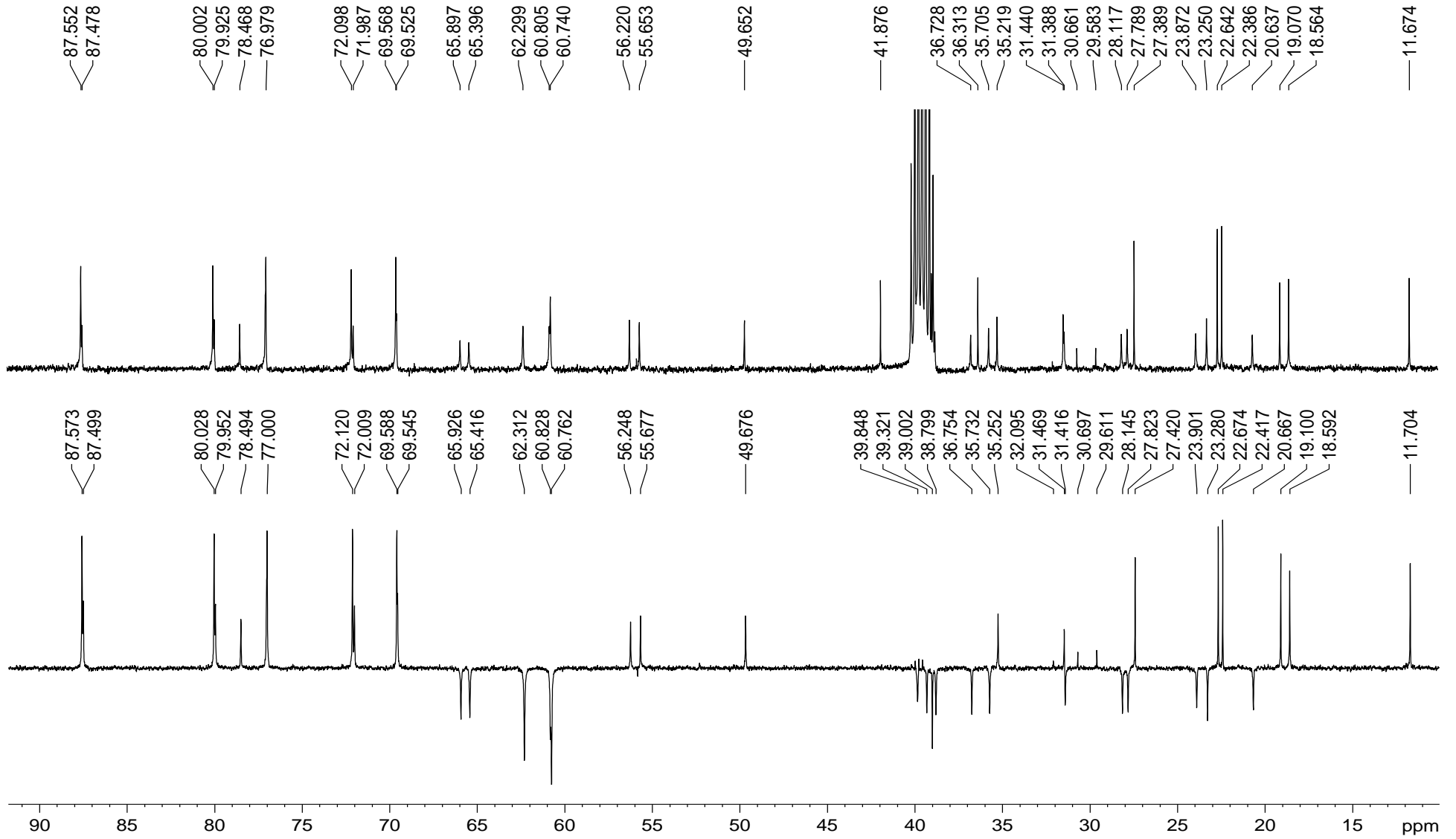


Figura A.71 – Espectro de massas (MALDI-TOF) do glicosiltriazol **30**.

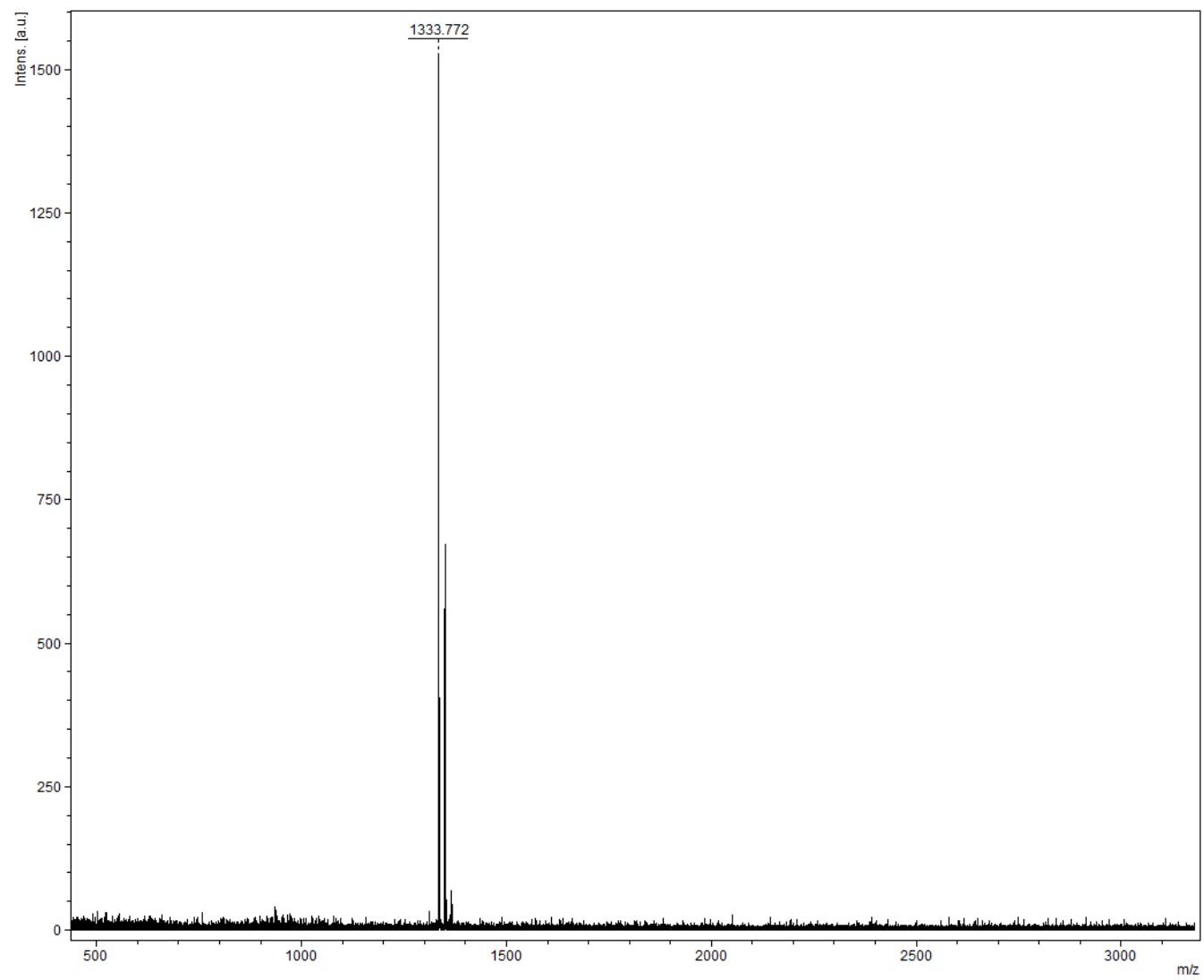


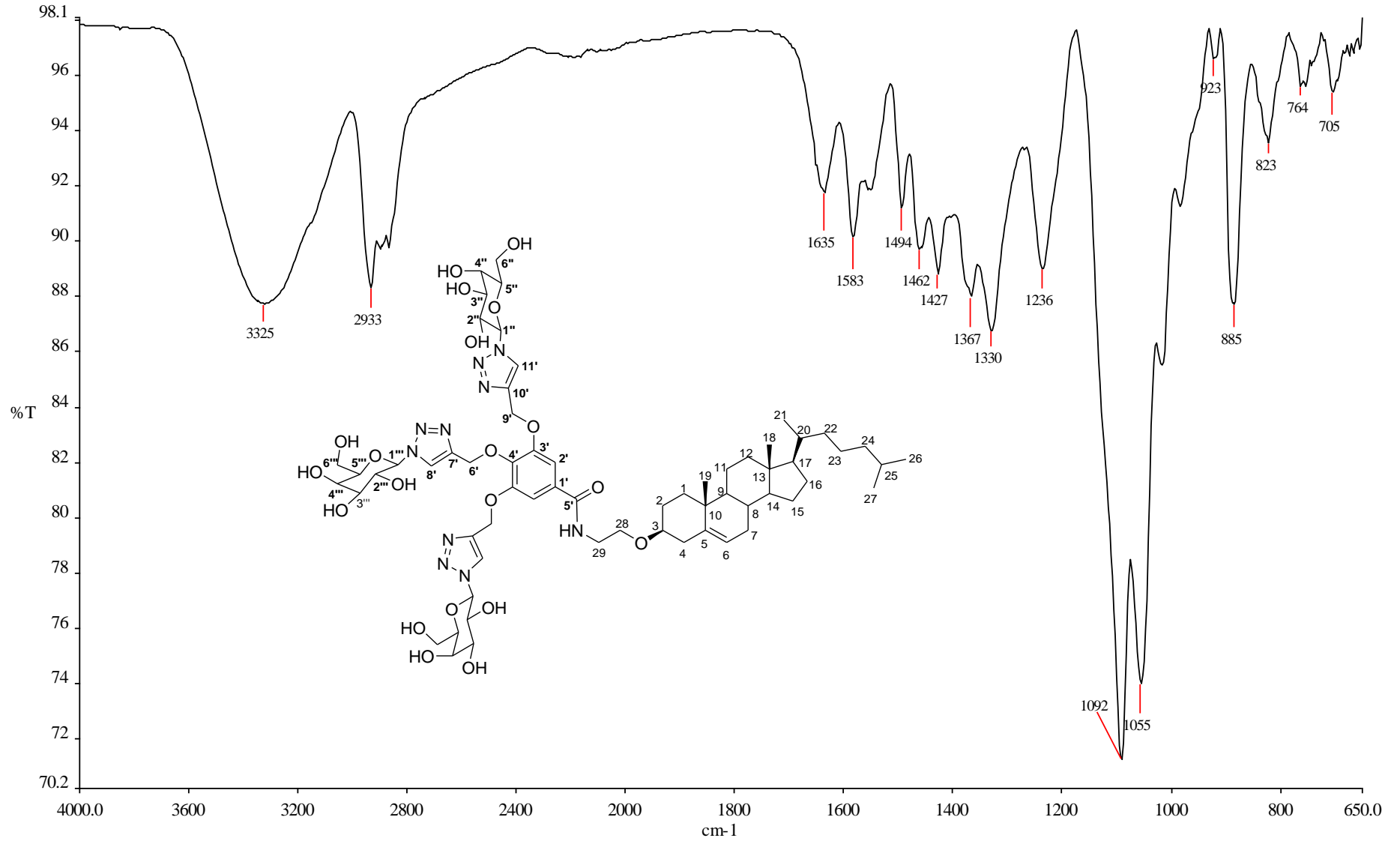
Figura A.72 – Espectro de absorção na região do IV do galactosiltriazol **31**.

Figura A.73 – Espectro de RMN de ^1H do galactosiltriazol **31** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

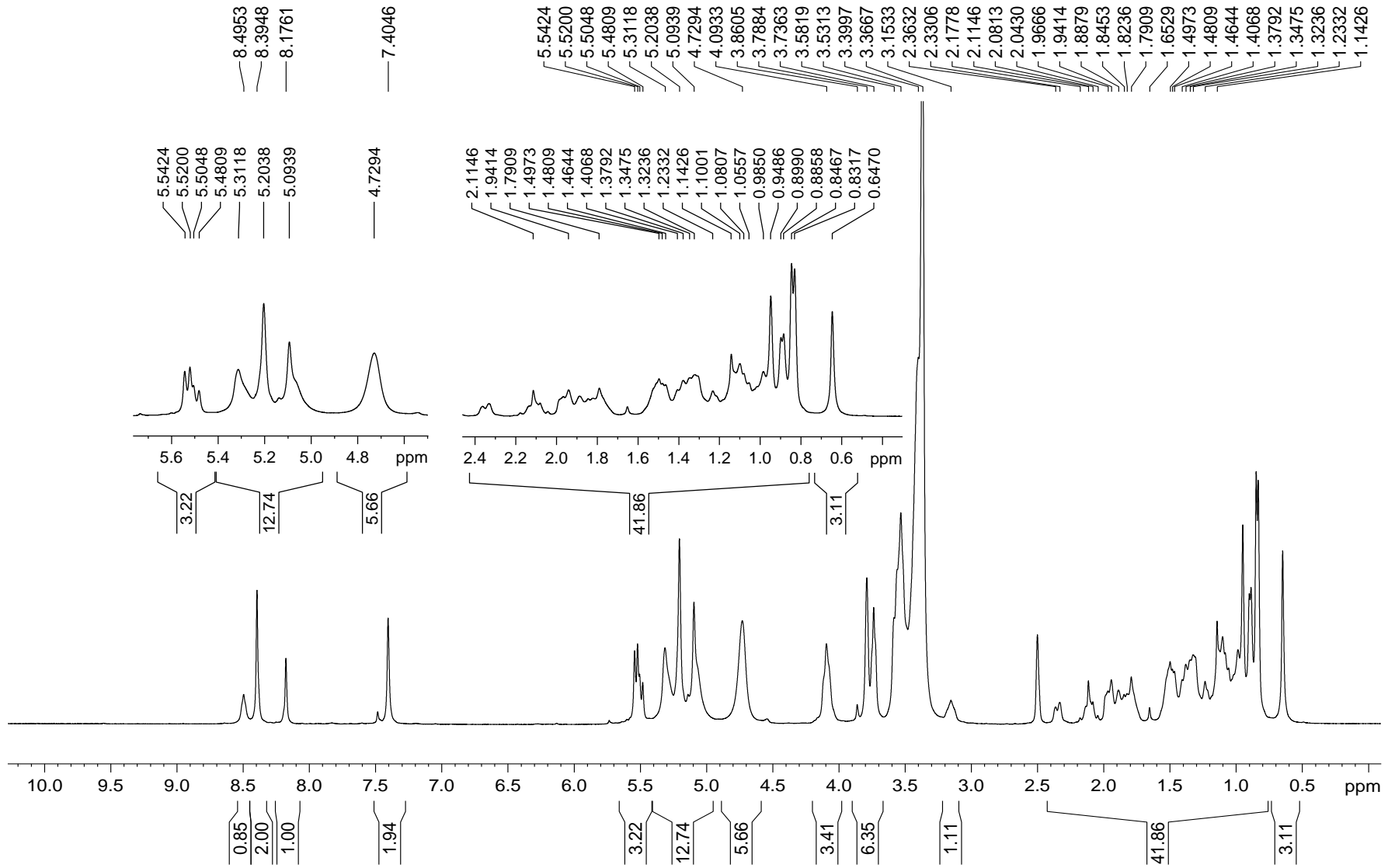


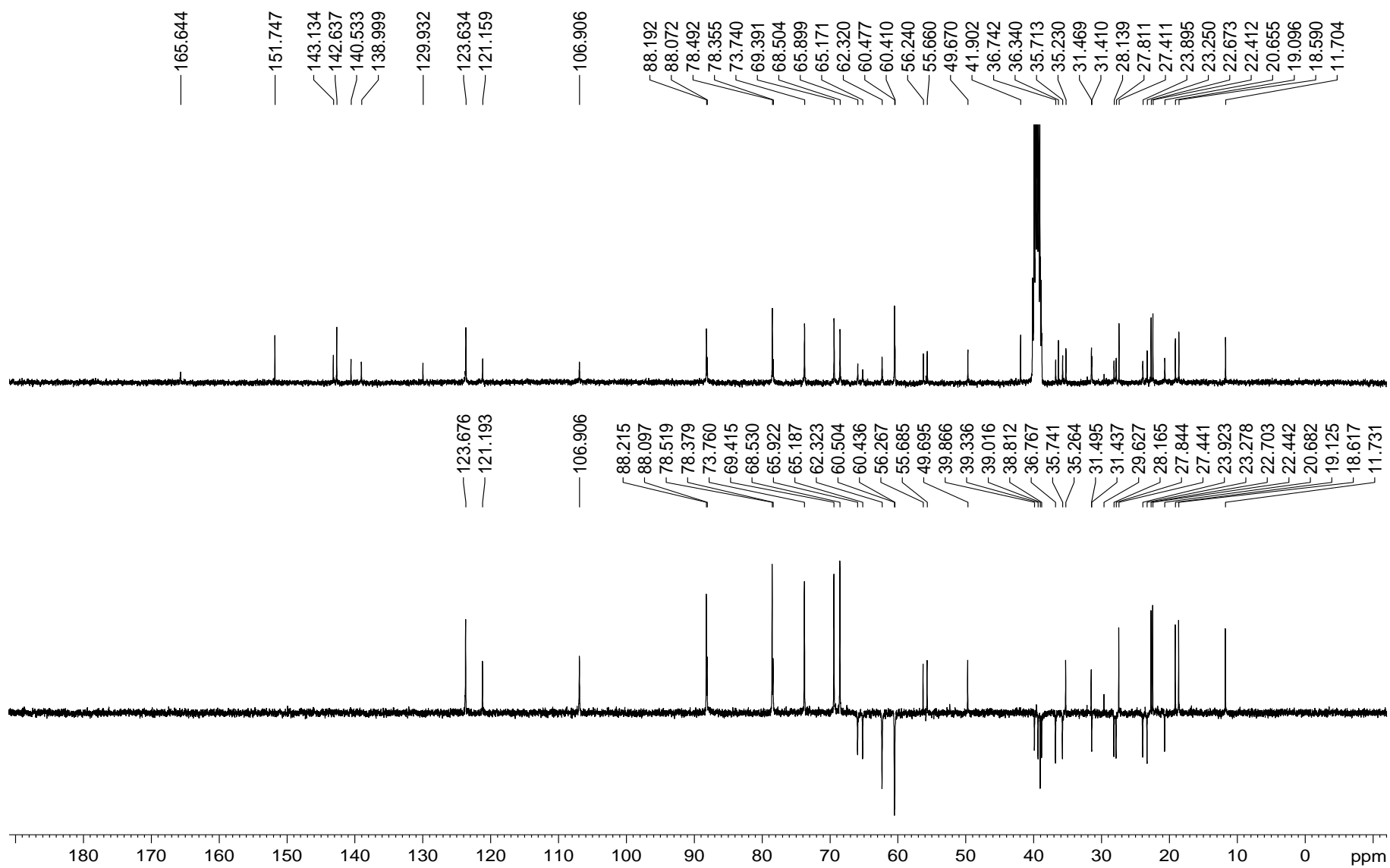
Figura A.74 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do galactosiltriazol **31** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Figura A.75 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 do galactosiltriazol **31** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

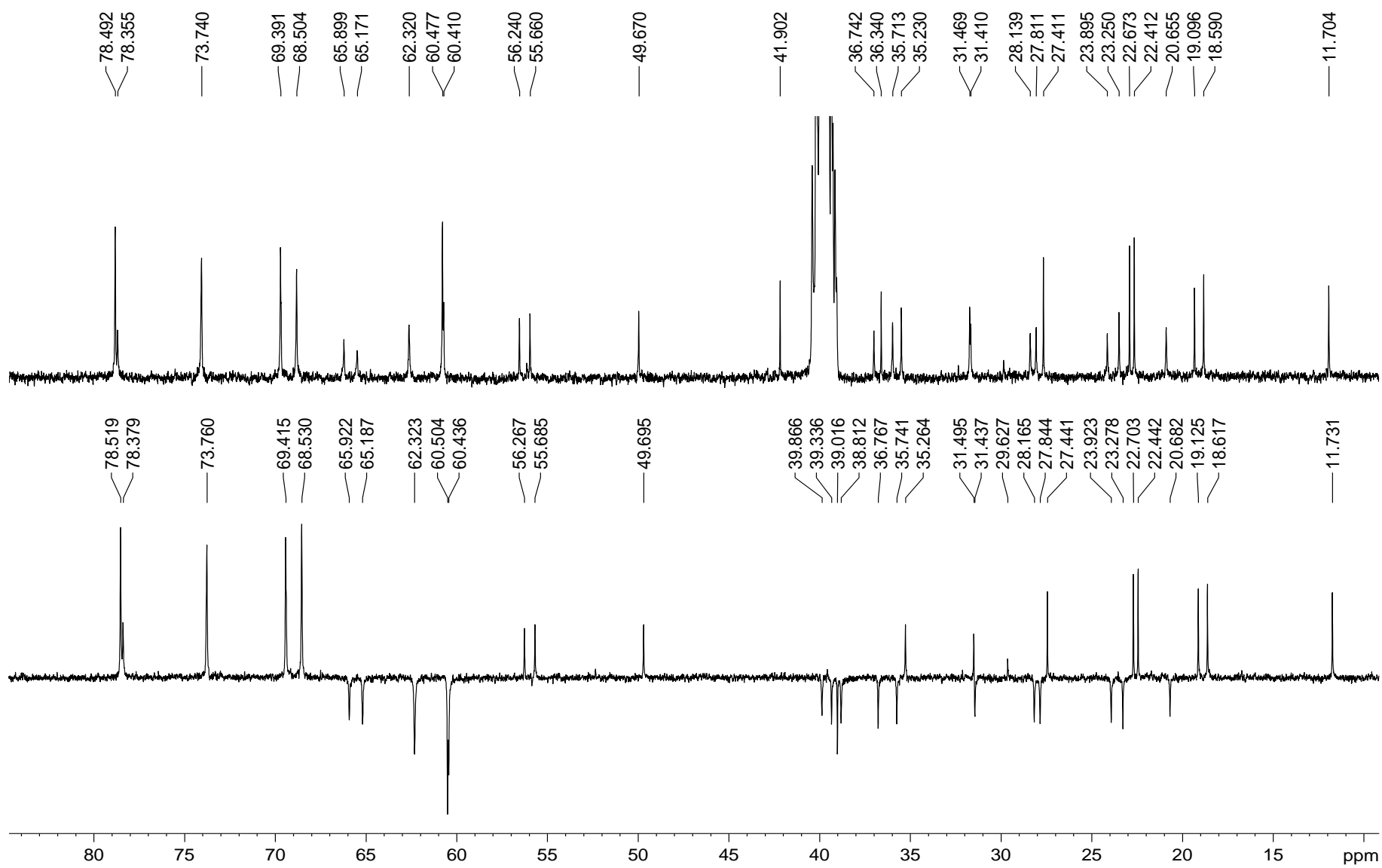


Figura A.76 – Espectro de massas (MALDI-TOF) do galactosiltriazol **31**.

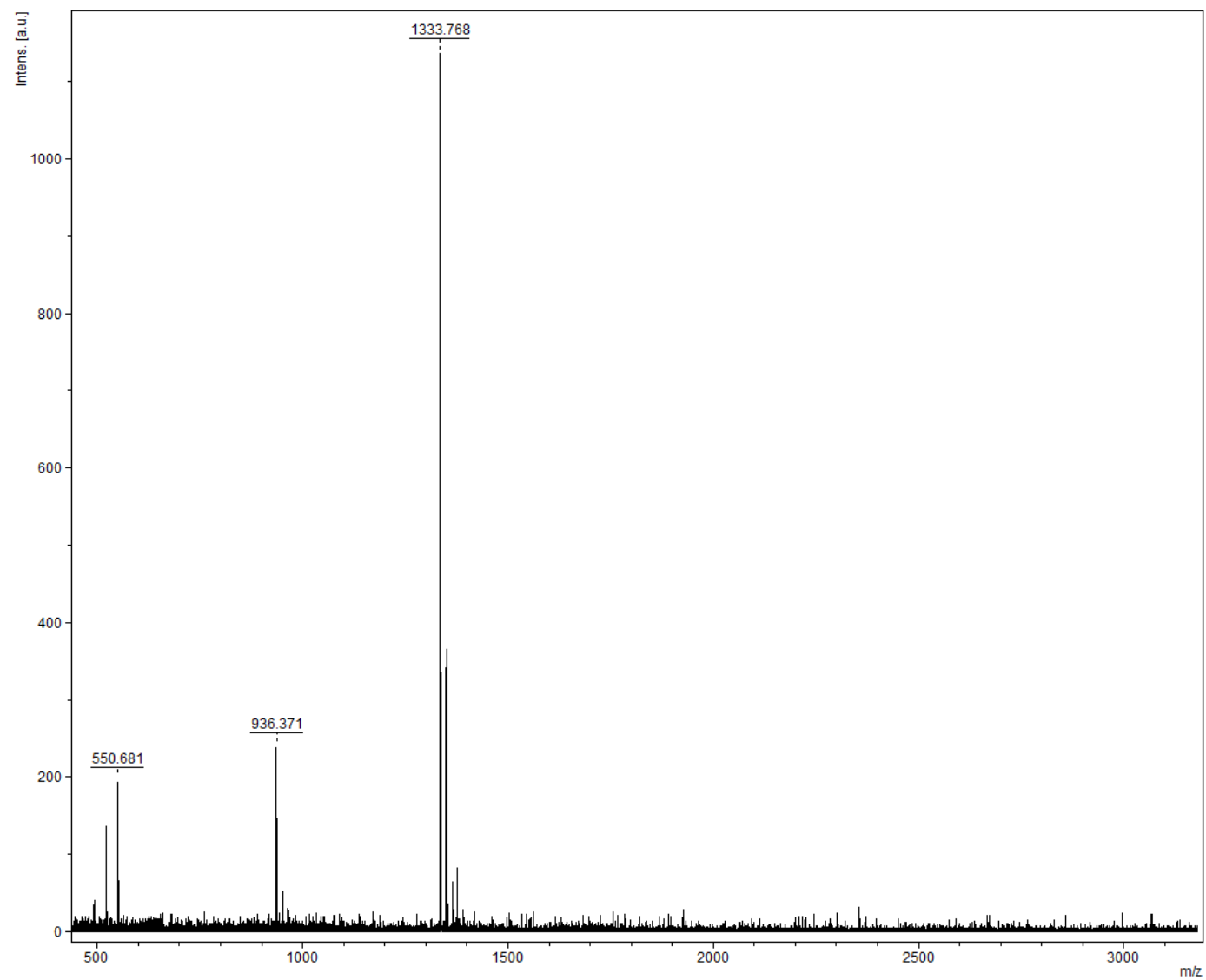


Figura A.78 – Espectro de RMN de ^1H de **32** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

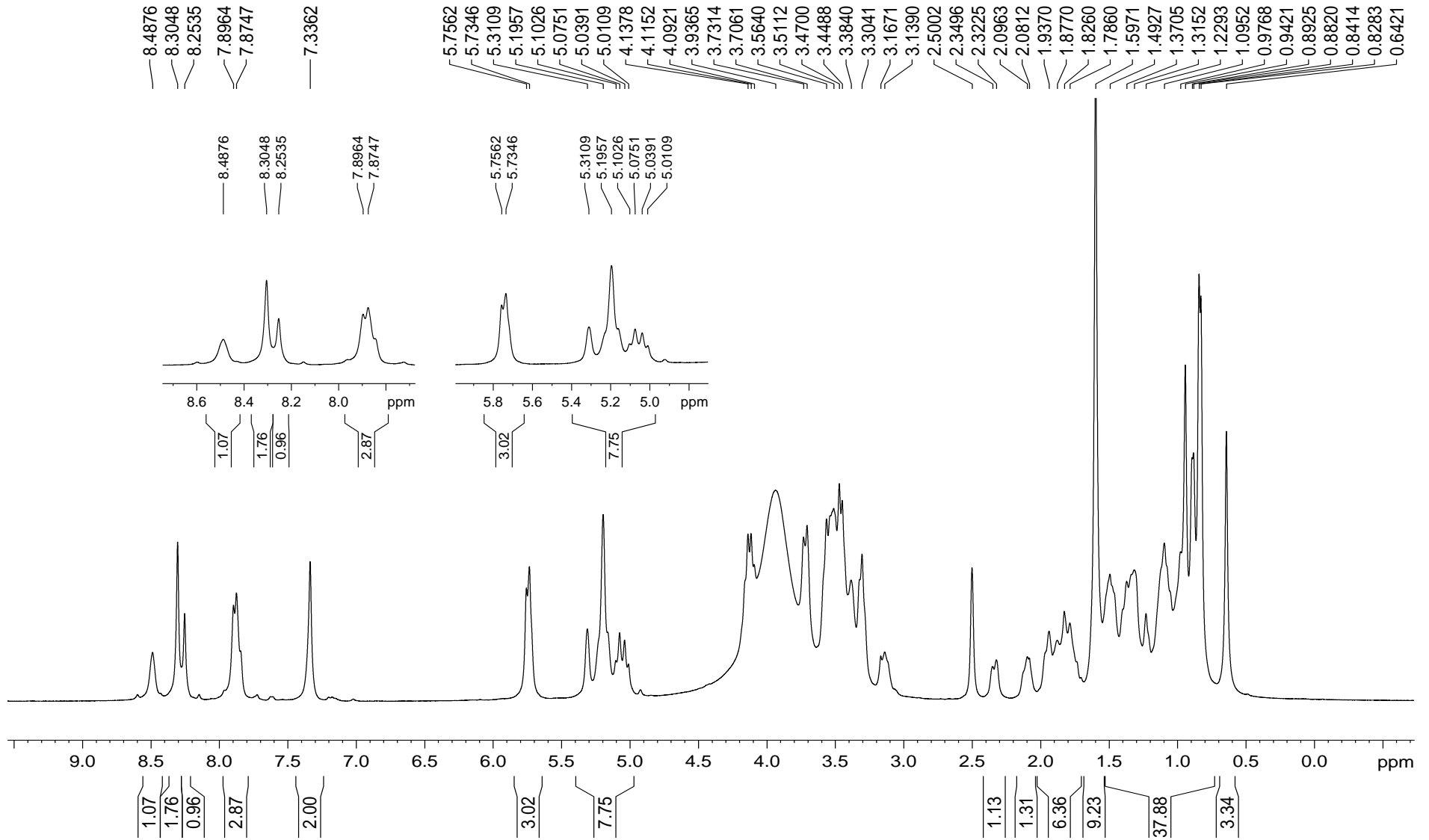


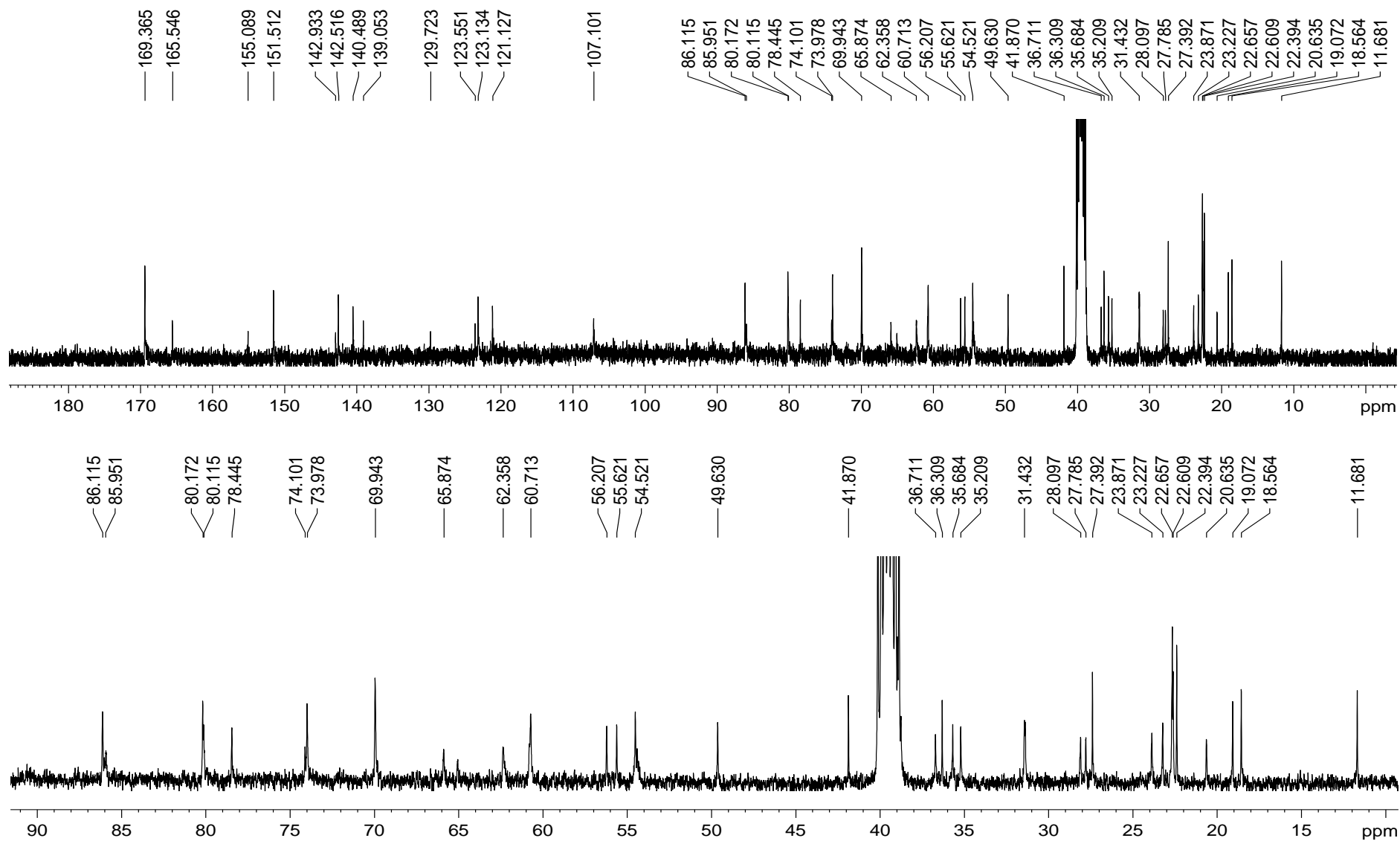
Figura A.79 – Espectro de RMN de ^{13}C de **32** (400 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.80 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **32** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

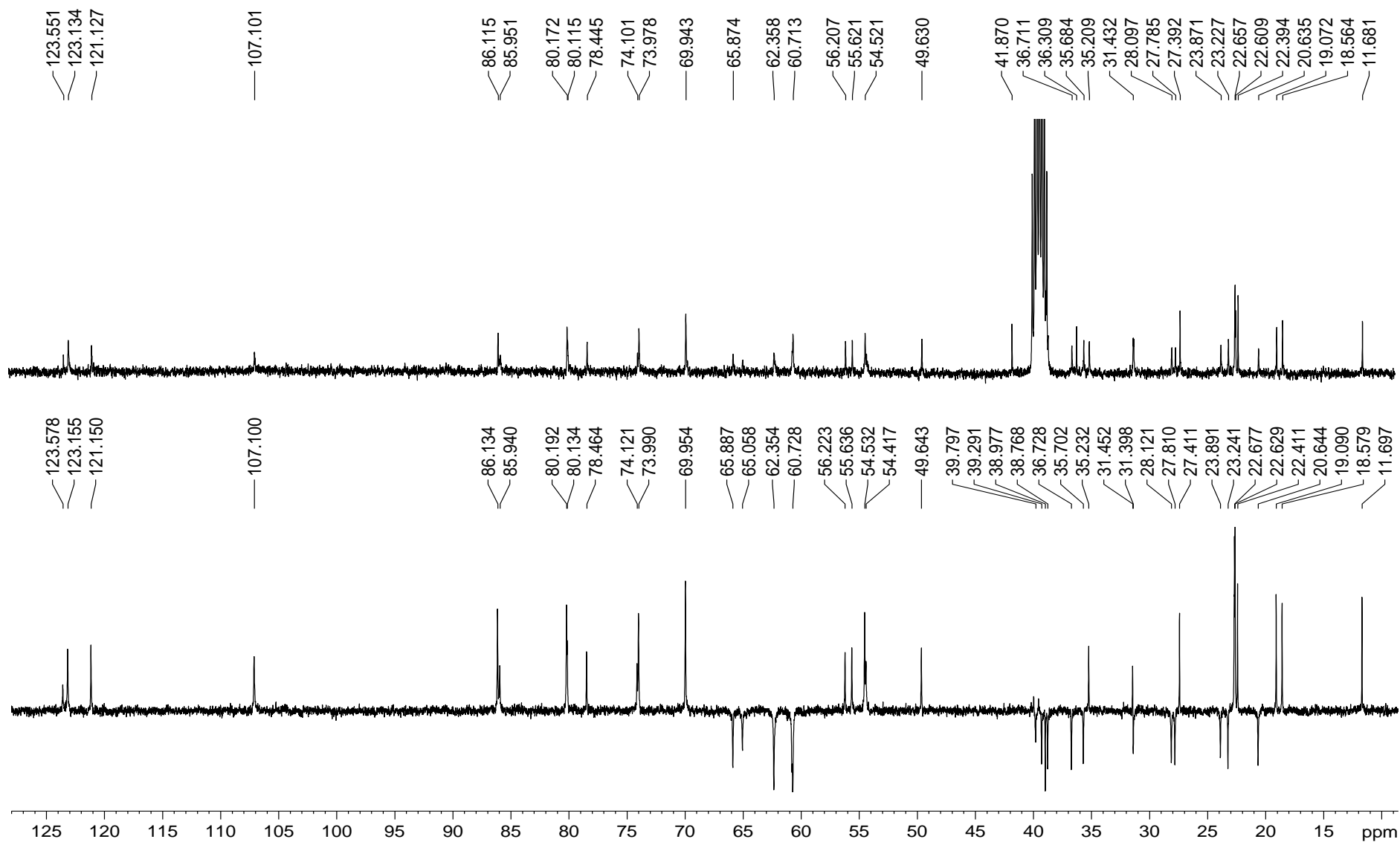


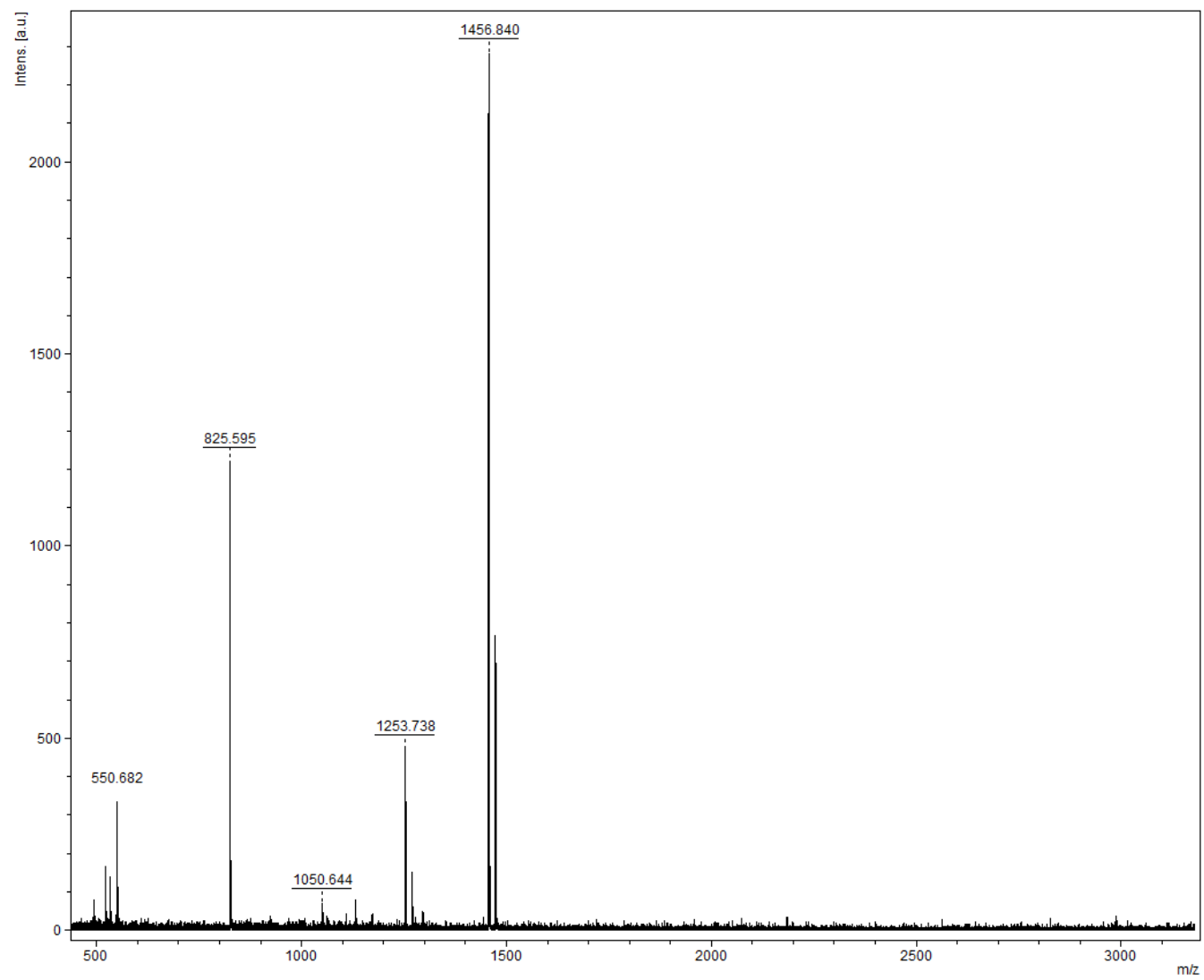
Figura A.81 – Espectro de massas (MALDI-TOF) de **32**.

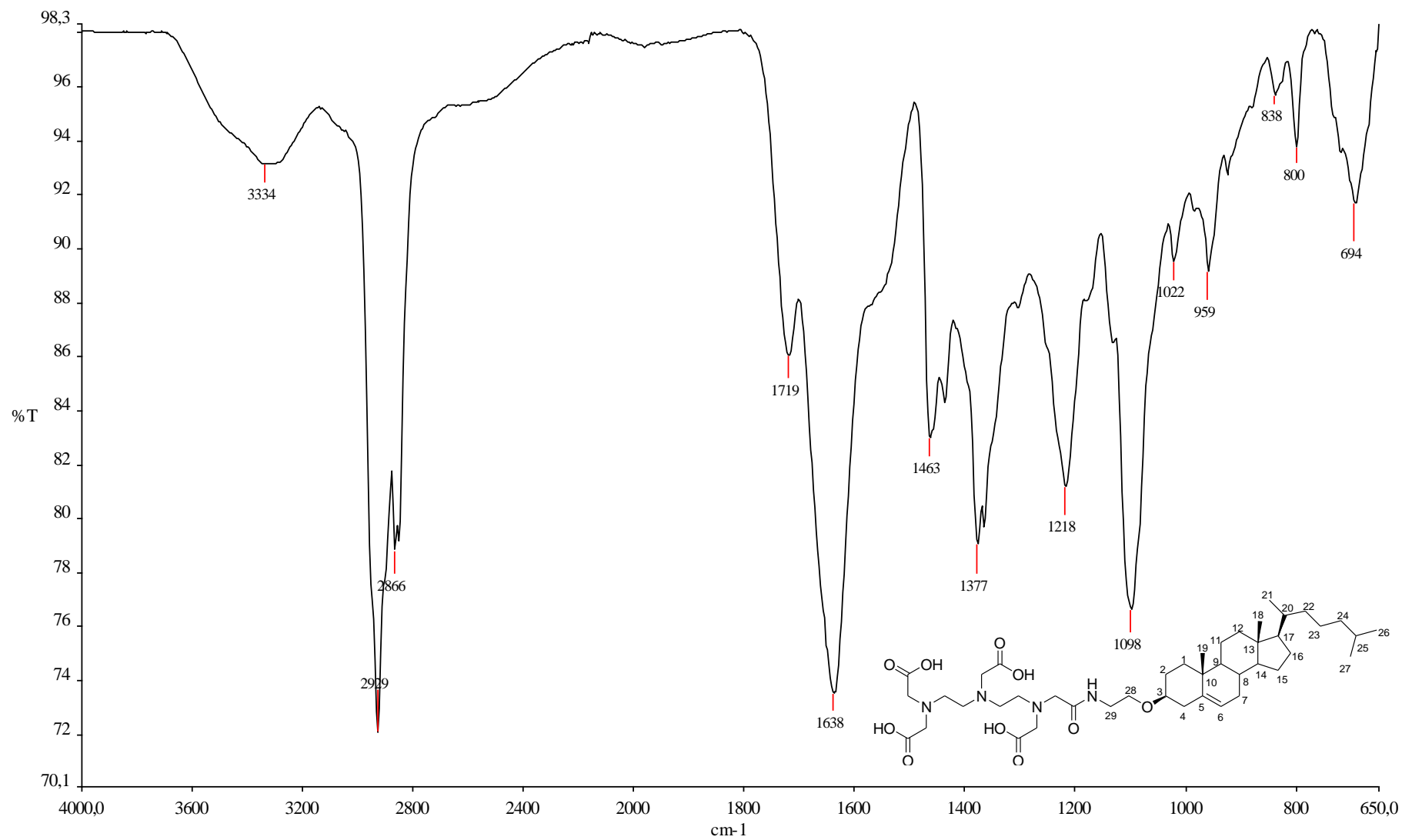
Figura A.82 – Espectro de absorção na região do IV de **33**.

Figura A.84 – Espectro de RMN de ^{13}C de **33** (50 MHz, piridina- d_5).

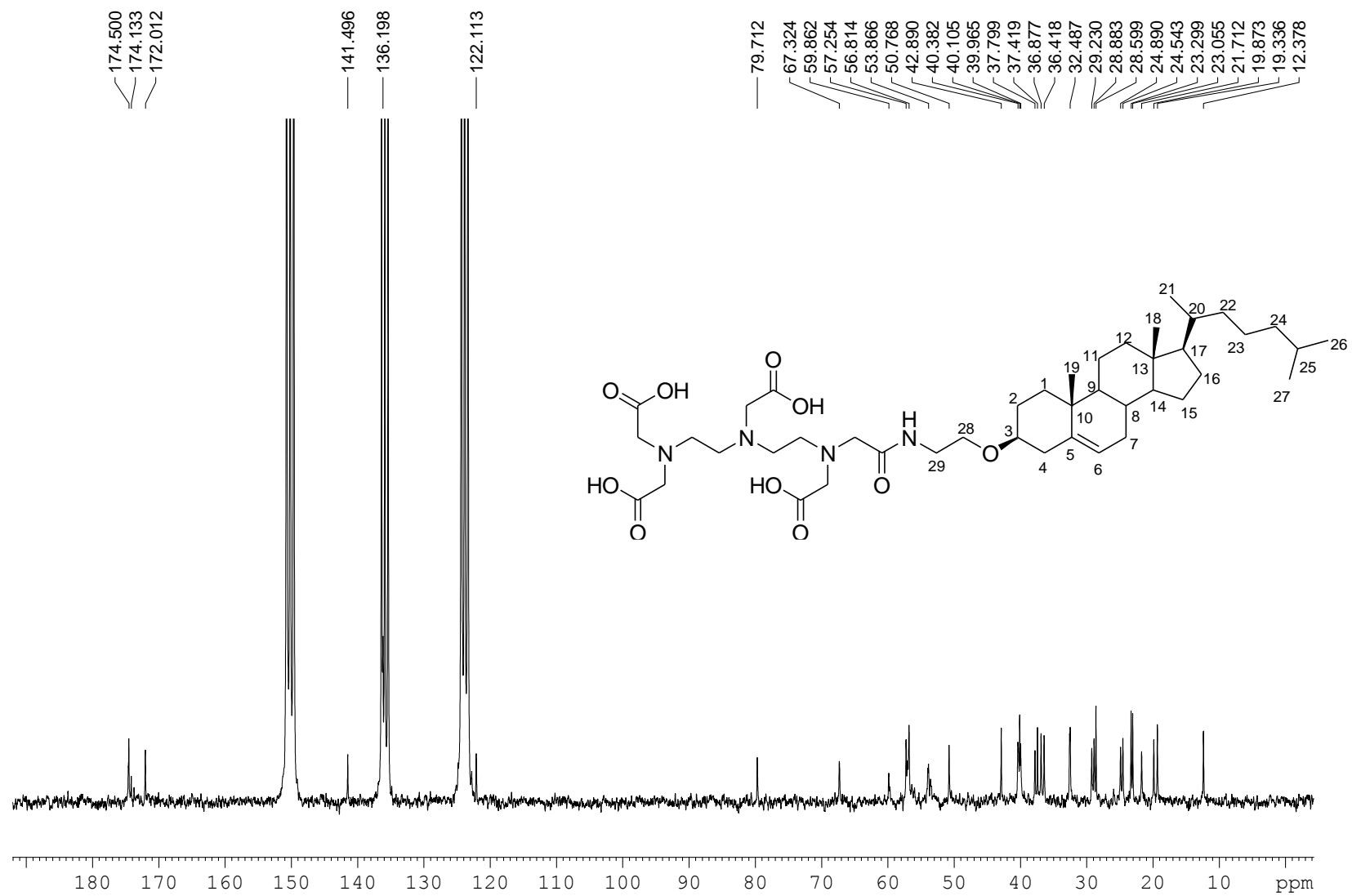


Figura A.85 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **33** (50 MHz, piridina- d_5).

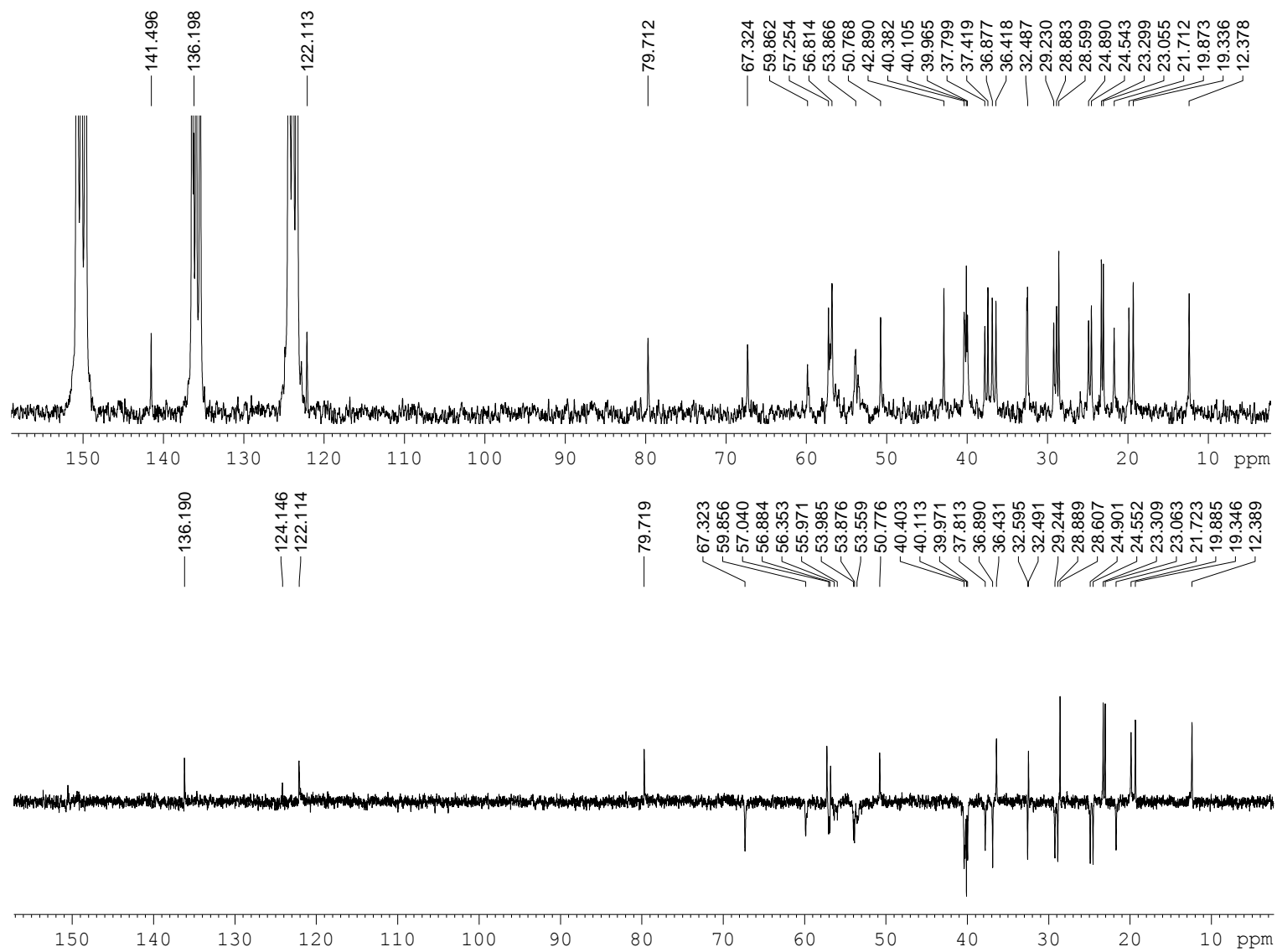
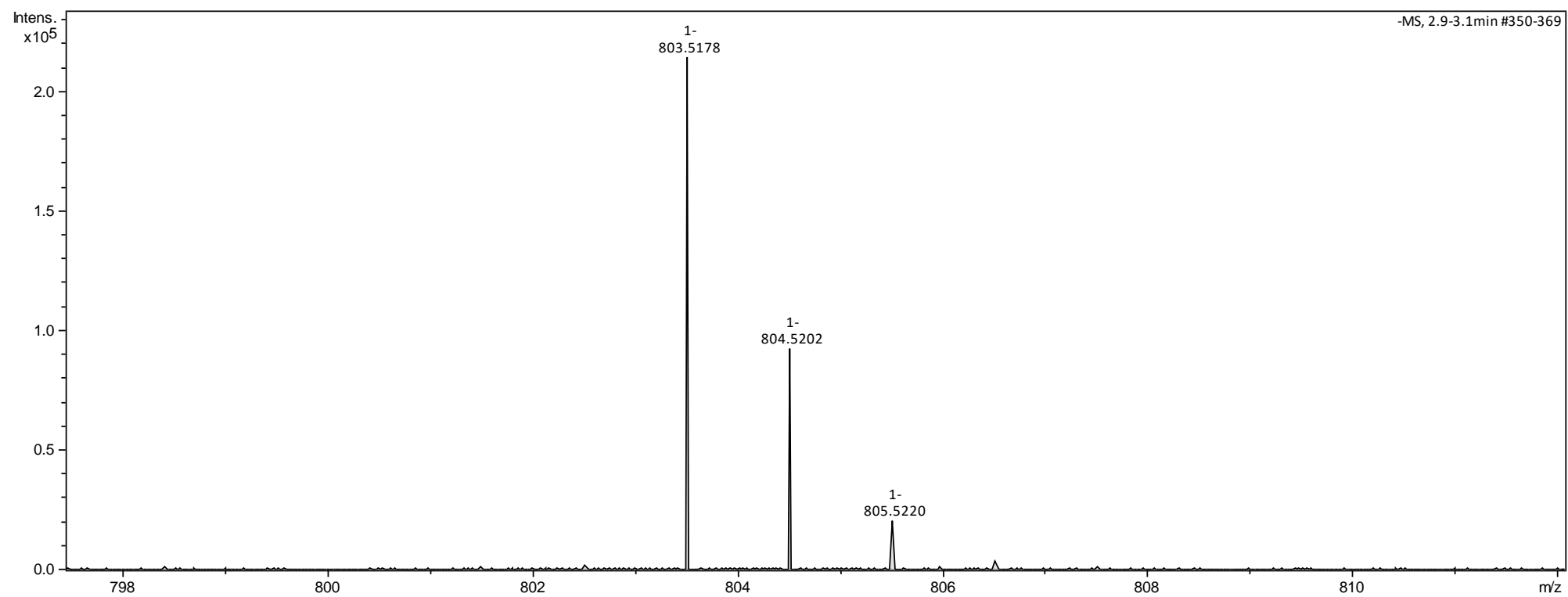


Figura A.86 – Espectro de massas (ESI) de **33**.

ANEXO B

**Tabelas dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos
Capítulos I e III**

Tabela B.1 – Dados de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (4)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
2,99	t	2,4 ($^4J_{8,6}$)	1	H-8
3,13	t	2,3 ($^4J_{11,9}$)	2	H-11
4,81	d	2,4 ($^4J_{6,8}$)	2	H-6
4,92	d	2,3 ($^4J_{9,11}$)	4	H-9
7,52	s	-	2	H-2

Tabela B.2 – Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) do ácido 3,4,5-tris(2-propin-1-iloxi)benzoico (4)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
57,6	2	C-9
60,5	1	C-6
77,0	2	C-10
77,6	2	C-11
79,4	1	C-8
79,9	1	C-7
110,6	2	C-2
127,2	1	C-1
141,8	1	C-4
152,4	2	C-3
167,3	1	<u>COOH</u>

Tabela B.3 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3- β -[(*p*-toluenossulfonil)oxi]colest-5-eno (6)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,66	s	-	3	H-18
0,85-2,29	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
2,44	s	-	3	H-5'
4,31-4,34	m	-	1	H-3
5,29-5,30	m	-	1	H-6
7,32	d	8,28 ($^3J_{2',3'}$)	2	H-3'
7,79	d	8,28 ($^3J_{3',2'}$)	2	H-2'

Tabela B.4 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 3- β -[(*p*-toluenossulfonil)oxi]colest-5-eno (6)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,0	1	C-18	36,6	1	C-10
18,9	1	C-21	37,1	1	C-1
19,3	1	C-19	39,1	1	C-4
21,2	1	C-11	39,7	1	C-24
21,8	1	C-5'	39,9	1	C-12
22,8	1	C-26	42,5	1	C-13
23,0	1	C-27	50,1	1	C-9
24,0	1	C-23	56,3	1	C-17
24,4	1	C-15	56,9	1	C-14
28,2	1	C-25	82,6	1	C-3
28,4	1	C-2	123,7	1	C-6
28,8	1	C-16	127,8	2	C-3'
32,0	1	C-8	129,9	2	C-2'
32,1	1	C-7	135,0	1	C-4'
36,0	1	C-20	139,1	1	C-5
36,4	1	C-22	144,6	1	C-1'

Tabela B.5 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3- β -[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (7)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,85-2,36	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
3,16-3,24	m	-	1	H-3
3,58	ta	4,3 ($^3J_{28,29}$) ou ($^3J_{29,28}$)	2	H-28 ou H-29
3,71	ta	4,3 ($^3J_{29,28}$) ou ($^3J_{28,29}$)	2	H-28 ou H-29
5,34-5,35	m	-	1	H-6

Tabela B.6 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 3- β -[(2-hidroxi)etoxi]colest-5-eno (7)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,1	1	C-18	37,1	1	C-10
18,9	1	C-21	37,4	1	C-1
19,6	1	C-19	39,3	1	C-4
21,3	1	C-11	39,7	1	C-24
22,8	1	C-26	40,0	1	C-12
23,0	1	C-27	42,5	1	C-13
24,1	1	C-23	50,4	1	C-9
24,5	1	C-15	56,4	1	C-17
28,2	1	C-25	57,0	1	C-14
28,4	1	C-2	62,3	1	C-28 ou C-29
28,6	1	C-16	69,2	1	C-28 ou C-29
32,12	1	C-8	79,7	1	C-3
32,15	1	C-7	121,9	1	C-6
36,0	1	C-20	140,9	1	C-5
36,4	1	C-22			

Tabela B.7 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3- β -[2-(*p*-toluenossulfonil)oxi]etoxi]colest-5-eno (8)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,67	s	-	3	H-18
0,85-2,29	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
2,45	s	-	3	H-5'
3,06-3,14	m	-	1	H-3
3,65	t	4,76 ($^3J_{28,29}$)	2	H-28
4,15	t	4,76 ($^3J_{29,28}$)	2	H-29
5,30-5,32	m	-	1	H-6
7,33	d	8,24 ($^3J_{2',3'}$)	2	H-3'
7,80	d	8,24 ($^3J_{3',2'}$)	2	H-2'

Tabela B.8 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 3- β -[2-(*p*-toluenossulfonil)oxi]etoxi]colest-5-eno (8)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,1	1	C-18	37,3	1	C-1
18,9	1	C-21	39,1	1	C-4
19,6	1	C-19	39,7	1	C-24
21,3	1	C-11	40,0	1	C-12
21,9	1	C-5'	42,5	1	C-13
22,8	1	C-26	50,3	1	C-9
23,0	1	C-27	56,4	1	C-17
24,0	1	C-23	57,0	1	C-14
24,5	1	C-15	65,6	1	C-28
28,2	1	C-25	69,9	1	C-29
28,38	1	C-2	79,8	1	C-3
28,44	1	C-16	122,0	1	C-6
32,08	1	C-8	128,2	2	C-3'
32,14	1	C-7	130,0	2	C-2'
36,0	1	C-20	133,4	1	C-4'
36,4	1	C-22	140,8	1	C-5
37,0	1	C-10	144,9	1	C-1'

Tabela B.9 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3- β -(2-azidoetoxi)colest-5-eno (9)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,86-2,38	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
3,17-3,24	m	-	1	H-3
3,35	t	5,08 ($^3J_{29,28}$)	2	H-29
3,65	t	5,08 ($^3J_{28,29}$)	2	H-28
5,34-5,35	m	-	1	H-6

Tabela B.10 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 3- β -(2-azidoetoxi)colest-5-eno (9)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,1	1	C-18	37,0	1	C-10
18,9	1	C-21	37,4	1	C-1
19,6	1	C-19	39,2	1	C-4
21,3	1	C-11	39,7	1	C-24
22,8	1	C-26	40,0	1	C-12
23,0	1	C-27	42,5	1	C-13
24,1	1	C-23	50,4	1	C-9
24,5	1	C-15	51,2	1	C-29
28,2	1	C-25	56,4	1	C-17
28,4	1	C-2	57,0	1	C-14
28,5	1	C-16	66,9	1	C-28
32,11	1	C-8	79,9	1	C-3
32,15	1	C-7	122,0	1	C-6
36,0	1	C-20	140,9	1	C-5
36,4	1	C-22			

Tabela B.11 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 3- β -(2-aminoetoxi)colest-5-eno (10)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,85-2,37	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
2,86	t	4,96 ($^3J_{29,28}$)	2	H-29
3,13-3,19	m	-	1	H-3
3,51	t	4,96 ($^3J_{28,29}$)	2	H-28
5,34-5,35	m	-	1	H-6

Tabela B.12 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 3- β -(2-aminoetoxi)colest-5-eno (10)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,1	1	C-18	37,1	1	C-10
18,9	1	C-21	37,4	1	C-1
19,6	1	C-19	39,4	1	C-4
21,3	1	C-11	39,7	1	C-24
22,7	1	C-26	40,0	1	C-12
23,0	1	C-27	42,3	1	C-29
24,0	1	C-23	42,5	1	C-13
24,5	1	C-15	50,4	1	C-9
28,2	1	C-25	56,4	1	C-17
28,4	1	C-2	57,0	1	C-14
28,7	1	C-16	70,0	1	C-28
32,12	1	C-8	79,5	1	C-3
32,15	1	C-7	121,8	1	C-6
36,0	1	C-20	141,1	1	C-5
36,4	1	C-22			

Tabela B.13 – Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopiranosose (14)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
2,02; 2,04; 2,08; 2,11	s	-	12	OCOCH_3
3,79-3,85	m	-	1	H-5
4,13-4,20	dd	1,96 ($^3J_{6-5}$), 12,4 ($^3J_{6-6'}$)	2	H-6
4,25-4,33	dd	4,6 ($^3J_{6'-5}$), 12,4 ($^3J_{6'-6}$)	2	H-6'
4,66	d	8 ($^3J_{1-2}$)	1	H-1
4,96	t	8 ($^3J_{2-1}$)	1	H-2
5,06-5,31	m	-	2	H-4, H-3

Tabela B.14 – Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-glicopiranosose (14)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
20,7	4	OCOCH_3
61,8	1	C-6
68,0	1	C-2
70,8	1	C-4
72,7	1	C-5
74,2	1	C-3
88,1	1	C-1
169,4; 169,5; 170,3; 170,8	4	COCH_3

Tabela B.15 – Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranosose (18)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
1,99; 2,07; 2,10; 2,18	s	-	12	OCOCH_3
4,00-4,06	m	-	1	H-5
4,16-4,20	m	-	2	H-6
4,62	d	8,4 ($^3J_{1-2}$)	1	H-1
5,04	dd	10,3 ($^3J_{3-2}$) 3,0 ($^3J_{3-4}$)	1	H-3
5,17	dd	10,3 ($^3J_{2-3}$) 8,4 ($^3J_{2-1}$)	1	H-2
5,42	d	3,0 ($^3J_{4-3}$)	1	H-4

Tabela B.16 – Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranosose (18)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
20,7; 20,8	4	OCOCH_3
61,4	1	C-6
67,0	1	C-4
68,2	1	C-2
70,9	1	C-3
73,0	1	C-5
88,4	1	C-1
169,5; 170,1; 170,3; 170,5	4	COCH_3

Tabela B.17 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopiranosose (22)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
1,99; 2,05; 2,11	s	-	12	OCOCH_3
3,83-3,97	m	-	2	H-2, H-5
4,18	dd	1,88 ($^3J_{6'-5}$), 12,26 ($^3J_{6'-6}$)	1	H-6'
4,29	dd	4,74 ($^3J_{6-5}$), 12,4 ($^3J_{6-6'}$)	1	H-6
4,86	d	9,26 ($^3J_{1-2}$)	1	H-1
5,11	t	9,72 ($^3J_{4-3}$)	1	H-4
5,32	t	9,72 ($^3J_{3-4}$)	1	H-3
6,49	d	8,88	1	NH

Tabela B.18 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- β -D-glicopiranosose (22)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
20,75	3	OCOCH_3
23,32	1	NHCOCH_3
54,22	1	C-2
62,11	1	C-6
68,43	1	C-4
72,36	1	C-5
74,06	1	C-3
88,54	1	C-1
169,48	1	NHCOCH_3
170,86; 171,04	3	OCOCH_3

Tabela B.19 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 23

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
1,70; 1,77; 1,92; 1,95; 1,97; 2,02	s	-	36	COCH_3
4,01-4,28	m	-	9	H-3', H-3'', H-6', H-6''
5,20-5,39	m	-	12	H-6, H-9, H-2', H-2'', H-5', H-5''
5,51	ta	-	2	H-4'
5,59	t	9,31 ($^3J_{4'',5''}$)	1	H-4''
5,94	d	9,28 ($^3J_{1',2'}$)	2	H-1'
6,15	d	9,48 ($^3J_{1'',2''}$)	1	H-1''
7,33	s	-	2	H-2
8,33	s	-	1	H-8
8,40	s	-	2	H-11

Tabela B.20 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 23

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
19,9; 20,0; 20,49; 20,54; 20,6	12	OCOCH_3	75,0	2	C-3'
61,6	2	C-6'	85,4	1	C-1''
61,8	1	C6''	85,7	2	C-1'
62,8	2	C-9	109,2	2	C-2
65,8	1	C-6	122,2	2	C-11
67,8	3	C-2', C2''	123,4	1	C-8
70,1	1	C-4''	125,3	3	C-10, C-7
70,4	2	C-4'	141,5	1	C-1
72,8	2	C-5'	144,6	1	C-4
73,0	1	C-5''	151,6	2	C-3
74,7	1	C-3''	168,8; 168,9; 169,1; 169,4; 169,6; 170,0; 170,6	13	OCOCH_3 , COOH

Tabela B.21 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do galactosiltriazol 24

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
1,68; 1,77; 1,94; 1,97; 2,15	s	-	36	OCOCH_3
4,07-4,18	m	-	6	H-6', H-6''
4,24	ta	-	3	H-5', H-5''
5,20 – 5,31	m	-	9	H-6, H-9, H-3', H-3''
5,47-5,49	m	-	3	H-4', H-4''
5,54	t	9,24 ($^3J_{2'-1'}$)	2	H-2'
5,63	t	9,24 ($^3J_{2''-1''}$)	1	H-2''
5,87	d	9,24 ($^3J_{1'-2'}$); 9,24 ($^3J_{1''-2''}$)	3	H-1', H-1''
7,39	s	-	2	H-2
8,05	s	-	1	H-11
8,12	s	-	2	H-8

Tabela B.22 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do galactosiltriazol 24

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
20,3; 20,6; 20,75; 20,76	12	OCOCH_3	86,0	1	C-1''
61,2	1	C-6''	86,3	2	C-1'
61,3	2	C-6'	109,9	2	C-2
63,0	2	C-9	122,5	2	C-11
66,3	1	C-6	123,6	1	C-8
67,1	3	C-4', C-4''	125,4	1	C-1
68,0	1	C-2''	142,0	1	C-4
68,1	2	C-2'	144,2	2	C-10
71,0	2	C-3'	144,8	1	C-7
71,2	1	C-3''	151,9	2	C-3
73,8	1	C-5''	168,9; 169,2; 170,0; 170,1; 170,26; 170,34; 170,5, 170,6	13	OCOCH_3 , COOH
74,1	2	C-5'			

Tabela B.23 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 26

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,85-2,39	m	-	76	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, COCH_3
3,17-3,22	m	-	1	H-3
3,51-3,61	m	-	4	H-28, H-29
4,06-4,36	m	-	9	H-3'', H-3''', H-6'', H-6'''
5,28-5,52	m	-	15	H-6, H-6', H-9', H-2'', H-2''', H-4'', H-5'', H-5'''
5,64	t	8,92 ($^3J_{4'-5'}$)	1	H-4'''
5,97	d	8,92 ($^3J_{1''-2''}$)	2	H-1''
6,24	d	9,48 ($^3J_{1'''-2'''}$)	1	H-1'''
6,91	s	-	1	CONH
7,09	s	-	2	H2'
8,39	s	-	1	H-8'
8,49	s	-	2	H-11'

Tabela B.24 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 26

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,0	1	C-18	56,3	1	C-17
18,9	1	C-21	56,9	1	C-14
19,6	1	C-19	61,8	2	C-6''
20,1; 20,3; 20,65; 20,70; 20,8	12	OCOCH ₃	62,91	1	C-6'''
21,2	1	C-11	62,93	2	C-9'
22,7	1	C-26	65,8	1	C-28 ou C-6'
22,9	1	C-27	66,8	1	C-6' ou C-28
23,9	1	C-23	68,0	3	C-2'', C2'''
24,4	1	C-15	70,3	1	C-4'''
28,1	1	C-25	70,9	2	C-4''
28,3	1	C-2	72,9	2	C-5''
28,6	1	C-16	73,2	1	C-5'''
29,8	1	C-8	75,0	1	C-3'''
32,0	1	C-7	75,2	2	C-3''
35,9	1	C-20	79,6	1	C-3
36,3	1	C-22	85,6	1	C-1'''
37,0	1	C-10	86,0	2	C-1''
37,3	1	C-1	106,4	2	C-2'
39,2	1	C-4	122,2; 122,4; 123,1	4	C-6, C-8', C-11'
39,6	1	C-24	130,8	1	C-1'
39,9	1	C-12	142,0	2	C-4', C-5
40,6	1	C-29	144,8; 144,9	3	C-7', C-10'
42,4	1	C-13	151,9	2	C-3'
50,3	1	C-9	167,2; 169,7; 170,1; 170,7	13	<u>C</u> ONH OCOCH ₃

Tabela B.25 – Dados de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do glicosiltriazol 27

δ (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,85-2,22	m	-	76	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H- 14, H-15, H-16, H-17, H-19, H- 20, H-21, H-22, H-23, H-24, H- 25, H-26, H-27, COCH ₃
3,18-3,21	m	-	1	H-3
3,60-3,63	m	-	4	H-28, H-29
4,14-4,31	m	-	9	H-5'', H-5''' H-6'', H-6'''
5,27-5,34	m	-	10	H-6, H-6', H-9', H-3'', H-3'''
5,54-5,71	m	-	6	H-2'', H-2''', H-4'', H-4'''
5,89-5,95	m	-	3	H-1'', H-1'''
6,83	s	-	1	CONH
7,16	s	-	2	H2'
8,04	s	-	2	H-11'
8,17	s	-	1	H-8'

Tabela B.26 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 27

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,0	1	C-18	56,9	1	C-14
18,9	1	C-21	61,2	1	C-6'''
19,6	1	C-19	61,3	2	C-6''
20,31; 20,34; 20,7; 20,8	12	$\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$	63,1	2	C-9'
21,3	1	C-11	66,5	1	C-28 ou C-6'
22,7	1	C-26	66,7	1	C-6' ou C-28
22,9	1	C-27	67,0	3	C-4'', C-4'''
23,9	1	C-23	68,0	1	C-2'''
24,4	1	C-15	68,3	2	C-2''
28,2	1	C-25	70,9	2	C-3''
28,4	1	C-2	71,3	1	C-3'''
28,6	1	C-16	73,9	1	C-5'''
29,9	1	C-8	74,2	2	C-5''
32,1	1	C-7	79,6	1	C-3
35,9	1	C-20	86,0	1	C-1'''
36,4	1	C-22	86,5	2	C-1''
37,0	1	C-10	107,5	2	C-2'
37,4	1	C-1	122,0; 122,3; 123,3	4	C-6, C-8', C-11'
39,3	1	C-4	130,8	1	C-1'
39,7	1	C-24	140,8; 140,4	2	C-4', C-5
40,0	1	C-12	144,4; 145,0	3	C-7', C-10'
40,6	1	C-29	152,1	2	C-3'
42,5	1	C-13	166,9	1	$\underline{\text{C}}\text{ONH}$
50,4	1	C-9	168,9; 169,2; 170,0; 170,1; 170,2; 170,3; 170,5	12	$\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$
56,4	1	C-17			

Tabela B.27 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 28

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,85-2,22	m	-	76	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H- 14, H-15, H-16, H-17, H-19, H- 20, H-21, H-22, H-23, H-24, H- 25, H-26, H-27, COCH_3 , NHCOCH_3
3,13	m	-	1	H-3
4,01-4,24; 4,61- 4,64; 5,09-5,14; 5,20; 5,35-5,41	m	-	25	H-3'', H-3''', H-6'', H-6''', H-6, H-6', H-9', H-5'', H-5''', H-2'', H-2''', H-4'', H-4'''
6,19	d	9,12 ($^3J_{1''-2''}$); 9,12 ($^3J_{1'''-2'''}$)	3	H-1'', H-1'''
7,34	s	-	2	H2'
8,20	m	-	3	NHCOCH_3
8,41	s	-	1	H-8'
8,45	s	-	2	H-11'
8,49	s	-	1	CONH

Tabela B.28 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do glicosiltriazol 28

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
11,7	1	C-18	41,9	1	C-13
18,5	1	C-21	49,6	1	C-9
19,0	1	C-19	52,1; 52,2	3	C-2'', C-2'''
20,3; 20,4; 20,5; 20,6	9	OCOCH_3 ,	55,6	1	C-17
20,8	1	C-11	56,2	1	C-14
22,3; 22,4; 22,6, 23,2	5	NHCOCH_3 , C-26, C-27	61,8	3	C-6'', C-6''' ou C-9'
23,2	1	C-23	62,4	1	C-9' ou C-6'', C-6'''
23,8	1	C-15	65,0; 65,9	2	C-6' ou C-28
27,4	1	C-25	68,1	3	C-4'', C-4'''
27,8	1	C-2	72,4	3	C-5'', C-5'''
28,1	1	C-16	73,5	3	C-3''', C-3''
31,36	1	C-7	78,4	1	C-3
31,42	1	C-8	84,8	1	C-1'', C-1'''
35,2	1	C-20	107,2	2	C-2'
35,7	1	C-22	121,1; 123,3; 123,8, 125,5	4	C-6, C-8', C-11'
36,3	1	C-10	128,0	1	
36,7	1	C-1	129,8	1	C-1'
38,8	1	C-4	138,9; 140,5	2	C-4', C-5
39,0	1	C-24	143,0	2	C-10'
39,3	1	C-12	143,3	1	C-7'
39,8	1	C-29	151,5	2	C-3'
			165,5; 169,3; 169,6; 170,0;	13	NHCOCH_3 CONH OCOCH_3

Tabela B.29 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de 29

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,85-2,39	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
2,46	t	2,36 ($^4J_{8',6'}$)	1	H-8'
2,53	t	2,24 ($^4J_{11',9'}$)	2	H-11'
3,16-3,24	m	-	1	H-3
3,62-3,65	m	-	4	H-28, H-29
4,79	s	-	6	H6', H9'
5,33-5,35	m	-	1	H-6
6,61	s	-	1	CONH
7,20	s	-	2	H-2'

Tabela B.30 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de 29

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,0	1	C-18	40,4	1	C-29
18,9	1	C-21	42,5	1	C-13
19,6	1	C-19	50,3	1	C-9
21,3	1	C-11	56,4	1	C-17
22,7	1	C-26	56,9	1	C-14
23,0	1	C-27	57,4	2	C-9'
24,0	1	C-23	60,5	1	C-6'
24,5	1	C-15	66,7	1	C-28
28,2	1	C-25	75,7	2	C-10'
28,4	1	C-2	76,4	2	C-11'
28,7	1	C-16	78,3	1	C-8'
32,07	1	C-8	79,0	1	C-7'
32,09	1	C-7	79,6	1	C-3
36,0	1	C-20	108,0	2	C-2'
36,4	1	C-22	122,1	1	C-6
37,0	1	C-10	130,7	1	C-1'
37,3	1	C-1	140,1	1	C-4'ou C-5
39,3	1	C-4	140,7	1	C-4'ou C-5
39,7	1	C-24	151,7	2	C-3'
39,9	1	C-12	166,8	1	<u>C</u> ONH

Tabela B.31 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do glicosiltriazol derivado da glicose (30)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,65	s	-	3	H-18
0,83-2,50	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H- 14, H-15, H-16, H-17, H-19, H- 20, H-21, H-22, H-23, H-24, H- 25, H-26, H-27
3,15	m	-	1	H-3
3,28-5,42	m	-	41	H-3'', H-3''', H-6'', H-6''', H-6', H-9', H-6, H-5'', H-5''', H-2'', H-2''', H-4'', H-4''', H-28, H-29, C-OH
5,54	d	9,2 ($^3J_{1''''-2''''}$)	1	H1''''
5,59	d	9,2 ($^3J_{1''-2''}$)	2	H1''
7,42	s	-	2	H2'
8,27	s	-	1	H-8'
8,45	s	-	2	H-11'
8,50	s	-	1	CONH

Tabela B.32 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do glicosiltriazol derivado da glicose (30)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
11,7	1	C-18	49,7	1	C-9
18,6	1	C-21	55,7	1	C-17
19,1	1	C-19	56,3	1	C-14
20,6	1	C-11	60,76; 60,83	3	C-6'', C-6'''
22,4	1	C-26	62,3	2	C-9'
22,6	1	C-27	65,4	1	C-28 ou C-6'
23,3	1	C-23	65,9	1	C-6' ou C-28
23,9	1	C-15	69,5; 69,6	3	C-2'', C-2'''
27,4	1	C-25	71,98; 72,09	3	C-4'', C-4'''
27,8	1	C-2	77,0	3	C-5'', C-5'''
28,1	1	C-16	78,5	1	C-3
31,38	1	C-7	79,9; 80,0	3	C-3'', C-3'''
31,44	1	C-8	87,5; 87,6	3	C-1'', C-1'''
35,2	1	C-20	106,9	2	C-2'
35,7	1	C-22	121,2; 123,8, 123,9	4	C-6, C-8', C-11'
36,3	1	C-10	129,9	1	C-1'
36,7	1	C-1	139,1; 140,5	2	C-4', C-5
38,8	1	C-4	142,6	2	C-10'
39,0	1	C-24	143,1	1	C-7'
39,2	1	C-12	151,7	2	C-3'
39,8	1	C-29	165,6	1	<u>C</u> ONH
41,9	1	C-13			

Tabela B.33 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do glicosiltriazol derivado da galactose (31)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,65	s	-	3	H-18
0,83-2,36	m	-	40	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27
3,15	m	-	1	H-3
3,73-3,86	m	-	41	H-3'', H-3''', H-6'', H-6''', H-6', H-9', H-6, H-5'', H-5''', H-2'', H-2''', H-4'', H-4''', H-28, H-29, C-OH
5,51	d	9,6 ($^3J_{1''',2''''}$)	1	H1''''
5,53	d	9,0 ($^3J_{1'',2''}$)	2	H1''
7,40	s	-	2	H2'
8,17	s	-	1	H-8'
8,39	s	-	2	H-11'
8,49	s	-	1	CONH

Tabela B.34 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do glicosiltriazol derivado da galactose (31)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
11,7	1	C-18	49,7	1	C-9
18,6	1	C-21	55,6	1	C-17
19,1	1	C-19	56,2	1	C-14
20,7	1	C-11	60,4	1	C-6''
22,7	1	C-26	60,5	2	C-6''
22,7	1	C-27	62,3	2	C-9'
23,3	1	C-23	65,2	1	C-28 ou C-6'
23,9	1	C-15	65,9	1	C-6' ou C-28
27,4	1	C-25	68,5	3	C-4'', C-4'''
27,8	1	C-2	69,4	3	C-2'', C-2'''
28,1	1	C-16	73,7	3	C-3'', C-3'''
31,4	1	C-7	78,4	1	C-3
31,5	1	C-8	78,5	3	C-5'', C-5'''
35,2	1	C-20	88,1	1	C-1'''
35,7	1	C-22	88,2	2	C-1''
36,3	1	C-10	106,9	2	C-2'
36,7	1	C-1	121,2; 123,6	4	C-6, C-8', C-11'
38,8	1	C-4	129,9	1	C-1'
39,0	1	C-24	139,0; 140,5	2	C-4', C-5
39,3	1	C-12	142,6; 143,1	3	C-7', C-10'
39,9	1	C-29	151,7	2	C-3'
41,9	1	C-13	165,6	1	<u>C</u> ONH

Tabela B.35 – Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do glicosiltriazol derivado da *N*-acetilglicosamina (32)

δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integral	Atribuição
0,64	s	-	3	H-18
0,83-2,35	m	-	49	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H- 14, H-15, H-16, H-17, H-19, H- 20, H-21, H-22, H-23, H-24, H- 25, H-26, H-27, NHCOCH ₃
3,14	m	-	1	H-3
3,16-5,31	m	-	38	H-3'', H-3''', H-6'', H-6''', H-6, H-6', H-9', H-5'', H-5''', H-2'', H-2''', H-4'', H-4''', H-28, H-29, C-OH
5,74	m	-	3	H-1'', H-1'''
7,34	s	-	2	H2'
7,87-7,90	m	-	3	NHCOCH ₃
8,25	s	-	1	H-8'
8,30	s	-	2	H-11'
8,49	s	-	1	CONH

Tabela B.36 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do glicosiltriazol derivado da *N*-acetilglicosamina (32)

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
11,7	1	C-18	49,6	1	C-9
18,6	1	C-21	54,4; 54,5	3	C-2'', C-2'''
19,1	1	C-19	55,6	1	C-17
20,6	1	C-11	56,2	1	C-14
22,4; 22,6; 22,7	5	NHCO <u>C</u> H ₃ , C-26, C-27	60,7	3	C-6'', C-6''' ou C-9'
23,2	1	C-23	62,4	1	C-9' ou C-6'', C-6'''
23,9	1	C-15	65,1; 65,9	2	C-6' ou C-28
27,4	1	C-25	69,9	3	C-4'', C-4'''
27,8	1	C-2	74,0; 74,1	3	C-5'', C-5'''
28,1	1	C-16	78,4	1	C-3
31,4	1	C-7	80,1; 80,2	3	C-3''', C-3''
31,5	1	C-8	86,0; 86,1	3	C-1'', C-1'''
35,2	1	C-20	107,1	2	C-2'
35,7	1	C-22	121,1; 123,1; 123,6,	4	C-6, C-8', C-11'
36,3	1	C-10	129,7	1	C-1'
36,7	1	C-1	139,1; 140,5	2	C-4', C-5
38,8	1	C-4	142,5	2	C-10'
39,0	1	C-24	142,9	1	C-7'
39,3	1	C-12	151,5	2	C-3'
39,8	1	C-29	155,5; 165,5; 169,4	4	NH <u>C</u> OCH ₃ <u>C</u> ONH
41,9	1	C-13			

Tabela B.37 – Dados de RMN de ¹H (200 MHz, piridina) de 33

δ (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)	Integral	Atribuição
0,68	s	-	3	H-18
0,89-2,59	m	-	47	H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, CH ₂ ^{DTPA}
3,23-3,29	m	-	6	CH ₂ ^{DTPA}
3,78-4,11	m	-	11	CH ₂ ^{DTPA}
5,43	sl	m	1	H-6
7,85	m	-	-	COOH

Tabela B.38 – Dados de RMN de ¹³C (50 MHz, piridina) de 33

δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição	δ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
12,3	1	C-18	37,8	1	C-1
19,3	1	C-21	39,9	1	C-4
19,9	1	C-19	40,1	1	C-24
21,7	1	C-11	40,4	1	C-12
23,0	1	C-26	42,9	1	C-29
23,3	1	C-27	42,5	1	C-13
24,5	1	C-23	50,7	1	C-9
24,9	1	C-15	53,6; 53,9;54,0;	-	CH ₂ ^{DTPA}
28,6	1	C-25	56,9	1	C-17
28,9	1	C-2	57,2	1	C-14
29,2	1	C-16	59,8	-	CH ₂ ^{DTPA}
32,48	1	C-8	67,3	1	C-28
32,59	1	C-7	79,7	1	C-3
36,4	1	C-20	122,2	1	C-6
36,9	1	C-22	141,5	1	C-5
37,4	1	C-10	172,0; 174,1; 174,5	5	COOH, CONH